ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ
ИМЕНИ В. М. ГОРБАТОВА»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

(ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН)

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

Диссертация на соискание ученой степени

доктора технических наук

Научный консультант: Чернуха Ирина Михайловна

доктор технических наук,
профессор, академик РАН

Москва-2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5

ГЛАВА 1. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ 15

1.1. АЛИМЕНТАРНЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПУТИ ИХ КОРРЕКЦИИ 15

1.2. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ РАЗРАБОТКИ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ И ПРАКТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ПОИСКА И ВНЕДРЕНИЯ ПРОДУКТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИМ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЯМИ 28

ГЛАВА 2. ОБОСНОВАНИЕ НАПРАВЛЕНИЙ ИССЛЕДОВАНИЙ, ИХ ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ 36

ГЛАВА 3. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ: СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ, АППАРАТУРНОЕ ОСНАЩЕНИЕ39

3.1 СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЙ И ЕЕ РЕАЛИЗАЦИЯ 39

3.2 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 41

3.3 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СЫРЬЯ, БАВ и СМП 50

3.4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЧАСТНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ БАВ И СМП 62

3.5 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ 63

Глава 4. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К РАЗРАБОТКЕ ЧАСТНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ПРОДУКТА И КАПСУЛИРОВАННОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИНГРЕДИЕНТА 64

4.1. РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ДОСТАВКИ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСОВМЕСТИМЫХ НОСИТЕЛЕЙ 64

4.2. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО МЯСНОГО ПРОДУКТА, ОБОГАЩЕННОГО БИОАКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ 74

Глава 5. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИИ ОЦЕНКИ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ

ПРОДУКТОВ И РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ 78
5.1 ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ И ПРОГНОЗА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ 78
5.2 ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ МЕТОДАМИ IN VITRO 105
5.2.1 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МОДЕЛЕЙ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРЕВАРИВАНИЯ НУТРИЕНТОВ ПРОДУКТОВ И СЫРЬЯ, А ТАКЖЕ БАВ 105
5.2.2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА ИЗУЧЕНИЯ ГИПОТЕНЗИВНЫХ СВОЙСТВ IN VITRO 110
5.2.3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ (IN VITRO И EX VIVO) 114
5.2.4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ IN VITRO 120
5.3 ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ МЕТОДАМИ EX VIVO 125
5.3.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА ИЗУЧЕНИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ 125
5.3.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ 127
5.3.3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДОВ МЕМБРАНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ 132
5.4. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ МЕТОДАМИ IN VIVO 134
5.4.1. ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СБОЕВ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПУТЕМ ВАРЬИРОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ РАЦИОНА 135
5.4.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНЫХ СИСТЕМ 158
5.4.3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ ИММУНОСУПРЕССИВНЫХ СОСТОЯНИЙ 188

5.4.4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ 194
5.4.5. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА КОМПЛЕКСНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ 198
ГЛАВА 6. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АЛГОРИТМА ДЛЯ ОЦЕНКИ СВОЙСТВ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ 202
6.1. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В СООТВЕТСТВИИ С АЛГОРИТМОМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ 202
6.2. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АЛГОРИТМА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ 213
6.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ В СООТВЕТСТВИИ С РАЗРАБОТАННЫМ АЛГОРИТМОМ 227
6.3.1 РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ СМП_1 227
6.3.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ СМП_2 235
ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА ЧАСТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ПРОДУКТА И ДОБАВОК ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ 260
7.1. РАЗРАБОТКА ЧАСТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО МЯСНОГО ПРОДУКТА 260
7.2. РАЗРАБОТКА ЧАСТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ КАПСУЛИРОВАННОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ДОБАВКИ 266
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ВЫВОДЫ 282
ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ 285
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 288
ПРИЛОЖЕНИЕ 324

ВВЕДЕНИЕ

Питание как одна из важнейших составляющих образа жизни, представляется главным фактором, определяющим здоровье человека и сохранение генофонда нации.

Многочисленными клиническими исследованиями показано, что питание играет огромную роль в поддержании высокой работоспособности и резистентности, снижении риска развития различных заболеваний. При этом установлено, что 80 % всех патологических состояний, в том числе инфекционной природы (Katona P., Katona-Apte J., 2008; Farhadi S., Ovchinnikov R., 2018), являются алиментарно-зависимыми и охватывают большие группы населения различных стран.

Алиментарные факторы имеют существенное значение в возникновении и развитии таких распространённых патологий как сердечно-сосудистые заболевания, в том числе ишемическая болезнь сердца, цереброваскулярные заболевания, гипертоническая болезнь (артериальная гипертензия, атеросклероз, хроническая сердечная недостаточность – в 61 % случаях; онкопатология – в 30 % случаях; сахарный диабет II типа (инсулин-независимый) – 6 %, остеопороз и алиментарные дефициты (йододефицит, железодефицит и т.д.) – 4 %, а также заболеваний желудочно-кишечного тракта, печени и желчевыводящих путей, эндокринных патологий и пр. (Weininger J., 2019). Среди основных антиалиметарных факторов выделяют высокую калорийность пищевых продуктов, избыточное потребление насыщенных жирных кислот, рафинированных углеводов и поваренной соли, дефицита или избытка микронутриентов, в особенности ионов калия и магния, витаминов и пищевых волокон (Чернуха И.М., 2019).

Данные факторы могут оказывать краткосрочные или отдаленные последствия, влияя не только на популяционные показатели населения, но и вызывая реакции любой стадии жизни индивидуума на организменном, тканевом, клеточном и молекулярном уровне (Качковский М. А., 2014).

Исследования на протяжении последних 20 лет с применением методов геномики, протеомики и метаболомики в совокупности с анализом эпидемиологической распространенности различных заболеваний позволили выявить корреляционную связь между генотипом человека, обусловливающем индивидуальную реакцию на различные нутрицевтики, и собственно нутриентами, которые воздействуя на экспрессию гена, увеличивают темп мутирования и число генетических повреждений, приводящих к гемодинамическим и гемостазиологическим, липидемическим и нейрогуморальным сдвигам (Meng Z. et al, 2005; Waterland R. A., Michels K. B., 2007; Вайсерман А. М. с соавт., 2011; Tammen S. A. et al, 2013; Jang H., Serra C., 2014; Лукоянова О. Л., Боровик Т. Э., 2015; Tiffon C., 2018).

Для предотвращения социально-значимых заболеваний сегодня широко используют модификации характера питания в популяциях, подверженных риску, 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 приобретает разработка новых стратегий 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. Проблемы разработки технологий специализированных и функциональных продуктов, содержащих биологически активные вещества различной природы, а также их исследований освещены в работах многих ученых, среди которых можно отметить А. А. Покровского, К. С. Петровского, Н. Н. Липатова, В. М. Позняковского, В. А. Тутельяна, И. А. Рогова, А. Б. Лисицына, Д. Б. Никитюка, А. В. Устинову, И. М. Чернуху, А. А. Кочеткову, И. Ф. Горлова. Результаты их исследований являются краеугольным камнем при разработке технологий и последующего изучения продуктов питания. Одновременно с этим, учитывая стремительное развитие технологий, необходима не только систематизация и анализ современных методов исследований, но и

формирование комплексного подхода к исследованию эффективности и биобезопасности специализированных и функциональных пищевых продуктов.

Целью диссертационной 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 апробацией на примере технологий обогащения их биоактивными веществами природного происхождения.

Научная концепция диссертационной работы заключается том, что анализ, отбор, апробация и адаптация *in vitro, ex vivo* и *in vivo* методов подтверждения биологических свойств (в т.ч. антиоксидантных, иммуномодулирующих, цитопротективных, гиполипидемических, гипогликемических, нейропротективных и т.д.) позволят обосновать процедуру комплексного постадийного изучения функциональных и специальных свойств продуктов, в равной степени эффективной при исследовании пищевых добавок, полупродуктов и продуктов, а также разрешит проблему изучения продуктов нового поколения.

Для реализации научной концепции и 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 адресной 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 апробировать предложенную научную концепцию.

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

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

Отдельные этапы исследований диссертационной 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 по теме «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, тема «Разработка инновационных природных стимуляторов неспецифического иммунитета адаптогенного действия на основе видо- и тканеспецифичных биомолекул» (2015 – 2019 гг); № 16-16-10073, тема «Изучение механизмов биосинтеза и деградации специфических биологически активных белков и пептидов под действием ферментативного и неферментативного протеолиза тканей *Sus scofa* и *Bos* taurus и разработка на их основе специализированных пищевых продуктов» (2016 – 2020 гг.); № 19-76-10034, тема «Направленная *in vivo* модификация протеостаза продуктивных животных для создания инновационной технологии дието-терапевтического мясного продукта» (2019 – 2021 г).

Научная новизна исследования. Сформулирована стратегия, теоретически обоснован порядок выбора и комплексного постадийного изучения функциональных и специфических свойств продуктов, в равной степени эффективной при исследовании пищевых добавок, полупродуктов и продуктов, основанный на отборе, адаптации и апробации 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, дието-терапевтических и дието-профилактических продуктов питания; адаптировать и успешно применять 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 в биосовместимых носителях. Выявлены закономерности и характер высвобождения целевых веществ в условиях желудочно-кишечного тракта объекта, что позволяет управлять процессом адресности доставки и продолжительности 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 в практике Экспериментальной клиники 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 биокоррегирующего действия. Технические условия», учтены при разработке лабораторного регламента на производство Функционального мясного продукта/2018 и прошли апробацию на АО «Йошкар-Олинский мясокомбинат». Технология микрокапсулирования также 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 построена 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, полупродуктов и продуктов, математическая обработка экспериментальных данных и результатов, оценка возможных научных и практических стратегий, апробация предложенных решений на разработанных частных технологий продуктов.

На защиту выносятся следующие положения диссертации:

- 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 доставки до точки воздействия.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов подтверждается корректным использованием теоретических и экспериментальных средств и методик проведения исследований, обоснования и статистической обработке результатов. 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 и кормовых продуктов. Материалы диссертации проанализированы и обобщены лично автором. Вклад в работу других авторов отражен в публикациях по теме диссертации.

Результаты исследований доложены, обсуждены и получили одобрение на международных и всероссийских форумах, научно-практических конференциях и семинарах, проводимых в различных регионах РФ и за рубежом в разные годы: 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 Höklovy 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 В. М. Горбатова «Пищевые системы. Биобезопасность, технологии и инжиниринг» (Москва, 2020).

Прикладные разработки были отмечены золотой медалью «Всероссийского Смотра-конкурса лучших инновационных разработок» (4-5 июня 2013 г., г.Волгоград), за инновационные технологии конкурентноспособных функциональных мясных продуктов; благодарностью Комитета Государственной Думы по агарным вопросам за добросовестный труд и личный вклад в развитие научной деятельности в сфере АПК и мясной промышленности России.

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 – в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также 2 патента на изобретение, 1 Методические рекомендации и 1 Программа и методики.

Диссертационная работа оформлена в виде монографии на русском языке в одном томе, 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.

ГЛАВА 1. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Анализ научно-технической и методической литературы, а также других материалов проводился с использованием следующих российских и зарубежных электронных библиотек: Elibrary, КиберЛенинка, IEEE/ASPP, Wiley Online Library, PubMed, Freemedicaljournals, Государственная публичная научно-техническая библиотека России, система баз данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI), UniProt и др.

1.1. АЛИМЕНТАРНЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПУТИ ИХ КОРРЕКЦИИ

Значительное увеличение продолжительности жизни человека во многих странах, превышающее 80 лет, приводит к увеличению количества случаев хронических неинфекционных заболеваний (Greco E. A. et al., 2019; Confavreux C., 2008). Среди неинфекционных возраст-зависимых заболеваний сегодня отмечают сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), ожирение, сахарный диабет, рак, хронические респираторные заболевания, саркопения и остеопороз, неврологические расстройства. Данные заболевания зачастую имеют тяжелые клинические проявления и приводят к постепенному ухудшению состояния здоровья и качества жизни больных, вплоть до инвалидности и смертности, являясь тяжелой нагрузкой для системы здравоохранения и экономики (Landström E., 2007; Щеникова Н. В., 2007; Немсцверидзе Э. Я., 2012). Развитие и прогрессирование данных заболеваний обусловлено множеством факторов риска, среди которых малоподвижный образ жизни, чрезмерное употребление алкоголя и табака, загрязнение окружающей среды и, конечно же, питание, которое сегодня представляется важнейшим фактором, определяющим здоровье человека на протяжении всей его жизни (Eggersdorfer M., Walter P., 2011). Нарушения питания,

в особенности дисбаланс нутриентов, представляет собой главные детерминанты, способствующие развитию хронических заболеваний вследствие нарушения метаболического гомеостаза. В настоящее время ССЗ и ожирение рассматривается как результат общего дисбаланса между потреблением источников метаболической энергии и расхода энергии метаболизма. Установлено, что пищевое поведение человека – модели питания, количество и качество пищи, время приема пищи, пищевые предпочтения – является результатом сложного взаимодействия физиологических, психологических, социальных и генетических факторов (Rankinen T., Bouchard C., 2006; Ладодо К. С. с соавт., 2009; Grimm E. R., Steinle N. I., 2011; Чернуха И. М., Фокина А. И., 2019). Так, модели питания отдельных индивидуумов во многом обусловлены пищевыми предпочтениям популяции. К сожалению, сегодня происходит активное вытеснение традиционных рационов питания, присущих различным нациям, диетами, основанными, как правило, на продуктах животного происхождения с высоким содержанием «пустых калорий», рафинированных жиров и углеводов, а также алкоголя. Примером может служить «западная» диета, характеризующаяся высоким употреблением мяса, жирных молочных продуктов и очищенного зерна, влекущая за собой повышение биомаркеров крови развития ССЗ (инсулина – на 18 %, лептина – на 16 %, фолита меньше на 8 %), и, являющаяся существенным компонентом при развитии возраст-зависимых заболеваний, в частности сердечно-сосудистых (ССЗ) и новообразований (Fuhrman J., 2018).

Множество эпидемиологических исследований с широким выбором популяционных показателей и возможность проведения мета-анализа позволили накопить значительное количество фактов, указывающих на губительную роль современных продуктов питания и генетическую предрасположенность к «сладкому» и «жирному». Одновременно поддержание нормального уровня глюкозы в крови важно для предотвращения хронических заболеваний, таких как диабет 2 типа, сердечно-сосудистых заболеваний у людей с ожирением. Диабет 2 типа является одной из серьезных проблем здравоохранения. Питание играет

важную роль в контроле уровня глюкозы в крови и связанных с ним осложнений диабета (Thondre P. S., 2013).

Интересным представляется произошедшее за последние 30 лет резкое увеличение случаев диабета в Японии, Корее и Китае, сопряженного с низкой массой тела пациентов (в отличие от случаев в США, более чем в 80 % случаев сочетавшихся с ожирением). Не вызывает сомнения, что данная тенденция обусловлена накопительным эффектом употребления насыщенных жиров и сахара в составе фаст-фуда, помимо белого риса, традиционно присутствующего в рационе и также являющегося рафинированным продуктом с высоким гликемическим индексом. Известно также, что избыточное потребление калорийных продуктов, богатых насыщенными жирами и их трансизомерами, пищевым холестерином, способствует развитию гиперлипопротеинемии, дислипидемии, ожирению, и, в конечном итоге, атеросклерозу, который напрямую влияет на смертности от ССЗ. Особенно ярко продемонстрирована эта корреляция при дефиците в рационе источников полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) (Погожева А. В., Дербенева С. А., 2009; Khalil C. A., 2014). Установлено, что увеличение потребления в составе пищи экзогенного холестерина (ХС) в количестве 100 мг на 1000 ккал/сут вызывает повышение уровня общего холестерина в крови до 12 %. При этом показано, что снижение общего холестерина в сыворотке крови (ОХС) всего лишь на 1 % сопряжено со снижением риска развития атеросклероза на 2 – 5 % (Rudkowska I., 2007; Pogozheva A. V., 2010).

Сегодня степень ограничения ХС определяется наличием у пациента гиперлипопротеинемии или гиперлипидемии, а также ее типом. Так, по рекомендациям Национальной образовательной программы по холестерину, при умеренной гиперлипопротеинемии количество ХС в рационе не должно превышать 300 мг/сут, а при выраженной – 200 мг/сут. Кроме того, общее содержание жира в рационе питания пациентов с гиперлипопротеинемией должно составлять не более 20 % от общей калорийности рациона (45 – 55 г/сут), при этом ХС – не более 150 мг/сут. При этом доля насыщенных жирных кислот (НЖК) от общей калорийности

рациона должна составлять не более 10 %, доля мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) до 15 %, а полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) – 7 – 9 % (МР 2.3.1.2432-08). При этом известно, что МНЖК и ПНЖК могут позитивно влиять состояние здоровья и корректировать липидный обмен. МНЖК способны повышать скорость ферментативного катаболизма ОХС и липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП), а ПНЖК – снижению аппетита и массы тела, риска тромбообразования (Павлюк Н. Б., Шарафетдинов Х. Х., 2015).

Показано, что ненасыщенные жирные кислоты в составе диеты способны существенно изменить параметры тромбоцитарного гемостаза за счет снижения процессов окислительного метаболизма и липидного состава крови, и в частности, тромбоцитов. Данные эффекты особенно важны при терапии ишемической болезни сердца (ИБС) при наличии сопутствующего ожирения, у которых выявляются выраженная активация процессов внутриклеточного внутритромбоцитарного перекисного окисления липидов (ПОЛ), характеризующихся резким увеличением содержания шиффовых оснований и диеновых коньюгатов при одновременном снижении уровня α-токоферола в тромбоцитах. Стоит отметить, что выраженность процессов ПОЛ повышается и коррелирует с уровнем ОХС и возрастом больного. Установлено, что однократная пищевая нагрузка жиром, богатым насыщенными жирами животного происхождения резко активирует в тромбоцитах сосудистого русла процессы ПОЛ; тогда как однократная нагрузка жиром растительного происхождения приводит к выраженному угнетению ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной защиты (Гаврилова О. А., 2019).

Кроме того, комплекс ПНЖК семейства ω-3 оказывает иммуномодулирующее влияние на организм: у пациентов с атеросклерозом при введении в диету показано повышение уровня показателей клеточного иммунитета. В периферической крови больных ишемической болезнью сердца с нарушенной толерантностью к глюкозе число Т-лимфоцитов увеличивалось на 15 %, у страдающих ишемической болезнью сердца – на 26 %. Также выявлены изменения показателей гуморального иммунитета. Об этом свидетельствовало увеличение относительного содержания В-лимфоцитов в периферической крови больных до 13

% при коррекции уровня антител к адреналину, дофамину, макроглобулину, тромбину и антитромбину III (Гаппарова К. М., 2005).

Метаболиты ПНЖК семейства ω-3, особенно длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (ДЦПНЖК): докозагексаеновая, арахидоновая и эйкозатриеновая необходимы для синтеза биологически активных веществ – простагландинов, простациклинов, тромбоксанов и лейкотриенов, которые играют существенную роль в регуляции функций всего организма, способствуют нормальному развитию и адаптационным возможностям человека, обеспечивают поддержание оптимального уровня иммунной защиты, влияя на степень зрелости лимфоцитов периферической крови и продукцию цитокинов (Плотникова Е. Ю. с соавт., 2018). ДЦПНЖК регулируют сосудистый тонус, артериальное давление и активность нейронов посредством влияния на проницаемость и текучесть клеточных мембран, активность мембранносвязанных ферментов и транспортных белков, ионов и нейромедиаторов. Показано, что производные эйкозаноидов несут функцию нейротрансмиттеров: стимулируют нейро- и синаптогенез, поддерживая способность фактора роста нервов к стимуляции роста нервов (McCann J. C., Ames B. N., 2005; Боровик Т. Э. с соавт., 2012).

Фосфолипиды, представляющие собой минорные биологически активные вещества, поступающие с пищей в организм, регулируют проницаемость клеточных мембран, процессы активного транспорта органических веществ и ионов, а также обладают гипотензивным и гиполипидемическим действием (Эшгиниа С., Гаппаров М. М., 2006; Эшгиниа А., 2007).

Таким образом, жиры, их количество, качественный состав, а также содержание жироподобных веществ (в том числе фосфолипидов) в рационе оказывают существенное влияние на метаболизм липидов, в том числе процессы перекисного окисления, и центральные нервные регуляторные механизмы, играющую ведущую роль в патогенезе ССЗ.

Следующими после жира негативным алиментарным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний являются рафинированные углеводы.

Отмечается, что гиперинсулинемия при стабильных и длительных нарушениях углеводного обмена может стимулировать развитие гипертонии (Абасова Л. И., Дашдамиров Р. Л., Бахшалиев А. Б., 2011). Рафинированные углеводы, способствуют повышению уровней глюкозы, липопротеидов низкой и очень низкой плотности и триглицеридов в крови человека. При этом отмечено глобальное увеличение потребления углеводов в составе пищевого рациона современного человека (более 65 %), значительную часть которых составляют рафинированные углеводы. Сегодня алиментарная коррекция ССЗ, сахарного диабета и ожирения сопровождается оптимизаций углеводной части рациона (Тутельян В. В., Батурин А. К., Погожева А. В., 2011).

Противоречивые результаты получены в отношении исследования влияния потребления белка на здоровье человека. Получены данные, показывающие обратную зависимость между потреблением белка и артериальным давлением, обусловленным более высокой кислотной нагрузкой на организм при потреблении пищи, богатой животным белком (Zhang L., Curhan G. C, Forman J. P., 2009; Weir M. R., Anderson C. A. M., 2009).

В соответствии с современными представлениями средняя потребность взрослого здорового человека в белке составляет 80 – 90 г/сут (0,8 – 1,1 г на 1 кг массы тела). В условиях сбалансированного питания считается, что белки обеспечивают 10 – 15 % от общей калорийности рациона. При этом соотношение белков животного и растительного происхождения должно составлять 1:1 (Тутельян В. А., с соавт., 2003). В тоже время многие жители Российской Федерации традиционно потребляют избыточное количество белка (1,5 г на 1 кг массы тела в сут) при систематическом преобладании в рационе белков животного происхождения (Lunze K. et al., 2015). Интересно отметить тот факт, что в регионах с низкой распространенностью артериальной гипертензии население потребляет значительно больше продуктов животного происхождения. Примером могут служить популяции до настоящего времени не утратившие этно-традиционный характер питания, рационы которых состоят преимущественно из продуктов животного происхождения (Гаджиев Г. Э., 2002; Федулова Л. В., 2018).

В современной медицине достаточно глубоко изучены этиологические вопросы основных алиментарных аспектов развития социально-значимых заболеваний, ассоциированных с продолжительным дефицитом водо- и жирорастворимых витаминов. Кроме того, стоит отметить, что в научных исследованиях, выполненных до середины 1970 гг. влияние витаминов на гемостаз организма были описаны без учета их антиоксидантных свойств. Однако в настоящее время влияние витаминов на интегральные показатели гемостаза изучены недостаточно и, в первую очередь, это касается их влияния на интенсивность системы гемокоагуляции (Алборов Р. Г., 2005; Бышевский А. Ш., 2007; Шаповалова Е. М., 2010).

Отсутствие, дефицит или избыточные содержание в диетах и, в частности, пищевых продуктах, витаминов, обладающих антиоксидантными свойствами, модифицирует интенсивность процессов липидпероксидации в тромбоцитах, синтезирующих и депонирующих ряд молекулярных факторов, способных инициировать процессы гиперкоагулемии. Они резко ускоряют процессы внутрисосудистого свертывания крови и снижают способность клеток организма реагировать на воздействие тромбина и на факторы, ускоряющие тромбиногенез. Это оказывает крайне негативное влияние на состояние системной гемодинамики и ее регуляцию, является фактором риска развития тромбозов, усугубления ишемии органов и, в целом, негативно влияет на функционирование систем организма (Шаповалова Е. М., 2010).

В исследованиях *in vivo* показано, что отсутствие или резкий дефицит витаминов А, Е или В12 даже в сбалансированном по всем остальным нутриентам пищевом рационе пропорционально длительности его воздействия (от 2 до 12 нед.) резко снижает антиоксидантный потенциал и ускоряет процессы липидпероксидацию в тромбоцитах лабораторных животных, интенсифицируя тем самым процессы непрерывного внутрисосудистого свертывания крови с одновременным уменьшением толерантности к тромбину (Щепетева О. К., 2011). В тоже время присутствие в рационе витамина А, Е или В12 в количествах, эквивалентных лечебным дозам, достоверно замедляет липидпероксидацию,

уменьшает интенсивность свертывания крови резко ускоряет процесс фибринолиза. При различных возможных сочетаниях витаминов А, Е, В5, В12 и С (два, три, четыре и пять веществ в препарате при использовании доз эквивалентных лечебным) их влияние на толерантность к тромбину, интенсивность процессов липидпероксидации и фибринолиза будет являться результатом частичной суммации эффектов, вызываемых их отдельным введением. В сочетаниях витаминных препаратов, содержащих витамин С, полнота суммации их действия значительно ниже из-за прооксидантной активности высоких доз аскорбата. При уменьшении дозы витамина С в составе поликомпонентного сочетания, состоящего из пяти витаминов, усиливается их терапевтическое влияние на толерантность к тромбину в среднем на 34,5 % (Шаповалова Е. М., 2010).

Установлено, что витамин С и каротин, снижая количество свободных радикалов, предотвращают окислительное повреждение ДНК. Дефицит фолиевой кислоты может провоцировать злокачественную трансформацию нормальных клеток путем изменения экспрессии генов и ослабления хромосомной структуры. Интенсивность процессов внутрисосудистого свертывания крови при А- и Е-авитаминного или дефицитарного рациона, или при избытке этих витаминов в пищевом рационе тесно ассоциирована с изменением толерантности к тромбину, и значительно менее выражена в случае В12-, В5- или С-авитаминном питания, а также в случае питания продуктами дефицитными либо содержащим избыток указанных витаминов. Вместе с тем, результаты проведенных экспериментальных и клинических исследований позволили оценить характер влияния дефицита или дополнительного введения витамина В12 (кобаламина) на гемостаз и отдельные его компоненты. В количестве, превышающем в 2 раза суточную потребность, кобаламин не только предупреждает развитие коагуляционных расстройств, но и повышает активность тромбоцитов, что особенно отчетливо проявляется при направленном увеличении дозы витаминного препарата в 4, 6 и 12 раз (Зверева И. В., 2008).

Дефицитарность пищевого рациона по витамину В5 резко замедляет высвобождение факторов гемогоагуляции (Р3, Р4), что соответственно снижает

активность непрерывных процессов внутрисосудистого свертывания крови, фибринолитическую активность и толерантность к тромбину. Однако при наличии в диете витамина B5 в количестве, превышающем суточную потребность в два раза – предупреждают их и ускоряют фибринолиз, достоверно замедляя процессы непрерывного внутрисосудистого свертывания крови, повышая при этом толерантность к тромбину. Внутривенное введение витамина B5 в дозах, эквивалентных лечебным, сопровождается фазной реакцией кратковременной гиперкоагуляции, повышением коагуляционной готовности тромбоцитов, ускорением непрерывного свертывания крови с последующим ускорением фибринолиза и вторичной гипокоагуляцией. Лишение или удаление из рациона животных витамина C вызывает ускоренные процессы липидпероксидации, увеличивает коагулоактивность тромбоцитов в среднем (на 15 – 25 %), интенсифицирует процессы непрерывного внутрисосудистого свертывания крови, сменяющееся последующим его замедлением. В количествах, составляющих часть суточной потребности, витамин C резко ограничивает эти сдвиги, а 2-кратный избыток витамина предупреждает их появление. Используемая в лечебных дозах аскорбиновая кислота дозозависимо снижает антиоксидантный потенциал крови, ускоряя процессы липидпероксидации и внутрисосудистого свертывания крови, реакции фибринолиза. Если в малых дозах витамин C отчетливо действует на тромбоциты как антиоксидант, то в больших и при длительных сроках введения – 8 нед. и более – оказывает прооксидантное действие, что повышает коагулоактивность клеток крови и ткани (Зверева И. В., 2008; Шаповалова Е. М., 2010).

Установлено, что витамины A, C, E и бета-каротин, действующие как антиоксиданты, снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний, взаимодействуя со свободными радикалами и предотвращая окислительное повреждение липопротеинов низкой плотности (Fortmann S. P., Burda B. U., Senger C. A., 2019). При этом дефицитарность или избыток витамина D связывают с возникновением ишемической болезни сердца, сердечной недостаточности и фибрилляции предсердий (Bronzato. S., Durante. A., 2018).

Таким образом, доказано позитивное влияние отдельных витаминов и их компонентов при обменных нарушениях, протекающих с признаками гипероксидации. Особенно эффективными оказалось влияние витаминов, обладающих выраженными антиоксидантными свойствами (Бышевский А. Ш., 2003; Мищенко В. П., 2005; Галян С. Л., 2006). Однако в настоящее время USPSTF (Рабочая группа по профилактике заболеваний в США) не рекомендует использовать поливитамины для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний (Sunkara A., Raizner A., 2019).

Выше представленные данные свидетельствуют о необходимости углубленного изучения роли и связи между алиментарно-витаминной обеспеченностью организма и гемостазом. При этом значительное внимание, по мнению автора, необходимо уделить изучению развития комбинированных гиповитаминозов, характерных для многих заболеваний и гипервитаминозов, обусловленных повсеместным употреблением пищевых добавок без назначения врача. Среди микроэлементов, коррелирующих с развитием возраст-зависимых заболеваний, важно отметить натрий, магний, калий (Spano M., 2012).

В многочисленных экспериментальных, клинических и эпидемиологических исследованиях выявлена корреляция повышенного потребления поваренной соли и уровня артериального давления (Graudal N., et al., 2014). Кроме того, установлено, что соль способствует пассивному чрезмерному потреблению жирной пищи (Bolhuis D. P., et al., 2016).

Хлористый натрий в растворенном состоянии, представляющий собой катион натрия и анион хлора, является неотъемлемой частью гомеостаза в качестве основных компонентов сыворотки крови и лимфы (поддерживает ее pH за счет ионов натрия) и участвует в образовании соляной кислоты желудка в виде ионов хлора. На ранних стадиях развития человечества потребление хлористого натрия составляло порядка 1,8 г и основным источником соли являлась мясная пища, добываемая во время охоты (78,2 % от общего потребления). В связи с этим, сегодня реальная потребность человека в поваренной соли определяется на уровне 2 г/сут. По данным Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов

(EFSA), примерно 75 % соли, которую мы едим, уже содержится в пищевых продуктах (Elias M., et al., 2019). При этом отмечено, что развитие пищевой промышленности и ресторанных сетей еды быстрого приготовления фактически удвоило потребление поваренной соли в течение последних десятилетий (Драпкина О. М., Шепель Р. Н., 2015).

В настоящее время среднее потребление хлористого натрия в индустриально развитых странах достигает 12 г/ сут у взрослых и 6 – 7 г/ сут у детей. В одном долгосрочном исследовании, проводимом в период с 1984 по 2008 гг. в 33 странах (n=19; 151 человек), установлено, что средний уровень потребления соли в мире составляет 9,47 г/сут. Одновременно с этим отмечена вариабельность количества потребляемой соли в разных регионах мира: от минимальной – 0,01 г/сут (индейцы Yanomamo в Бразилии) до 14,16 г/сут (жители Тянджина в Китае). В странах Европейского союза потребление соли составляет от 6,02 г/сут (Нидерланды) до 10,7 г/сут натрия хлорида (Италия) (Brown I. J., 2009). По данным исследования 2013 года, у жителей РФ разных регионов потребление соли здоровыми лицами составляло от 10,8 г/сут (Тверь) до 11,15 г/сут (Москва) (Драпкина О. М., Шепель Р. Н., 2015).

Негативная роль поваренной соли выявлена не только в отношении потребления большего количества жирной пищи. Установлена связь между скоростью укорочения теломер лейкоцитов маркерами старения клеток и высоким потреблением хлористого натрия на фоне избыточного веса (Бекмурзинова Ф. К., с соавт., 2020). Однако имеют место быть опубликованные результаты клинических исследований, свидетельствующих не только об отсутствии эффекта низкосолевой диеты, но и выявлении рисков для здоровья у лиц с ограниченным потреблением соли (Geleijnse J. M., et al., 2007). Стоит упомянуть, что влияние натрия на артериальное давление варьируется и у людей, чувствительных к соли, имеет тенденцию усиливаться с возрастом. Показано, что снижение натрия в рационе снижает артериальное давление на 3,5 % (Graudal N. A., et al., 2011).

Несмотря на противоречивость результатов исследований, которую объясняют генетической гетерогенностью исследуемых популяций и их

исторической приспособленностью или отсутствием таковой к имеющимся в настоящее время пищевым пристрастиям, стратегия снижения потребления соли с целью коррекции ССЗ широко применятся на индивидуальном, региональном, этническом и государственном уровнях (Драпкина О. М., Шепель Р. Н., 2015).

Выявлено, что низкие уровни магния в сыворотке крови способствуют развитию гипертонии, атеросклероза и острого тромбоза, которые приводят к развитию ишемической болезни сердца. При этом магний позитивно влияет на сердечный ритм и снижает артериальное давление. Потребление калия с пищей связывают с дозозависимым снижением артериального давления. При этом отмечено, что увеличение потребления калия с пищей более эффективно при высоком содержании в диете натрия (Houston M. C., 2011). Также метаанализ 11 исследований позволил установить положительную корреляцию потребления высоких уровней калия и снижением риска инсульта на 21 % при тенденции к снижению риска ИБС (D'Elia L. et al., 2011).

Роль микронутриентов в регуляции гомеостаза достаточно широко изучена. При этом необходимо учитывать вклад каждого отдельного микронутриента. Так, обнаружено, что употребление дополнительного кальция снижает поглощение железа и цинка, а избыточное потребление марганца может снижать доступность железа. Цинк выполняет несколько функций в организме, начиная от анаболических до катаболических и заканчивая антиоксидантными. Кроме того, цинк и некоторые другие минералы встречаются в качестве основных компонентов металлоферментов. Марганец, в свою очередь, участвует в активации металлоферментов, которые способствуют метаболизму углеводов, липидов и аминокислот (Mwangi S., et al., 2019), а также является важным компонентом супероксиддисмутазы (Mn-SOD), которая защищает клетки от окислительного стресса (Holley A. K. et al., 2011).

Таким образом, среди основных алиментарных факторов риска, вызывающих краткосрочные или отдаленные последствия на любой стадии жизни индивидуума и приводящих к развитию нарушений гомеостаза, выделяют высокалорийные, рафинированные продукты, избыточное потребление насыщенных жирных кислот,

поваренной соли, дефицита микронутриентов, в особенности, ионов калия и магния, витаминов (Лифляндский В. Г, 2011; Fan J. et al., 2012).

Основными рекомендациями ФАО ВОЗ в области здорового питания являются сокращение суммарного потребления жиров и свободных сахаров до менее чем 30 % и до менее чем 10 % от суммарной энергии. При этом ограничение употребления соли должно составлять менее чем 5 г в день. Признанным оптимальным соотношением НЖК:МНЖК:ПНЖК в диетотерапевтических продуктах для обеспечения терапевтической эффективности должно составлять 1:1:1 (Погожева А. В., 2009; Европейские рекомендации по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний в клинической практике, 2008). При этом необходимо учитывать, что увеличение количества ПНЖК в рационе более чем на 10 % нецелесообразно в связи с повышением риска активации перекисного окисления липидов в тканях организма (Кочеткова А. А. с соавт., 2016). При этом отмечено, что соотношение линолевой и α-линоленовой кислот в диете 4:1 обладает наибольшим эффектом по сравнению с 6:1 до 3:1 (Yehuda S., Rabinovitz S., Mostofsky D. I., 2005).

В соответствии с документом «Кардиоваскулярная профилактика 2017. Российские национальные рекомендации» сбалансированным считается тот рацион, калорийность которого обеспечивается 10 – 15 % белками, 20 – 30 % жирами и 55 – 70 % углеводами. При этом оптимальным считается поступление в организм углеводов в количестве 50 – 55% от общей калорийности диеты, из которых 10 % должны являться простыми (Тутельян В. В., 2011).

Оптимальное количество соли соответствует 2,57 – 1,93 г/сут. В соответствии с проведенными исследованиями придерживание данной рекомендации в течение 10 – 15 лет позволит снизить риск заболевания ССЗ до 30 % ($p=0,044$ и $p=0,018$ соответственно), а риск общей смертности до 20 % ($p=0,35$ и $p=0,34$ соответственно) (Geleijnse J. M., et al., 2007; WHO. Guideline: Sodium intake for adults and children, 2012).

Данные рекомендации являются обоснованными, но необходимо учитывать индивидуальные особенности усвоения отдельных видов нутриентов индивидуумом.

Разработка новых стратегий алиментарной регуляции здоровья человека с целью предотвращения развития заболеваемости или более эффективного лечения пациентов, в том числе разработка технологий отечественных продуктов функциональной и специализированной направленности является весьма актуальной задачей развития и практического становления концепции здорового питания в России и во всем мире.

В качестве основных предпосылок практической реализации воплощения этой идеи следует указать на работы ученых, посвященные теоретическим и практическим вопросам разработки функциональных продуктов питания, обладающих профилактическими и терапевтическими эффектами при возраст-зависимых заболеваниях. Детальный анализ данного вопроса приведен в следующем разделе литературного обзора данного диссертационного исследования.

1.2. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ РАЗРАБОТКИ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ И ПРАКТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ПОИСКА И ВНЕДРЕНИЯ ПРОДУКТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИМ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЯМИ

В последние годы происходит переориентирование науки о питании в сторону разработки функциональных и специализированных продуктов, направленных на предотвращение риска и коррекцию различных заболеваний. Традиционная диететика, ориентированная на профилактику заболеваний, связанных с недостатки основных питательных веществ уступает место современной нутрициологии, сосредоточенной на профилактике хронических заболеваний, особенно ССЗ и рака, а также питания матери и ребенка и геронтологических пациентов (Хорошилов И.Е., 2009).

Функциональные и специализированные продукты, направленные на профилактику и коррекцию различных патологических состояний, являются вызовом для традиционных дието-терапевтических продуктов, представляющих собой смесь питательных веществ и, в первую очередь, адресованных в качестве терапии тяжелой острой недостаточности питания и профилактики медикаментозной терапии. Основными ингредиентами таких композиций являются сухое молоко, растительные масла, простые углеводы, смесь витаминов, солей и минералов (Santini A., 2013). Лечебно-профилактическое питание в РФ ограничено использованием шести лечебно-профилактических рационов, молока, кисломолочных продуктов, пектина и витаминных препаратов. Традиционное лечебно-профилактическое питание направлено преимущественно на предупреждение неблагоприятного воздействия химических, физических и биологических факторов на организм человека, а также преследует цель укрепления здоровья, предупреждения развития профессиональных заболеваний. Так, в диететику включены четыре основные направления специфического питания: в первую очередь, это восстановительное питание для хронически больных, онкологических и оперированных пациентов; достаточно развитое заместительное питание для больных с ферментопатиями органов желудочно-кишечного тракта (системная энзимотерапия); рациональная диетотерапия и практически не представленное в РФ функциональное и заместительное питание (Хорошилов И.Е., 2009).

Разрабатываемые продукты нового поколения дието-терапевтической направленности могут потенциально взаимодействовать с лекарственными средствами, изменяя их терапевтический эффект, например, оказывать действие на метаболизм препаратов или влияния на физиологические функции пациента. Предварительно оценивая многие виды взаимодействий лекарственных препаратов и функциональных продуктов питания, возникает потенциальная возможность влиять на исход заболевания (Boullata J. I., 2013).

В настоящее время продукты питания, напитки и добавки в равной степени вносят около 33 % на общий мировой рынок нутрицевтики со среднегодовым

темпом роста в 7,4 % (Mishra H. N., 2011). На мировом рынке пищевой продукции сегодня представлены традиционные и нетрадиционные продукты. К традиционным нутрицевтикам можно отнести продукты питания с новой информацией о потенциальных функциональных эффектах на здоровье потребителя. В большинство из них не внесены какие-либо химико-технологические изменения (фрукты, овощи, злаки, рыба, молочные и мясные продукты). Например, ликопин в томатах, омега-3 жирные кислоты в лососе или сапонины сои (Mishra H. N., 2011).

Однако нетрадиционные нутрицевтики созданы в результате прогресса биотехнологии и сельского хозяйства (генетической модификации), обогащения продуктов питательными веществами и/или ингредиентами (витаминами, минералами, пищевыми волокнами, жирными кислотами, пептидами и прочими физиологически активными веществами) (Lee Y.K., 2000).

Значительное влияние на развитие науки о питании оказали молекулярно-генетические исследования (Ferguson L. R., 2009). Современная нутриогеномика включает в себя практически все известные аспекты науки, начиная от геномики человека, растений и микроорганизмов, на самом высоком уровне изучает технологию пищевых продуктов, а также поведение и фенотипические признаки человека. Одной из главных особенностей, имеющих отношение к нутригеномике является полиморфизм генов. Эти генетические изменения могут привести к изменениям всасывания, метаболизма и ответа организма на биологически активные компоненты, содержащихся в продуктах питания, что учитывается в исследованиях (Barnes S., 2008).

Разработка продуктов питания в концепции нутриогеномики невозможна без прогнозирования взаимодействия продуктов питания и пищевых добавок с геномом человека, его влияния на потребности питания. Основная идея нутригеномики заключается в том, что диетические рекомендации для одного человека могут не подходить для другого. В связи с чем сегодня приобретает популярность идея индивидуального питания для отдельных лиц или, на худой

конец, групп населения. Это может стать важнейшим шагом в борьбе с болезнями и связанных с ними затрат на здравоохранение.

Масштабное увеличение знаний о роли физиологически активных компонентов пищи, как из растительного, так и животного сырья, повлекло за собой изменение роли диеты в области здравоохранения. Концепция функционального продукта продвинулась за пределы лечения синдрома дефицитов нутриентов к снижению риска заболеваний. Эта позиция рассматривает определение функциональных продуктов питания, их регулирование и научные данные, подтверждающие эту новую область продовольствия и питания. Продукты больше не могут оцениваться лишь с точки зрения пластичного материала – содержания макро- и микроэлементов (Hasler C. M., 2004). Многочисленные исследования, доказывающие физиологические эффекты отдельных нутриентов и ингредиентов, среди которых сегодня выделяют ПНЖК, соевый белок, растительные стеролы и станолы, пищевые волокна, витамины, минералы, пребиотики, пробиотики, включены в различные национальные программы и рекомендации (Hasler C. M.,2002; Arihara K., 2014).

В Таблице 1 представлены наиболее распространенные функциональные ингредиенты, обладающие доказанным функциональным эффектом на здоровье потребителей. В таблице «+++» обозначает, что в значительном количестве исследований получены убедительные доказательства; «++» — что получены значительные доказательства позитивного эффекта при применении данного ингредиента; «+» свидетельствуето том, что в большей части исследований получены доказательства позитивного эффекта; «+–» — требуются дополнительные исследования.

Таблица 1. Некоторые функционально активные ингредиенты с доказанной эффективностью

Ингредиент	Физиологический эффект	Доказанность	Норма введения в рацион, г\сут	Ссылка
Эфиры растительных стеролов и станолов	Снижение общего холестерина и холестерина ЛПНП	+++	1,3 для стеринов 1,7 для станолов	Tu T. Nguyen, 1999
Растворимые пищевые волокна	Снижение общего холестерина и холестерина ЛПНП; Улучшение функции кишечника	++	1	Gibson G. R., Roberfroid M. B., 1995; Mohebi-Nejad A., Bikdeli B., 2014
Соевый белок	Снижение абсорбции общего холестерина и холестерина ЛПНП	+++	25	Greaves K. A. et al., 2000
β-глюкан	Снижение всасывания общего холестерина и холестерина ЛПНП	+++	3	Wang Y., et al., 2018
(ω-3) жирные кислоты	Снижение уровня триглицеридов; Снижение смертности от ССЗ и инфаркта миокарда	++	0,4 – 0,6	Bucher H. C. et al., 2002
Сероорганические соединения	Снижение общего холестерина и холестерина ЛПНП	+	0,6 – 0,9	Silagy C. A., Neil H. A., 1994
Пептиды	Всасывание микроэлементов; Снижение уровня артериального давления; Снижение уровня холестерина; Снижение уровня триацилглицерина	+	Не установлена	Möller N. P. et al., 2008
Ликопин	Снижение риска многих видов рака; Защита клеток от повреждения свободными радикалами; Профилактика сердечно-сосудистых заболеваний	+	Не установлена	Rao A. V., Agarwal S., 2000; Zeng Y. W. et al., 2013
Коньюгированная линолевая кислота	Уменьшение риска рака груди; Снижение степени ожирения	+-	2,7 – 3 г активных изомеров/сут	Bogdanov A. R., Zeigarnik M., Kaganov B. S., 2012
Глюкозинолаты, индолы	Снижение риска некоторых видов рака	+-	Не установлена	Higdon J. V. et al., 2007
Пробиотики	Поддерживает здоровье желудочно-кишечного тракта, повышает иммунитет	+-	Не установлена	Yan F., Polk D. B., 2011 Barouei J., 2009
Лютеин	Защита от повреждения клеток свободными радикалами	+	Не установлена	Boehm F., Edge R., Truscott T., 2020
Лактулоза	Улучшение функции кишечника; Детоксикация	+	Не установлена	Pranami, D. et al., 2017
Полифенолы	Снижает уровень сахара в крови; Антибактериальная активность	+	0,01 – 0,2	Aryaeian N. et al., 2017; Aman S., 2013

В Таблице 1 рассмотрены лишь некоторые ингредиенты с доказанной эффективностью. Однако автор предполагает, что данный перечень будет увеличиваться с каждым годом.

Так, например, в качестве будущих кандидатов стоит указать серосодержащие аминокислоты (цистеин, метионин и богатые ими пептиды) и глутаминовую кислоту. Имеются данные о том, что данные аминокислоты стимулируют образование легкорастворимых и быстровыделяющихся соединений, влияют на образование иммуноглобулинов. Глутаминовая кислота обладает противофиброзным эффектом. Некоторые природные биологически активные пептиды (например, из сырья морской фауны, молочного и мясного сырья) могут оказывать широкий спектр биологических эффектов. Из-за их терапевтического потенциала для лечения или профилактики различных заболеваний, биологически активные пептиды в ближайшем будущем могут быть использованы в качестве функциональных пищевых ингредиентов, пищевых добавок или фармацевтических препаратов (Nasri R., Nasri M., 2013; Kotenkova E., Chernukha I., 2019; Chernukha I. M., et al., 2020).

Таким образом, можно заключить, что в качестве сырья для функциональных продуктов рассматриваются не только полноценные продукты, но и продукты их технологической обработки. Например, с целью получения сырья, обогащенного рамнозой и лигнином, в технологическую обработку запускают кожуру некоторых фруктов (например, манго) (de Lourdes García-Magaña M., 2013).

В разработке специфических продуктов питания преимущественно используются физико-химические свойства компонентов сырья, в том числе биологически активных.

Одновременно с этим в лечебно-профилактическом питании подлежат ограничению жирные продукты, особенно насыщенных высших жирных кислот и сахаров.

Технология функциональных и специализированных продуктов питания включает традиционные этапы производства, обеспечивающие их безопасность и

качество, а также определенный срок годности. Одним из важных этапов стоит отметить термическую обработку, которая может применяться для повышения биодоступности питательных веществ, получения желаемых органолептических показателей (аромат и цвет, в т.ч. реакция Майяра), инактивацию под действием температуры микроорганизмов, токсинов и ферментов (например, стерилизация консервов, бланшировка овощей для инактивации ферментов). Однако на данном этапе необходимо учитывать как изменение структуры пищи (изменение текстуры из-за модификации ингредиентов или процессов сушки), так и возможную денатурацию белка, модификацию углеводов и крахмалов. Как и следовало ожидать, режимы термообработки, а также другие основные виды технологической обработки пищевых продуктов, часто приводят к потере биоактивности природных ингредиентов. Таким образом, при рассмотрении аспектов разработки продуктов функционального и специализированного питания необходимо понимать структуру нутриентов и характеристики продукта, поскольку структура в первую очередь определяет поведение пищи в желудочно-кишечном тракте человека (Davis E. A., Gordon J., 1982).

Проблема в разработке функциональных и специализированных продуктов заключается в поддержании традиционных и желаемых потребителем сенсорных характеристик (особенно вкуса и текстуры) при сохранении функциональности добавленных активных компонентов. Целевая группа потребителей и их потребительские привычки должны быть приняты во внимание, продукт должен соответствовать требованиям потребителя, чтобы добиться положительного отклика рынка. Если удалось получить продукт с удовлетворительным внешним видом, то следующим важным этапом является обеспечение функциональности. Сегодня для изучения функциональных эффектов и биодоступности биологически активных соединений применяют как методы *in siliko* – математические модели, так и методы *in vitro* и *in vivo* (на животных и людях), включая механизмы высвобождения и метаболизма, чтобы отслеживать и прогнозировать функциональность ингредиентов (Ottino J. M., 2005).

Интересно отметить новый тренд в разработке функциональных ингредиентов и пищевых продуктов, в том числе обогащенных пищевыми добавками – капсулирование. Метод микрокапсулирования применяется как для определенных ингредиентов для защиты от внешних воздействий (например, кислорода), реакции с другими ингредиентами, так и для нивелирования нежелательного привкуса ингредиента. Кроме того, инкапсулированные ингредиенты в сухой или жидкой форме (например, твердые сухие порошки или структурированные эмульсии) легко могут быть добавляться в продукты питания во время большинства технологических процессов, обеспечивая однородное распределение в продукте. Еще одно технологическое преимущество капсулирования – возможность отсроченного или контролируемого высвобождения ингредиента из капсулы, который может быть активирован различными способами (например, временем, давлением, температура, pH, активность воды, физическая сила/жевание, ферменты и т. д.). Микрокапсулирование – современная технология для преодоления технологических проблем, связанная с добавлением биоактивных ингредиентов (особенно в минимальных дозах) в пищевые продукты (de Vos et al., 2010).

Таким образом, лечебно-профилактическое питание является перспективным направлением нутрициологии и рассматривается в качестве дополнительной стратегии в медикаментозном лечении больных и профилактике различных заболеваний, в первую очередь ССЗ и рака. Данное направление является перспективным и нуждается в дальнейшем усовершенствовании функциональных и специализированных продуктов со специфическим направленным действием.

ГЛАВА 2. ОБОСНОВАНИЕ НАПРАВЛЕНИЙ ИССЛЕДОВАНИЙ, ИХ ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ

Изучение научно-технической и патентной информации свидетельствует о накоплении значительного объема результатов исследований влияния на здоровье людей нутриентов, пищевых продуктов и ингредиентов.

Сегодня одной из важнейших задач является обратить вспять тенденцию к большому потреблению менее здоровой пищи за счет более здоровых и экологически устойчивых диет. Растущее признание того, что у каждого человека есть особые потребности в зависимости от возраста, метаболического состояния и генетического профиля, усложняет эту задачу.

Перспективным, по мнению автора, является повышение интереса и потребительского спроса на обогащенные продукты. Продукты питания будущего, обогащенные биоактивными компонентами, могут не только улучшить и поддержать баланс нутриентов, снизить риск развития заболеваний, но и использоваться в качестве дополнения для улучшения медикаментозной терапии.

При этом эффективная стратегия разработки биоактивных веществ, нутрицевтиков и функциональных и специализированных продуктов питания требует глубокого понимания сложных физико-химических процессов, происходящих в пищевой матрице, не только на стадии производства, но и в процессе переваривания, для обеспечения биодоступности и стабильности ценных биоактивных соединений.

Необходима разработка новых технологий и стратегий исследования пищевых продуктов, включая понимание взаимосвязи между высвобождением и биологическим эффектом биоактивных веществ.

Среди современных технологических подходов, с точки зрения обогащенных биоактивными веществами продуктов, особенно актуальным, по мнению автора, является разработка микрокапсулирования биологически активных соединений для удовлетворения конкретных потребностей, индивидуальное (персонализированное) питание, поиск физико-химических параметров обработки

продуктов для сохранения активности БАВ или повышения их эффективности и экологически безопасная упаковка.

Учитывая актуальность дальнейшего развития рынка новых видов функциональных и специализированных продуктов, прогресс которого не может быть достигнут без обширных научных исследований, разработка стандартизированного комплексного подхода к исследованию биобезопасности, эффективности и биодоступности специализированных и функциональных продуктов питания. Проведение глобальных фундаментальных и прикладных исследований, направленных на всестороннее изучение механизмов действия известных питательных веществ и биоактивных ингредиентов, а также поиск новых соединений и разработка с их использованием продуктов питания будет способствовать повышению осведомленности потребителей об эффективности и безопасности пищевых добавок, функциональных и специализированных продуктов.

Учитывая ежегодное расширение ассортимента специализированных и функциональных продуктов питания, увеличение количества природных биоактивных соединений из растительных, микробиальных и животных источников, основным направлением исследований диссертационной работы является научное обоснование методов исследований и разработка процедуры комплексного постадийного исследования на моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* эффективности и биобезопасности пищевых продуктов функционального и специализированного действия с последующей практической реализацией на примере частных технологий пищевых продуктов.

Таким образом, **целью диссертационной работы** является 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 апробацией на примере технологий обогащения их биоактивными веществами природного происхождения.

Для достижения поставленной цели были определены следующие основные задачи исследований:

- научное обосновать стратегии разработки эффективных биологически активных веществ, функциональных и специализированных пищевых продуктов, включая подходы к извлечению, сохранению и таргетной доставки целевых соединений;

- провести сравнительный анализ современных методов оценки качества, безопасности и свойств функциональных пищевых продуктов и ингредиентов, а также специализированных продуктов питания на основе биологически активных веществ природного происхождения;

- адаптировать и экспериментально обосновать эффективность методики *in vitro, ex vivo* и *in vivo* для изучения специфической активности и молекулярно-биологических механизмов действия биологически активных ингредиентов, специализированных и функциональных пищевых продуктов;

- разработать алгоритм и общие принципы выбора оптимальной процедуры исследования специфического действия биоактивных веществ, функциональных и специализированных пищевых продуктов на их основе;

- на основе современных биотехнологических знаний оптимизировать пути повышения эффективности функциональных и специализированных пищевых продуктов;

- разработать частные технологии обогащенного специализированного пищевого продукта со специфической активностью;

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

- провести опытно-промышленную апробацию технологий и методов подтверждения специфической активности пищевых продуктов.

ГЛАВА 3. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ: СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ, АППАРАТУРНОЕ ОСНАЩЕНИЕ

3.1 СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЙ И ЕЕ РЕАЛИЗАЦИЯ

Все теоретические и экспериментальные исследования проведены в соответствии с поставленными задачами в ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Общая схема проведения эксперимента приведена на рисунке 1.

Рисунок 1 – Организационно иерархическая структура диссертационной работы

На первом этапе был осуществлен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы о роли алиментарных факторов риска в развитии социально-значимых заболеваний, рассмотрены пути их коррекции с помощью функциональных (ФП) и специализированных продуктов (СП), а также

биоактивных веществ – функциональных ингредиентов (ФИ) животного и растительного происхождения. Сформированы методологические принципы разработки высокоэффективных биотехнологических пищевых продуктов, оценки их качества, безопасности и эффективности.

В задачу второго этапа входило научное обоснование разработки функциональных капсулированных добавок и специализированного мясного продукта питания (СМП). Рассмотрены технологии сохранения и таргетированной доставки биоактивных белковых соединений животного происхождения, а также обогащение ими пищевых продуктов. Предложены частные технологии капсулированной функционального ингредиента и обогащенного мясного специализированного продукта. На третьем этапе проведено теоретическое и экспериментальное обоснование методов *in vitro, ex vivo* и *in vivo*, использование которых возможно для изучения пищевых продуктов и ингредиентов, в том числе их биологической активности и эффективности. В результате выполнения данного этапа сформулирован алгоритм комплексной оценки биологически активных веществ, функциональных и специализированных продуктов.

Четвертый этап заключался в апробации разработанного алгоритма на функциональных и специализированных пищевых (на примере мясных) продуктов, функциональных ингредиентах – биоактивных веществах животного и растительного происхождения. Научно обоснована эффективность разрабатываемого специализированного продукта.

Пятый этап заключался в разработке частных технологий капсулированного функционального ингреждиента и мясных специализированных продуктов направленного действия, изучению их биокорригирующих свойств и расчёту экономической эффективности разработанных продуктов.

3.2 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основными объектами исследований на различных этапах работы являлись:

1) специализированные мясные продукты – консервы мясные стерилизованные фаршевые биокоррегирующего действия:

СМП_1 – мясной продукт из свиных сердец и аорт, разработанный Котенковой Е.А. (2015), выработанный на ЗАО «Йошкар-Олинский мясокомбинат», содержащий белка – 17,53±0,95%, жира – 3,82 ± 0,13%, хлорида натрия – 0,305 ± 0,015%, крахмала – 2,35±0,25%. Основное назначение – снижение риска развития и последствий гиперлипидемии и атеросклероза;

СМП_2 – мясной продукт из прижизненно-модифицированного мясного сырья, полученного от свиней реконвалесцентов, разработанный автором (Федулова Л.В., 2011), для снижения риска развития и последствий цереброваскулярной патологии;

СМП_2ф – СМП_2, обогащенный белковым гидролизатом БАВ_1, для диетотерапии патологий центральной и периферической нервной системы;

2) функциональные ингредиенты животного происхождения:

БАВ_1 – белковый гидролизат HCP-P-150 (Proliver, Бельгия), представляет собой смесь высоко- и низкомолекулярных полипептидных фракций, полученных при гидролизе белка сельскохозяйственной птицы (кур);

БАВ_2 – белково-пептидный комплекс иммунных органов свиней, полученный путем водно-солевой экстракцией (0,9% натрия хлорида) на основе воды с модифицированным изотопным составом по технологии, описанной Василевской Е.Р. (2019);

функциональный капсулированный ингредиент – кальций-альгинатные капсулы с включенными в них БАВ_2, лиофильно высушенные;

3) функциональные ингредиенты растительного происхождения:

ягоды годжи – высушенные, различного географического происхождения – *Lycium barbarum* (LB), полученные из Академии сельскохозяйственных наук Чжэньцзян (Ханчжоу, Китай) и *Lycium chinense* (LC), полученные из Алматинского технологического университета (Алма-Ата, Республика Казахстан);

биомасса клеток (DDW) – биомасса клеток, лиофильно высушенная, полученная биотехнологическим способом клеточная биомасса диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea Wall* /DDW), полученная из Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН.

4) нутриентный состав рационов – стандартные полнорационные концентрированные сухие комбикорма (Лабораторкорм, Россия; Sniff, Германия); полусинтетические рационы с варьированием содержания нутриентов – коммерческие (ResearchDiets, США) и разработанные аналоги, составленные из отечественных ингредиентов;

5) биотест–системы – культуры клеток (стандартизированные и первичные), эксплантаты куриных эмбрионов, крысы стока Wistar, мыши BALB/c и C57BL/6, морские свинки и свиньи.

Также 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-высушенный экстракт вилочковой железы крупного рогатого скота.

На этапах экспериментального обоснования методик использован молочный продукт, полученный с применением фермента – трансглутаминазы, по Зобковой З.С. (2017).

Нутриентный состав рационов

В экспериментах использованы стандартные полнорационные концентрированные сухие комбикорма (Лабораторкорм, Россия; Sniff, Германия), питательная ценность рациона V 1534-000 Sniff, далее упоминающегося как KD, представлен в Таблице 2, амнокислотный и жирнокислотный состав в Таблице 3.

Таблица 2. Питательная ценность комбикорма Sniff V 1534-000

Наименование	Содержание, %	Наименование	Содержание, в кг
Макронутриенты		**Витамины**	
Сырой протеин	19,00	Витамин А	25 000 ЕД
Сырой жир	3,30	Витамин D_3	1 500 ЕД
Сырая клетчатка, вкл:	4,90	Витамин Е	135 мг
нейтрально детергентную (NDF)	17,2	Тиамин (B_1)	86 мг
/гемицеллюлоза, целлюлоза и лигнин/		Рибофлавин (B_2)	32 мг
		Пиридоксин (B_6)	31 мг
кислотно детергентная (ADF)	7,10	Кобаламин (B_{12})	150 мкг
/лигнин/		Холин	1 370 мг
Сырая зола	6,40	Пантотеновая кислота	59 мг
Крахмал	35,20	Фолиевая кислота	10 мг
Сахар	5,30	Биотин	710 мкг
Экстрактивные вещества, не содержащие азота	54,20	Никотиновая кислота	153 мг
		Витамин К*	20 мг
Минералы		**Микроэлементы**	
Кальций	1,00	Йод	2,1 мг/кг
Фосфор	0,70	Железо	186 мг/кг
Натрий	0,24	Марганец	68 мг/кг
Магний	0,22	Цинк	91 мг/кг
Калий	0,92	Медь	15 мг/кг
		Селен	0,3 мг/кг

* менадиона никотинамид бисульфит

Также были использованы полусинтетические рационы: коммерческая «западная» диета (WD) (ResearchDiets, США); экспериментальный аналог «западной» диеты, составленный из отечественных ингредиентов; экспериментальная диета с высоким содержание сахарозы (SD) (Таблица 4).

Таблица 3. Содержание аминокислот и жирных кислот (в %) в комбикорме Sniff V 1534-000

Наименование аминокислот	Содержание, %	Наименование жирных кислот	Содержание, %
Лизин	1,10	Миристиновая С 14:0	0,01
Метионин	0,38	Пальмитиновая С 16:0	0,45
Цистеин	0,35	Стеариновая С 18:0	0,09
Треонин	0,72	Арахидоновая С 20:0	0,01
Триптофан	0,24	Пальмитолеиновая С 16:1	0,01
Аргинин	1,19	Олеиновая С 18:1	0,62
Гистидин	0,49	Линолевая С 18:2	1,76
Валин	0,92	α- линолевая С 18:3	0,23
Изолейцин	0,79		
Лейцин	1,39		
Фенилаланин	0,89		
Глицин	0,89		
Глютаминовая кислота	4,22		
Аспарагиновая кислота	1,84		
Пролин	1,31		
Серин	1,01		
Аланин	0,87		

Таблица 4. Исходный состав полусинтетических рационов для мышей

Ингредиент, на 100 г сухого вещества	Наименование рационов		
	WD	WDa	SD
Казеин Ledor 85%	19,50	22,5	23,0
DL-метеонин	0,30	0,30	0,30
Сахароза 99%	35,00	34,00	49,10
Мальтодекстрин	10,00	10,00	0,00
Крахмал кукурузный	5,00	5,00	15,00
Целлюлоза микрокристаллическая Биоцель XL200	5,00	5,00	5,00
Лярд	20,00	19,00	0,00
Кукурузное масло пищевое нерафинированное	1,00	1,0	4,70
Кальция фосфат*	0,175	3,90	3,90
Кальций углекислый	0,40	0,40	0,00
Солевая смесь**	1,751	0,24	0,24
Витамин В4 70%	0,20	0,20	0,20
Смесь витаминов***	0,100	0,100	0,100
Антиоксидант****	0,040	0,050	0,000
Холестерин 95% Panreac	1,50	1,50	0,00

* для WD – двухосновной кальция фосфат, для аналога WD и SD – монокальций фосфат.

** солевая смесь, г на 100 г смеси: для WD – сахароза - 23,62; калий лимоннокислый одноводный - 44,00, натрий хлористый - 14,80, калия сернокислый - 10,42, магния оксид – 4,810, железо лимоннокислое - 1,205, марганец углекислый - 0,702, цинк углекислый - 0,320, хромокалиевые квасцы - 0,111, медь углекислая - 0,006, калия йодат - 0,003, натрий селенистокислый - 0,003; для WDa и SD – сахароза - 43,24, калий углекислый (56% K) - 24,00, натрий хлористый (39,3 % Na) - 14,80, калия хлорид (52,0% K)- 8,96, магния оксид (53,0% Mg) - 7,06, железо сернокислое 1-водное (30,0% Fe) - 0,54, марганец сернокислый 1-водный (32,0% Mn) - 1,00, цинка оксид (78,0% Zn) - 0,22, хром сернокислый (17,0% Cr) - 0,034, медь сернокислая 5-водная (24,5 % Cu) - 0,136, кальция йодат (61,5% I) - 0,002, натрий селенистокислый (45,6 % Se) - 0,002.

*** витаминная смесь, г на 100 г смеси: для WD – сахароза - 78,42; витамин Е 50% - 10,00, ниацин (B_3) - 3,00, биотин (B_7) 1% - 2,00, кальция Д-пантотенат (B_5) – 1,60, витамин D_3 100000 ЕД/г- 1,00, Витамин B_{12} 0,1% маннитол – 1,00, витамин А ацетат 500000 ЕД/г - 0,80, пиридоксина гидрохлорид (B_6)- 0,70, рибофлавин (B_2) - 0,60, тиамина гидрохлорид - 0,60, фолиевая кислота - 0,20, менадиона натрия бисульфит (K_3) – 0,08; для WDa и SD – сахароза - 80,22, витамин Е ацетат 50% - 10,00; никотинамид (ниацин)99% - 3,00, биотин (Н) микровит 2% - 1,00, пантетонат кальция (B_3) кальпан микровит 98% - 1,60, витамин D_3 500000 МЕ/г - 0,20, витамин B_{12} 0,1% - 1,00, витамин А ацетат 500000 МЕ/г - 0,80, пиридоксин гидрохлорил (B_6) 98% - 0,70, рибофлавин (B_2) кормовой 80% - 0,60, тиамин (B_1) микровит промикс 98% - 0,60, фолиевая кислота 95% - 0,20, менадион натрия бисульфат (K_3) 50% - 0,08.

**** для WD –этоксихин (Е324), для WDa и SD – лавитол дегидрокварцетин 90%.

Биотест–системы

Клеточная линия человека НТ-29 (*human colon adenocarcinoma*) были получены из ФГБУ «Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» (паспорт №68/12).

Культивирование стандартизированных клеток проводили в гумифицированной атмосфере 5% CO2 при 37ºС в инкубаторе (Lamsystems, Россия) в среде Игла МЕМ (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), стрептомицина (ПанЭко, Россия) и L-глутамина (ПанЭко, Россия) на пластиковых культуральных матрацах (Costar, США), площадью поверхности 75 и 150 $см^2$. Клетки культивировали до достижения монослоя, периодичность смены культуральной среды составляла 2-3 сут, пассажа – 4-6 сут.

Органотипические культуры тканей – эксплантаты тканей размером 1 $мм^3$, полученные от 10-12–ти суточных куриных эмбрионов и лабораторных крыс Wistar (300±10 г) spf–категории.

Культивирование фрагментов ткани куриного эмбриона проводили в гумифицированной атмосфере 5% CO2 при 37ºС в CO2-инкубаторе в питательной среде, содержащей 35 % Игла, 35 % Хенкса (ПанЭко, Россия), 25 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 5 % куриного эмбрионального экстракта, 0,6% глюкозы, 0,5 ед./мл инсулина, 100 ед/мл бензил –пенициллина, 2 мМ глютамина) на пластиковых чашках Петри или культуральных 6-ти луночных планшетах (Costar, США).

Культивирование фрагментов ткани лабораторных крыс проводили в гумифицированной атмосфере 5% CO2 при 37ºС в CO2-инкубаторе в питательной среде, содержащей 35 % Игла, 35 % Хенкса (ПанЭко, Россия), 25 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 5% куриного эмбрионального экстракт на пластиковых чашках Петри или культуральных 6-ти луночных планшетах (Costar, США).

Манипуляции, требующие стерильных условий, проводили в ламинарном шкафу классом чистоты 5 ИСО (Lamsystems, Россия).

Лабораторные животные

Размещение, содержание и уход за животными, манипуляции, выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями ГОСТ 33216-2014, ГОСТ 33215-2014, Федерального закона от 27 декабря 2018 г. N 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации», Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей. Использование лабораторных животных в экспериментах обосновано положительными заключениями локального этического комитета ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Крысы стока Wistar, мыши BALB/c и C57BL / 6, помесные морские свинки конвенциональной категории были получены из филиала «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН.

Конвенциональных животных выдерживали в условиях карантина не менее 14 сут. Крыс содержали по 3–4 особи одного пола в клетках тип IV S (Tecniplast, Италия). Мышей и морских свинок содержали по 5-10 и по 2-3 особи одного пола в клетках из поликарбоната Т-4\2 (Лабораторкорм, Россия). Условия окружающей среды были контролируемые (температура воздуха 22±2°С, влажность 50-60 %, освещение искусственное: 12 часов (с 7.00 до 19.00) – день, 12 часов (с 17.00 до 7.00)– ночь.

Лабораторных животных spf-категории – крыс мышей получали из.

Крысы стока Wistar, мыши линий BALB/c и C57BL / 6 spf–категории были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН и «SPF–виварий» ИЦиГ СО РАН, адаптационный период составлял 5-14 сут. Животных содержали по 3–5 особей одного пола в системе индивидуально–вентилируемых клеток, состоящей из вентиляционного блока VENT II, стеллажа Bio.A.S., клеток типа III (24/36) (Zoonlab, Германия), в условиях микроклимата, сходных в каждой отдельной клетке (температура – 22±3°С, влажность – 50–60%) и при

искусственном освещении: 12 часов (с 7.00 до 19.00) – день, 12 часов (с 19.00 до 7.00)– ночь.

В качестве гигиенического подстила использовали лигноцель БК 8-15/LIGNOCEL (J.Rettenmaier & Sohne GMBH + CO KG, Германия). Лабораторные животные обоих категорий получали *ad libitum* минерализованную воду, полученную с использованием установки водоподготовки (MercMillipore, Германия); минерализация составляла 314–382 мг/л: гидрокарбонаты – 144–180, сульфаты – <1, хлориды – 60–76, кальций – 6, магний – 3, натрий – 50–58, калий – 50–58).

Контрольные группы животных формировались для каждого эксперимента из особей, сопоставимых по возрасту, полу и весу, условиям содержания. Животным контрольной группы осуществляли введение физиологического раствора или контрольных образцов (вариант введения, объемы, продолжительность воздействия совпадали с таковыми для экспериментальных групп).

Сельскохозяйственные животные

Гибриды вьетнамской вислобрюхой свиньи и минисвиньи породы Визенау, возрастом 4 нед (2,3 ± 1,4 кг) и 5 мес (30,4±10,2 кг), содержались на базе питомника лабораторных животных ООО «Кролинфо» в стандартных условиях окружающей среды: температура воздуха (24±2)°С, относительная влажность - (50-60)% при совмещенном освещении (в соответствии с ОСН-АПК 2.10.24.001-04 0,5% КЕО), при кратности воздухообмена – не более 5 раз в час за счет естественной вентиляции помещений. Для содержания свиней использовали подстил из опилок смешанных пород деревьев. При размещении животных учитывали необходимость обеспечения пространства для доступа к кормушкам и поилкам, возможность избежания потенциальных агрессоров и хронического физиологического стресса в групповом жилье. Вольеры имели достаточно места, чтобы избежать травм, площадь пола для размещения одной особи составляла не менее 1,49 м^2 на животное.

Свиней кормили дважды в сутки, ненормировано, с избытком выдаваемого корма, полнорационным комбикормом СК-7 (Агро-Эксперт, Россия), который содержал ячмень (40,5%), пшеницу (26,0%), отруби пшеничные (18,0%), шрот подсолнечный (≤36% сырого протеина) (5,0%), пшеницный кормовой зернопродукт (5,0%), соевый концентрат (2,0%), известняковую муку (2,0%), премикс П52-1 (1,0%), соль поваренную (0,5%). Поение осуществляли свежей и чистой водой. Содержание и уход осуществляли в соответствии с требованиями ГОСТ 34088-2017.

В эксперимент животных отбирали на основании ветеринарного осмотра за неделю до начала исследования, также ветеринарный осмотр проводили непосредственно перед началом эксперимента (дополнительно проводили исследование на носительство вируса АЧС, взвешивание и ректальную термометрию).

Распределение по группам свиней осуществляли в произвольном порядке / на основании массы тела, свиней маркирововали ушными бирками (с номерами от 1 до 9 и от 1 до 25).

Для получения прижизненно-модифицированного мясного сырья были сформированы 3 группы по 3 свиньи:

– животные (№1-3) с моделью интрацеребральной гематомы;

– ложнооперированные животные (№4-6);

– контрольные животные (№7-9).

Поросята были расформированы на 2 группы. Опытная группа состояла из маловесных (последних в помете) поросят (n=15, 1,70[1,37-1,85] кг), более крупных поросят отбирали в контрольную группу (n=10, 2,72[2,22-2,95] кг).

При выполнении болезненных манипуляций животных наркотизировали. Крыс и мышей – с использованием Ксилазина «Xyla» (Interchemiewerken «DeAdelaar» Eesti AS, Эстония) и Золетила100 (Valdepharm, Франция) – внутримышечно – для кратковременной анастезии мышей – в дозах 5 мг/кг / 20 мг/кг, для продолжительного наркоза крыс и мышей – в дозах 10 мг/кг / 20-40 мг/кг (продолжительность анестезии составляла 40 мин).

Свиньям проводили предварительную премедикацию путем внутримышечного введения Ксила в дозе 1 мл / 10 кг массы тела животного, через 15-20 мин внутримышечно вводили препарат Золетил100 в дозе 0,5 мл / 10 кг веса животного; далее для обеспечения пролонгированного глубокого наркоза в трахею животному вводили ингаляционную трубку, обеспечивающую подачу 2,5% Изофлурана (Laboratories Karizoo, S.A., Испания) в смеси с кислородом автоматически наркозной системой АИН–1 Полинаркон-12 (Электоромедоборудование, Россия).

Предоперационная подготовка, хирургические операции и послеоперационный уход за животными сопровождались соответствующими ветеринарно-медицинскими процедурами: все нестерильные материалы, потенциально соприкасающиеся с операционным полем (инструменты, шовный материал, бинты, салфетки, вата и пр.) стерилизовали острым паром (121°С, 20 мин); оборудование и материалы (хирургический столик, стереотаксис и др.), обрабатывали 0,5% раствором хлоргексидина биглюканата на 70% этиловом спирте (дезраствор) с последующим ополаскиванием стерильной водой. Перед проведением операций животных подвергали пищевой депривации в течении 6 час, не ограничивая доступа к воде. Непосредственно перед проведением операции животное анестезировали и фиксировали спиной кверху на хирургическом столике, привязав петлевидными узлами за лапы. Для предотвращения высыхания роговицы закапали в глаза офтагель (SANTEN, OY, Финляндия). В местах планируемых разрезов удаляли шерсть и обрабатывали операционное поле от центра к периферии стерильными тампонами, смоченными дезраствором. Операционное поле изолировали стерильными салфетками. После проведения хирургических вмешательств животным подкожно вводили 1-2 мл/100г массы тела теплого (35-37°С) стерильного раствора Рингера во избежание дегидратации и помещали животное в теплое чистое место до полного выхода из наркоза.

Прижизненный отбор проб крови производили у мышей и крыс путем ампутации кончика хвоста, у морских свинок – из ушной вены, у свиней – из яремной вены. Посмертное взятие крови у крыс и мышей производили

непосредственно после эвтаназии животного взятием крови с помощью шприца из правого предсердия. Кровь отбирали в пробирки с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) (Китай) и в стеклянные пробирки.

Животных выводили из эксперимента путем наркотизации (как описано выше) или усыплением в CO_2-камере (VetTech, Великобритания) с последующей декапитацией гильотиной (Открытая Наука, Россия).

3.3 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СЫРЬЯ, БАВ и СМП

При проведении исследований использовались как общепринятые стандартные, так 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 с вычислением среднего значения

Общий химический состав: минеральные вещества (золу) 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 методом ионообменной хроматографии на Aracus (PMAGmbH, Германия); жирнокислотный состав по ГОСТ Р 55483-2013; компоненты стероидной природы на газовом хроматографе-спектрометре Agilent 7890 (США) с плазменно-ионизационным детектором, идентификацию аналитов проводили с использованием базы данных масс-спектров NIST’05 (США) по относительной интенсивности основного и двух подтверждающих ионов, расчет проводили методом внутренней нормализации; состав свободных углеводов на BioLC хроматографической системе (Dionex, Германия); витамины – методом ВЭЖХ при 325-245 нм; кальций и селен – методом ААС на спектрометре Agilent 240Z/280Z; фенольные соединения – спектрометрически методом Фолина-Чокальтеу (Denisenko T. A., 2015; Вершинин В. И., Белова Е. В., 2019).

Микробиологические показатели: количество КМАФАнМ – по ГОСТ 104444.15-94, БГКП (колиформы) – по ГОСТ 31747-2012, S. aureus – по ГОСТ

31746-2012, патогенные сальмонеллы – по ГОСТ 31659-2012, E. coli – по ГОСТ 30726-2001.

Содержание токсичных элементов: свинца и кадмия – по МУК 4.1.986-00, мышьяка – по ГОСТ Р 51766-2001; ртути – по МУК 4.1.1472-2003; хром – по ГОСТ 33425-2015; содержание пестицидов – на хроматографе Agilent 7890 (AgilentTechnologies, США) с электронно-захватным директором по ГОСТ 32308-2013; антибиотиков – на жидкостном хроматографе Agilent 1200 (AgilentTechnologies, США) с МС/МС детектором по ГОСТ Р 55481-2013.

Протеомные и масс-спектрометрические методы исследования СМП и БАВ

Колоночную гель-фильтрацию осуществляли на хроматографической колонке (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) диаметром 1,5 см, длиной 30 см, заполненной Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), уравновешенной фосфатно-солевым буфером (Пущинские лаборатории, Россия) и откалиброванной с помощью стандартных препаратов «Голубой декстран» (Mm 2 000 kDa) и рибофлавин. Образец (5% раствор БАВ_2 в фосфатно-солевом буфере) наносили на колонку в объеме 1,0 мл. Фракционирование проводили со скоростью 0,7 мл/мин с использованием перистальтического насоса Model EP-1 Econo Pump (Bio-Rad, США). По выходе из колонки с помощью УФ-детектора, встроенного в Model EM-1 Econo UV Monitor (Bio-Rad, США), определяли оптическую плотность элюата, проходящего через 2 мм ячейку при длине волны 280 нм, по изменению напряжения переменного тока (при входном диапазоне до 1 В). Эксперименты проводили при температуре 4ºС. Фракции собирали с помощью коллектора фракций Model 2110 Fraction Collector (Bio-Rad, США), те из них, которые содержали УФ-полощающий материал использовались в дальнейшей работе.

Хроматографическое разделение белков проводили на хроматографе фирмы Beckman Coulter (США), состоящим из System Gold 126NM Solvent Module и System Gold 166NM Detector, по методике описанной Mayer H.K. et al. (2010) с небольшими модификациями. Для фракционирования использована колонка Phenomenex Luna 5u C18(2) 100 A (250x4.6мм), скорость потока составляла 1

мл/мин, объем вводимой пробы - 20 мкл, температура 40ºС. Детекцию проводили при длине волны 214 нм.

Градиент формировали подвижными фазами А (раствор 0,1 % трифторуксусной кислоты в деионизованной воде) и Б (ацетонитрил с 0,1% трифторуксусной кислотой). Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме (при начальном соотношении элюентов А и Б 65:35 v/v): после введения образца колонка промывалась 2 мин начальной смесью элюентов, затем за 30 мин до 100% Б, за 1 мин до 35% Б и после этого промывалась в течении 7 мин. Общее время анализа – 40 мин

Отдельные эксперименты проводились с использованием сверхпроизводительной системы жидкостной хроматографии ACQUITY UPLC CORE (США).

Спектрофотометрические исследования проводили с использованием спектрофотометров UV-1601 (Shimadzu Corporation, Япония) в прямоугольных кюветах с оптической длиной светопоглощающего слоя 10 мм; УФ/вид LibraS80 (Biochrom, Великобритания), BioChemSA (HTI, США), КФК-3-01 («ЗОМЗ», Россия).

Фракционирование белков осуществляли одномерным электрофорезом по Леммли (Laemmli U. K., 1970) и двумерным электрофорезом по О’Фарреллу (O’Farrell P. H., 1975).

Одномерный электрофорез проводили в камере (Helicon, США), используя 12,5 % полиакриламидный гель в присутствии додецилсульфата натрия при постоянной силе тока и напряжении 55 В и 130 В, в течение 2 час. В качестве стандарта использовали белковый маркер (Thermo, Латвия). Визуализацию белков проводили путем окрашивания кумасси бриллиантовым синим G-250 (PanReac, Испания). Плотность окрашивания пятен определяли с помощью ПО (ImageJ, США) – использовали не менее 3-х электрофореграмм с равным нанесением. Белковые полосы интерпретировали в соответствии с базой данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США).

Двумерный электрофорез проводили с использованием камеры (Bio-Rad, США) с помощью изоэлектрофокусирования в стеклянных трубках в первом направлении и гель-электрофорезом с использованием додецилсульфата натрия во втором направлении, как описано Matsumoto H. et. al. (2019) с небольшими доработками (Akhremko A. G., 2020). Последующее обнаружение белков проводили окрашиванием кумасси бриллиантовым синим G-250 / азотнокислого серебра (Чернуха И. М., 2016; Ахремко А. Г., 2017; Kotenkova E., 2018).

Компьютерную денситометрию двумерных электрофореграмм осуществляли с помощью сканера Bio-5000 plus (Serva, Германия) и ПО ImageMaster ™ 2D Platinum на базе Melanie 8.0 (GE Healthcare and Genebio, Швейцария). Белковые пятна на двумерных электрофореграммах интерпретировали в соответствии с базой данных Swiss-Prot (O'Donovan C. et al., 2002; Шишкин С.С., 2016) и базой данных протеомики мышечных органов (Kovaleva M. et al., 2013).

Идентификацию белков осуществляли масс–спектрометрически на MALDI–спектрометре Ultraflextreme (Bruker, Германия) с помощью программы Mascot (опция Peptide Fingerprint (Matrix Science, США), точность определения массы MH+ 0.01%).

Также использована технология iTRAQ (isobaricTaggingReagentsAmino-reactiveQuantification) при помощи MS/MS на гибридном орбитальном масс-спектрометре OrbitrapFusion и Q-exactive HFX (ThermoScientific, США) в режиме положительной ионизации в источнике NESI (ThermoScientific, США) при напряжении на эмиттере 2,1 кВ. (Popov D. V., Vinogradova O. L., Zgoda V. G., 2019). Гидролитическое расщепление белков осуществляли согласно Filter-AidedSamplePreparation протоколу (Wisniewski J.R., 2009). Полученные образцы (содержание пептидов – 30 мкг) концентрировали на вакуумном концентраторе (при 30°С до объема 4 мкл). В каждую пробу добавляли 50 мкл изопропанола, 6 мкл 0,5 М тетраэтиламмония бикарбоната и 32 мкл метки из набора iTRAQ 8-plex, pH доводили до 7,5 0,5М тетраэтиламмония бикарбоната, после чего инкубировали

2 час. После пробы объединяли, концентрировали при 30°С до объема 150 мкл и добавляли муравьиную кислоту до конечной концентрации 0,1 %.

Протеомный анализ пептидов осуществляли с использованием ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (ThermoScientific, США). Пептиды перед аналитическим разделением наносили на обогащающую колонку Accalaim-Precolumn (0,5 мм × 3 мм, 5 мкм размер частиц; ThermoScientific, США) при скорости потока 10 мкл/мин в течение 5 мин в изократическом режиме подвижной фазы Б (2,0 % ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота). Затем пептиды разделяли на колонке AcclaimPepmap C18 (75 мкм × 150 мм, 2 мкм размер частиц; ThermoScientific, США) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижными фазами А (0,1% муравьиной кислоты) и Б (80% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Колонку промывали 2 % подвижной фазой Б в течение 5 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 35% в течение 65 мин, затем за 5 мин линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99% и промывали 5 мин, после чего концентрацию Б снижали до начальных условий (2% фазы Б за 5 мин). Общая длительность анализа составляла 90 мин.

Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 400 m/z до 1200 m/z, тандемное сканирование фрагментных ионов (учитывали только ионы от z = 2+ до z = 6+ по зарядному состоянию) от нижней границы 100 m/z до верхней границы, определяемой зарядным состоянием прекурсорного иона, но не более 2100 m/z. Максимальное число разрешённых для синхронной изоляции ионов в режиме MS2 было установлено, как не более 20. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило не более 50 мс, для фрагментных ионов не более 110 мс. Все измерения проводили не менее чем в пяти технических повторениях.

Биоинформационную обработку результатов (поиск, идентификацию пиков и оценку интенсивности пиков репортерных ионов) проводили с использованием платформы MaxQuant со стандартными настройками при FDR 1%. В качестве фиксированных модификаций использовали модификации метками iTRAQ

аминогруппы N-конца и ε аминогруппы лизина и карбамидометилирование цистеина, а для возможных модификаций – окисление метионина и ацилирование аминогруппы N-концевого пептида белка. Для оценки эффективности мечения в качестве фиксированных модификаций использовали: карбамидометилирование цистеина, для переменных модификаций – окисление метионина и ацилирование аминогруппы N-конца. Эффективность мечения оценивали как отношение количества пептидов, детектированных при поиске без метки, к количеству пептидов, детектированных при поиске с меткой (Празднова Е. В., 2020).

Анализ пептидов проводили в соответствии с базами данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI, UniProtProteinDataBase).

Данный анализ осуществлялся на базе ЦКП «Протеом человека» ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Нутриентная адекватность СМП

Оценивали стандартными методами, по аминокислотной и жирнокислотной сбалансированности по показателям и критериям, разработанным Н.Н. Липатовым, И.А. Роговым и А.Б. Лисицыным, основанным на развитии принципа Митчелла-Блока, а также с применением критериев, описанных Boye, J. с соавт.(2012).

Методы in vitro

- по методу по методу А.А. Покровского- И.Д. Ертанова в модификации Н.Н. Липатова (мл);

- моделированием кислотно-основной среды желудочно-кишечного тракта (Hariyadi D. M. et al, 2016), с использованием хлорида калия, дигидрофосфата калия, гидрокарбоната натрия, гидроксида натрия, хлорида натрия и хлороводородной кислоты (PanreacAppliChem, Германия) и pH-метра Starter 3100 (OHAUS, США);

- моделированием «искусственного желудка» (Minekus M. et al, 1995) с имитацией пищеварительных жидкостей с использованием вышеперечисленных солей и ферментных препаратов (PanReacAppliChem, Германия).

- на модели ингибирования АПФ по Araujo M.C. (2000) в модификации (Торкова А.А. с соавт., 2012) с использованием лиофилизированного препарата

АПФ, выделенного из ткани легкого кролика, активностью 0,1 Ед (Sigma, США), растворенного в 1 мл 0,1 М трис-HCl буфера, содержащего 50 мМ хлорида натрия и 10 мкМ хлорида цинка; трифторацетат о-аминобензоил-фенилаланил-аргинил-лизил (динитрофенил)-пролин), каптоприла (Sigma, США);

- методом розеткообразования (РОК) на тимоцитах морских свинок и эритроцитах кролика;

- определением подавления хемилюминесценции с использованием Lum-100, ПО PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия);

- с использованием спектрофлуориметров RF-5301 (Shimadzu Corporation, Япония), FluoroskanAscent FL (TermoLabsystems, Финляндия).

Методы ex vivo

- на эксплантатах куриных эмбрионов, путем определения индекса площади с использованием фазово–контрастного инвертируемого микроскопа МИБ-Р, цифровой камеры МС-5 и ПО МС-View (ЛОМО, Россия);

- на клетках линии НТ-29, с использованием солей тяжелых металлов (кадмия и ртути) и ААРН, красителя МТТ (ПанЭко, Россия) и измерением оптической плотности (длина волны 540 нм, длина волны сравнения 690 нм) на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy 2 (BioTek, США);

- на гепатоцитах морской свинки с помощью оптического микроскопа AxioImaiger A1, системы анализа AxioVision 4.7.1.0 (CarlZeiss, Германия).

Методы in vivo

Метаболические сбои моделировали у мышей С57BL/6 с использованием полусинтетических диет: коммерческой (ResearchDiets, США) и аналогов, составленных из отечественных ингредиентов.

Алиментарную гиперлипидемию (АГЛ) воспроизводили на крысах стока Wistar по методу Котенковой Е.А (2014) обогащением рациона холестерином (0,5–2,0 %), насыщенными жирами (5,0–19,0 %) и введением внутрижелудочно витамина D2 в дозе 35000 МЕ/кг массы тела(«Технолог», Украина) на протяжении 100 сут.

Дислипидемию (ДЛ) воспроизводили на крысах стока Wistar однократным введением внутрибрюшинно Тритона Х100 (Sigma, США) в дозе 150 мг/кг массы тела.

Иммуносупрессию (ИС) моделировали у крыс стока Wistar путем трехкратного внутрибрюшинного введения Циклофосфана (Верофарм, Россия) в дозе 100 мг/кг массы тела с интервалом 72 час и внутрижелудочным ежедневным введением Азатиоприна (Мосхимфармпрепараты им. Н.А.Семашко, Россия) в дозе 50 мг/кг массы тела на протяжении 5 сут.

Интрацеребральную посттравматическую гематому (ИПГ) воспроизводили по методике Косицына Н. С. (2002) у наркотизированных крыс стока Wistar хирургически путем деструкции в области внутренней капсулы правого полушария мандрен–ножом с последующим введением в очаг повреждения аутокрови (0,02–0,03 мл); ложнооперированным воспроизводили скальпирование и трепанацию черепа.

Модель травмы спинного мозга (ТСМ) моделировали у крыс стока Wistar хирургически путем левосторонней гемисекции в нижнегрудном отделе спинного мозга (Т10-Т11) крыс (Цымбалюк В.И., 2010).

Модель травмы периферического нерва (ТПН) моделировали у крыс стока Wistar хирургически путем полной невротомии седалищного нерва крыс.

Повреждение кожных покровов: плоскостные раны воспроизводили у наркотизированных мышей BALB/c на спине в области лопаток (Mayorova A., et al., 2018) путем выполнения продольного разреза кожи и подкожной жировой клетчатки по средней линии спины длиной 20±1 мм с последующим накладыванием 2 швов на равном расстоянии друг от друга; лоскутные раны воспроизводили у наркотизированных морских свинок на спине в области лопаток диаметром 6 мм.

В экспериментах были использованы следующие тесты и шкалы:

Тест «открытое поле» типа «ринг» (OpenScience, Россия) и «квадратный бокс» (100 см×100 см, с бортами высотой 45 см, ареной, расчерченной на 25 квадратов (20×20 см) и 16 отверстиями (диаметром 20 мм, в местах пересечения

линий секторов); в течение 3-х мин после помещения животного в центр арены фиксировали поведенческие акты: латентные периоды первого движения, время выхода в центр, горизонтальную двигательную активность – количество пересеченных квадратов; вертикальную двигательную активность – количество стоек; количество обследованных норок («норковый рефлекс»); груминг, количество актов дефекации (болюсов); арену протирали дезинфектантом посте тестирования каждого животного.

Тест «новая клетка» – использовали клетку, соответствующую по размерам домашней, в которую помещали мышей и оценивали вертикальную исследовательскую активность (подсчетом числа стоек) в течение 5-ти мин.

Тест «темно-светлая камера» (OpenScience, Россия) –прямоугольный контейнер, разделенный перегородкой на две части: темная камера (1/3 пространства, закрывается крышкой, стенки выкрашены в черный цвет); светлая камера (занимает большую часть, открытая, со светлыми стенками). Животное помещали в светлую часть установки и фиксировали время пребывания в каждом из отсеков камеры, частоту переходов и латентный период захода в темный отсек в течение 5 мин.

Тест Порсолта («вынужденное плавание») – использовали прозрачные цилиндры (20×35×17 см), заполненные водой температурой 29±2°С (смену воды в цилиндрах производили после каждых 3-х животных). Тестирование проводили в два этапа: первый этап – «ознакомление» - животных помещали в цилиндры на 5 мин; второй этап проводили через 24 ч: животных выпускали плавать в цилиндр с водой индивидуально на 5 мин, регистрируя длительность пассивного плавания (нахождения животного на поверхности воды без активных движений лапами и попыток выбраться) и его общую длительность (Porsolt R. D. et al., 1978).

Тест удержания на горизонтальном стержне – использовали горизонтальную перекладину (диаметром 2 мм), натянутую на высоте 60 см от стола. Регистрировали время удерживания животных на перекладине.

Шкала неврологического дефицита Stroke-Index McGrow (Mc Grow, 1977) в модификации Кульчикова А.Е. (2008) и в модификации Ганнушкиной И. В. (2013).

Тест на моторную деятельность крыс –оценивалась по шкале Бассо, Беатти и Бреснана (шкала BBB) (Barros Filho T. E., Molina A. E., 2008).

Тест на седалищную функцию (шкала SFI), сочетающий анализ походки и временно- пространственные отношения перехода от одного следа к другому при ходьбе с использованием математической формулы, сравнивающей четыре измерения между экспериментальными и нормальными следами (Ria M., 2015).

Пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ) проводили на фоне 18-час пищевой депривации, глюкозу (2 г/кг массы тела) вводили перорально через зонд, гликемию измеряли перед введением глюкозы и через 5, 10, 15, 30, 60 и 90 мин, используя глюкометр OneTouch UltraEasy и тест-полоски (LifeScan OneTouch, ОАЭ).

Поведенческие тестирования животных записывали на видеокамеру GoProHERO 4 (GoPro, США), результаты тестов обрабатывали с помощью ПО Enthovision XT 14 (Noldus, США) и RealTimer (OpenScience, Россия).

Лабораторные исследования биоматериала

Общее клиническое исследование цельной крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus junior vet 2.7 (Diatron Messtechnik GmbH, Австрия), определяли: лейкоциты (WBC); лимфоциты (LYM); содержание смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток (MID); гранулоциты (GRA); лимфоциты (%LYM); миелоциты (MI); относительное содержание гранулоцитов (%GRAN); эритроциты (RBC); гемоглобин (HGB); гематокрит (HCT); средний объем эритроцита (MCV); среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH); средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (MCHC); ширина распределения эритроцитов (RDWc); тромбоциты (PLT); тромбокрит (PCT); средний объем тромбоцита (MPV); распределение тромбоцитов (PDWc).

Показатели лейкоцитарнуой формулы (лимфоциты, гранулоциты и моноциты) – на проточном цитофлуориметре Guava Easy Cyte (MerchMillipore, Франция), посредством детектирования размера и гранулярности клеток. Расчетным путем определяли: содержание лейкоцитов – по формуле:

WBC=LYM+GRA+MON; относительное содержание лимфоцитов (%LYM), гранулоцитов (%GRAN) и моноцитов (%MON) по формулам: LYM/WBC×100%; GRA/WBC×100%; MON/WBC×100%.

Биохимическое исследование сыворотки крови проводили на автоматическом анализаторе BioChem FC-360 (HTT, США), используя наборы реактивов (HTT, США) в соответствии со стандартными методиками. Расчетным путем определяли остаточных холестерин (ХС не-ЛПНП и не-ЛПВП): (ОХС - ХС ЛПВП - ХС ЛПНП); индекс атерогенности сыворотки крови животных (ИА): (ОХС-ХС ЛПВП) / ХС ЛПВП.

Иммуноферментные исследования сыворотки и плазмы крови проводили на фотометре ImmunoChem2100 (HTI, США) при помощи «сэндвич»-метода, используя наборы видоспецифичных реактивов ELISA (rat).

Активность каталазы и супероксиддисмутазы определяли спектрофотометрически по Aebi H. (1984) и Marklund S. L. (1982), принимая за единицу активности количество перекиси водорода в ммоль, разлагающееся за 1 мин при добавлении образца, а также его способность к 50% ингибированию реакции автоокисления пирогаллола (Е/мг).

Общую антиоксидантную емкость (ОАЕ) крови определяли спектрофотометрически путем регистрации скорости окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом, растворенной в реакционной среде, и выражали в константе ингибирования (Ки×мин-1×10-3).

Степень накопления малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови определяли по методике, описанной Купаевой Н.В., Котенковой Е.А. (2019).

Бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК) определяли с использованием культуры *E. coli*, выражая в единицах угнетения роста и развития микроорганизмов, которую определяли фотометрически на КФК-3-01 (Загорский оптико-механический завод, Россия).

Гистологические и иммуно-гистохимические исследования проводили с использованием микротомов Microm HM-525 и Microm HM-315, окрашиванием срезов по стандартным протоколам (в т.ч. гематоксилин-эозин, масляный красный,

VCAM–1, ICAM–1), микроскопа AxioImaiger A1 с применением системы анализа изображений AxioVision 4.7.1.0 (CarlZeiss, Germany).

Общие методы исследований in vivo

Наблюдение за животными – ежедневно осуществляли наблюдение за животными, оценивая активность и подвижность, тонус мышц, тактильную реакцию, состояние шерстного и кожного покрова и слизистых оболочек, истечения и другие признаки воспалительных реакций, акты мочеиспускания и дефекации.

Оценку полноты заживления раны оценивали тензиометрически путем вырезания куска раневой поверхности кожи (по 1,5 см в обе стороны от рубца), затем с помощью модифицированных аптечных весов определяли прочности рубца на разрыв, подвешивая к лоскуту кожи груз увеличивающейся массы: начальная масса груза равнялась 100 г, пошаговое увеличение груза составляло 5 г, а также гистологически.

Массу тела крыс, мышей, морских свинок определяли с помощью электронных лабораторных весов (Ohaus, США). Количество потребления корма и воды определяли путем взвешивания бутылок с водой и корма, которое проводили в одно и то же время дня с использованием электронных лабораторных весов (AcculabVicon, США) с точностью ±0,001 г.

Свиней взвешивали с использованием весов для крупного рогатого и мелкого рогатого скота «Эльтрон» (ООО «Волгоградский Завод Весоизмерительной Техники», Россия), ректальную температуру измеряли с помощью электронного термометра DT-624 4.0 (A&D Company, Limited, Япония).

Абсолютную массу внутренних органов определяли после их экстирпации, промывания в физиологическом растворе и промакивания фильтровальной бумагой путем взвешивания на электронных весах с точностью ±0,001 г (AcculabVicon, США), определение их относительной массы расчётом в % от общей массы тела животного.

3.4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЧАСТНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ БАВ И СМП

В работе использованы реактивы отечественных и зарубежных производителей: агароза, гептан (Sigma, США); хлорид кальция (AppliChem Panreac, Германия), фосфатно-солевой буфер (Пущинские лаборатории, Россия), кукурузное масло (Россия), альгинат натрия (Русхим, Россия).

Для получения биоактивных белково-пептидных комплексов из иммунных органов были использованы:

- для хранения сырья – морозильные камеры (Haier, Китай),
- для измельчения сырья – мясорубка (100 отверстий, сечение 3 мм),
- для экстракции биоактивных элементов из сырья – лабораторно-диспергирующая установка (Лаботекс, Россия) с охлаждающей рубашкой (4-5 °С),
- для отделения нерастворимого осадка после экстракции – центрифуга СМ-6М (ELMI, Латвия);
- для концентрирования и разделения белковых фракций экстракта – установка Vivaflow 200 (Sartorius, Германия) и полиэфирсульфоновые мембраны с диаметром пор 30 кДа, используемое давление составило 2,5 бар;
- для включения белково-пептидных комплексов в носитель – перистальтический насос (Shenchenlab 2015 MCSeries, Китай), магнитная мешалка ММ-5 (Россия), холодильная камера (Stinol, Россия).
- лиофильная сушилка ИНЕЙ-4 (Россия, ИБП РАН).

Характер выхода белка в экстрагент, а также контроль за включением белковых соединений в носитель определяли путем определения общей концентрации белка – по методу Кингслея- Вейксельбаума биуретовой реакцией (Brady, P. N., Macnaughtan, M. A., 2015), а также по методу Лоури (Ахремко А.Г., Иванова Е.А., 2018) с использованием полуавтоматического анализатора BioChemSA (HTI, США).

Для получения специализированных мясных продуктов было использовано оборудование технологического стенда-ФНЦ пищевых систем, включая: промышленную мясорубку производительностью до 100кг/час (Mainca, Испания), волчок, куттер на 50 литров KG Wetter 258/1336), вакуум-производственная установка MaxxDLab (FrymaKoruma AG, Швейцария), мешалка RM-20 (Mainca, Испания), вакуумная упаковочная машина (KOMET, Россия), фасовочно-упаковочная машина для жидких и пастообразных продуктов (Пастпак Р-04, Россия).

3.5 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Результаты приведены в виде средней величины (M), ошибки (m), Me (медиана), P25-75 (межквартальном размахе, нижним 0,25-квартилем и верхним 0,75 квартилем) и min-max (минимальное и максимальное значение измеряемой величины), а также в долях (процентах) или абсолютных числах.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10.0. Достоверность различий (p) средних величин, удовлетворяющих условиям нормального распределения и равенству дисперсий, оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Для сравнения количественных признаков, не удовлетворяющих условиям нормального распределения и равенству дисперсий, использовали непараметрический аналог для независимых выборок, а также при малых выборках – U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения количественных данных трех и более независимых выборок –критерий Краскела-Уоллиса. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 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.

4.1. РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ДОСТАВКИ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСОВМЕСТИМЫХ НОСИТЕЛЕЙ

Биологическая активность веществ белковой природы в клеточной среде определяется их структурой. Функционально значимые аминокислотные последовательности могут как нативно присутствовать в сырье и продуктах питания, так и образовываться либо в процессе технологической переработки, либо в процессе переваривания в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Многие биоактивные белки и пептиды весьма чувствительны к био- и кислотной деградации. При денатурации, агрегации и гидролизе в ЖКТ данные соединения становятся биологически нейтральными, теряя свои свойства (McClements D. J., 2018). По литературным данным (Ryan J. T. et al, 2011) биодоступность соединений белковой природы, особенно пептидов, при пероральном поступлении не превышает 2 %. В связи с чем для повышения эффективности биоактивных соединений белкового происхождения актуальным является подбор системы таргетной их доставки в целевой отдел желудочно-кишечного тракта.

Для достижения поставленных целей (Рисунок 2) при разработке систем таргетной доставки белковых молекул мы принимали во внимание на выбор материала носителя и метода иммобилизации. Установленные первичные критерии для материала, включали инертность по отношению к БАВ, способность к

обеспечению их сохранности в агрессивных условиях верхнего отдела ЖКТ, высокая гидрофильность и вместимость, рыночная доступность и низкаястоимость.

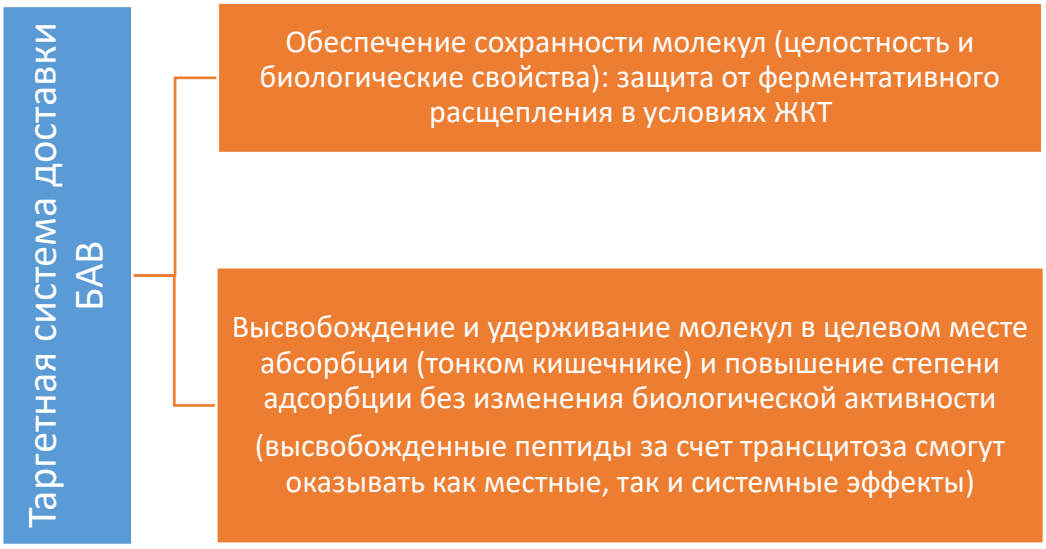


Рисунок 2 – Основные цели, преследуемые при разработке системы таргетной доставки биоактивных соединений белковой природы

В настоящее время носители, используемые в пищевой и фармацевтической промышленностях, разделяют на органические и неорганические. Органические носители природного происхождения представлены полисахаридами (хитозан, альгинат, декстран, целлюлоза) (Черникевич И. П., 2010), белками (фибрин, кератин, коллаген, желатин) и липидами (фосфатидилхолин, холестерин). Носители неорганического происхождения – это, в основном, керамика, активированный и древесный уголь, пористый фарфор, цеолиты, силикагели, глина, металлы и их оксиды (Sahare P. et al, 2014; Alknn S. et al, 2009; Datta S. et al, 2013). Среди носителей синтетического происхождения сегодня наиболее часто используют полиметиленовые (стирол), полиамидные (полиаминоарилнайлон, полиакриламид) и полиэфирные соединения.

В большинстве научно-исследовательских работ для создания таргетных систем медицинского и биотехнологического назначения в качестве носителя используют природные инертные биополимеры, особенно целлюлозу, крахмалы,

альгинат, агарозу и ее производные (Alam A. K. et al, 2017). Данные носители природного происхождения позволяют предотвратить денатурацию белковых и пептидных соединений (Argudo P. G. et al, 2018), защитить их от агрессивного воздействия ЖКТ, контролировать высвобождение и усилить абсорбцию, тем самым увеличивая терапевтический эффект и уменьшая частоту дозирования (Zheng Y., et al 2015). В некоторых случаях носители подвергают дополнительным механическим или биохимическим модификациям с использованием бифункциональных реагентов (Манаенков О. В, 2005) для формирования поперечных связей, увеличивающих прочность и термическую стойкость получаемых структур.

В соответствии со сформированными целями (Рисунок 2) нами были отвергнуты носители, неспособные преодолеть верхние отделы ЖКТ (воздействие амилазы ротовой полости, кислую среду желудка), такие как камеди, крахмалы, а также не позволяющие равномерно распределить вносимые в носители БАВ (пектин). Таким образом, для разработки системы таргетной доставки белковых молекул в качестве носителей в силу их свойств, характеристик и органического происхождения были использованы такие биополимеры, как агароза и альгинат.

Существует достаточно много методов иммобилизации. По принципу действия они разделяются на химические и физические методы. Каждый из них имеет достоинства и недостатки при взаимодействии носителя с биоактивными белковыми соединениями. Химическая иммобилизация предполагает образование ковалентной связи между функциональными группами поверхности носителя и аминокислотными остатками на поверхности белка и другим биоактивным молекулами. Однако такой тесный контакт может быть неприемлем по причине появления стерических ограничений или изменения микросреды и требует дополнительного введения в систему полифункциональных реагентов (Егоров Н. С., Самуилов В. Д., 1987).

Методы химической иммобилизации обеспечивают высокую прочность и необратимость связи носителя с включенным веществом. Их используют для улучшения таких свойств, как субстратная специфичность для ферментов,

каталитическая активность или стабильность белков. Однако, несмотря на ряд достоинств, химические приемы иммобилизации малопривлекательны ввиду достаточной сложности и дороговизны.

Физические методы, характеризующиеся отсутствием ковалентных связей между активной молекулой и носителем, подразделяют на адсорбцию, включение в гель, в частности инкапсулирование, включение в липосомы и в системы двухфазного типа. Метод физической адсорбции, подразумевающий удерживание целевых молекул за счет электростатических сил Ван-дер-Ваальса, водородных связей или гидрофобного взаимодействия и солевых мостиков, несмотря на простоту, обратимость и наименее возможное повреждение включаемых молекул, обладает значительными недостатками. Самыми существенными недостатками являются вымывание молекул с поверхности носителя, неспецифическое связывание или стерическое препятствие со стороны носителя (Agostinelli E. et al, 2007; Morais R. R. et al, 2013; Mohamad N. R. et al, 2015).

Иммобилизация с использованием систем двухфазного типа представляет собой ограничение движения белковой молекулы не за счет взаимодействия с носителем, а благодаря ее способности растворяться только в одной из двух фаз. В данных системах необходимо подобрать такую природу фаз, чтобы продукт накапливался в той, где отсутствуют молекулы БАВ, чтобы извлечение продукта не было затруднено, а раствор с активным веществом можно было использовать повторно (Егоров Н. С., Самуилов В. Д., 1987).

Метод включения в гели привлекает внимание своей простотой, возможностью варьировать состав и структуру матрицы полимера, и проводить процесс в мягких физиологических условиях. При иммобилизации соединений различной природы путем включения в гидрофильные полимерные сети, образующих гидрогель, происходит механическое обездвиживание, обусловленное наличием дополнительных нековалентных (ионных и водородных) и ковалентных взаимодействий в трехмерной сети тесно переплетенных цепей. Гидрогели способны впитывать огромные объемы воды и подвергаться набуханию и усадке, их пористость и совместимость с водными средами делают их очень

привлекательными биосовместимыми средствами доставки белково-пептидных соединений. Их применение разнообразно, так как гидрогели формуются в различные физические формы – наночастицы, микрочастицы, пленки и покрытия. За счет этого гидрогели с дополнительно включенными ферментативными, гидролитическими или экологическими активаторами, широко применяются для контролируемой доставки различных соединений. Однако применение гидрогелей ограничено при использовании гидрофобных соединений: прочность полимерного ядра в этом случае достаточно слабая и может быть неустойчивой при воздействии ферментов, вызывая раннее высвобождение целевого соединения (Какимов А. К., 2016.). Решением данной проблемы могут стать следующие приемы: введение БАВ непосредственно в водный раствор носителя для включенния целевых молекул в ячейки трехмерной структуры полимерного геля и последующая полимеризация; введение БАВ в раствор готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние, что является простым в исполнении и позволяет сохранить асептику, т.к. размеры бактериальных клеток слишком велики для того, чтобы проникнуть внутрь оболочки.

Среди привлекательных свойств гидрогелей, стоит отметить их пористость, которая способствует высокой локальной концентрации загруженного активного вещества и его замедленному высвобождению, которое обусловлено контролируемой диффузией, набуханием и химическим воздействием.

Гидрогели, изготовленные с использованием агарозы, являющейся нейтральным полисахаридом, получаемым из красных морских водорослей, и образующей термически обратимые гидрогели при охлаждении ниже температуры его гелеобразования, широко используются в биологических и медицинских областях. Большой гистерезис между температурой гелеобразования (31 – 36 °C) и температурой плавления (65 – 85 °C) гидрогеля агарозы делает его хорошим материалом для доставки белков и пептидов, поскольку данные соединения могут быть легко загружены в матрицу гидрогеля путем смешивания содержащего их раствора с раствором агарозы в мягкой форме. В дополнение к мягким условиям

нагрузки, агарозный гидрогель имеет много других преимуществ для доставки БАВ (гидрофильность, инертность и биосовместимость).

Альгинат, также широко используемый для образования гидрогелей, представляет собой растворимый в воде линейный полисахарид, извлекаемый из бурых морских водорослей. Альгинат состоит из чередующихся блоков из 1 – 4 связанных остатков α-L-гулуроновой и β-D-маннуроновой кислот, определяющих физико-химические характеристики вещества и варьирующихся в зависимости от вида и используемой части водорослей, а также сезонности их сбора (Sarker B., 2014). В настоящее время производится более 200 различных видов альгината. Стоит отметить то, что альгинат обладает биологическими свойствами, проявляя минимальные цитотоксические эффекты, снижает гемолитические процессы крови и является анионным мукоадгезивным полимером (Becker T. A. et al, 2001; Каширина Е. И. с соавт., 2014; Severino P. et al, 2019). Возможность растворов альгинатов одновалентных металлов образовывать матрикс основана способности к ионотропному гелеобразованию. Гелеобразование обусловлено реакцией комплексообразования: гулуронатные блоки альгината имеют значительное сродство к многозарядным катионам (Ca, Cu, Al) и при взаимодействии карбоксильных групп двух соседних цепей формируется матрикс, где каждая альгинатная цепь димеризуется с образованием соединений со многими другими цепями. В результате образуется трехмерная сетчатая структура геля («яичный бокс») (Рисунок 3). Размер кооперативной единицы составляет порядка 20 мономеров (Sosnik A., 2014.). В качестве сшивающих агентов чаще всего используют неорганические или органические соединения кальция (Щипунов Ю. А. с соавт., 2002; Мороз О. В., с соавт., 2013). Такие гели хорошо сохраняют форму, устойчивы к агрессивным воздействиям окружающей среды и состоят на 98,0 – 99,5 % из воды, и лишь 2,0 – 0,5 % представлено альгинатом. Причем, в зависимости от количества кальция, вносимого в систему, описанные выше межцепочечные ассоциации могут быть либо временными (при низких уровнях внесения), либо постоянными. Многочисленные исследования показали, что химическая структура, размер молекулы, а также кинетика образования геля и

катион оказывают значительное влияние на некоторые из его функциональных свойств, включая пористость, набухание, стабильность, биоразлагаемость, прочность геля (Liu A., García A., 2016).

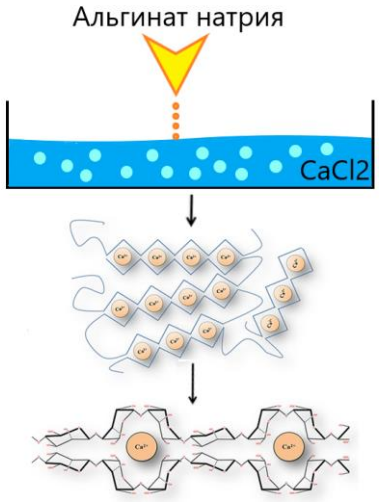


Рисунок 3 – «Яичная» структура альгинатного геля, образованного хелатированием ионов Ca^{2+}

Пилотный эксперимент был направлен на выбор оптимального носителя путем изучения свойств систем таргетной доставки – гидрогелей на основе агарозы и альгината.

Технология агарозного гидрогеля по (Wang N., Wu X.S., 1997) включала следующие стадии:

1. Приготовление 2%-го раствора агарозы: в колбу вместимостью 50 $см^3$ вносили 0,4 г агарозы, приливали 20 $см^3$ фосфатно-солевого буфера (pH 7,4), аккуратно перемешивали и нагревали до 95 ºС в течение 10 мин, после чего охлаждали до 40 ºС.

2. В стакан вместимостью 500 $см^3$ вносили 200 $см^3$ кукурузного масла и нагревали до 40 ˚С, смешивали с 2%-ым раствором агарозы и гомогенизировали в ЛДУ при 5000 об/мин в течение 1 мин, после чего охлаждали до 2 – 4 ºС.

3. Полученный раствор смешивали с гептаном в соотношении 1:2 с целью уменьшения вязкости, аккуратно перемешивали и фильтровали суспензию с помощью мембранного фильтра с размерами пор 0,2 мкм, полученную суспензию промывали гептаном.

4. Производили лиофильную сушку при температуре минус 20 ºС и давлении 1,5 мПа.

В результате был получен макропористый агарозный гель с размером пор до 1000 мкм. БАВ_2 включали путем смешивания раствора, содержащего белково-пептидные комплексы (20,2 ± 2,0 г белка) с готовым раствором полимера (стадия 1), который далее переводят в гелеобразное состояние путем смешивания с нагретым кукурузным маслом.

Для изучения процесса формирования капсул и подбора условий получения оптимальных капсул была проведена предварительная работа. Известно, что при впрыскивании по каплям носителя – альгината натрия в формирующий раствор соли кальция происходит мгновенная реакция – на поверхности капли образуется оболочка, образующая сферическую форму, и внутреннее жидкое содержимое. Образование альгинатной оболочки сопровождается постепенной диффузией ионов кальция из раствора в центр сферической гранулы, с течением времени превращающейся в сплошной гель. При этом скорость диффузии ионов кальция в гранулу зависит как от свойств и состава альгината натрия, так и от концентрации кальция в формирующем растворе. Показано, что при увеличении в формирующем растворе концентрации ионов кальция увеличивается толщина оболочки капсулы (Jayant R. D. et al., 2009; Zuo Q. et al., 2012).

Альгинатные сферы по (Manjanna K. M. et al, 2010) получали путем прокапывания раствора альгината натрия (варьирование от 0,5 до 2,0 %) в формирующий раствор кальция хлорида (варьирование от 1,0 до 2,0 %). Полученные капсулы выдерживали в растворе кальция хлорида 20 мин для полимеризации. После этого капсулы фильтровали и промывали в дистиллированной воде. Форму сфер, полученных при различных вариациях, оценивали визуально. Показано, что низкий уровень кальция в растворе приводит к образованию высоковязких тиксотропных растворов и, как следствие, к более плотным капсулам. При более высоких уровнях кальция результаты осаждения или гелеобразования образуют постоянные ассоциации цепей. Сферическая форма капсул с оптимальным

соотношением толщина/диаметр достигалась при концентрации альгината натрия в растворе 1,0 – 1,5 %, хлорида кальция – 2,0 % (таблица 5).

Таблица 5. Характеристики полимерных капсул с использованием альгината натрия (NaAlg)

[NaAlg], мол.%	**[$CaCl_2$], мол.%**	**Внешний вид, консистенция**
0,5	1	Овальной формы, мягкие, не сохраняют структуру
	1,5	
	2	
1,0	1	Овальной формы, плотные
	1,5	Полусферической формы, упругие
	2	**Сферической формы, упругие**
1,5	1	Полусферической формы, плотные
	1,5	Полусферической формы, упругие
	2	**Сферической формы, упругие**
2,0	1	Полусферической формы, упругие
	1,5	Полусферической формы, упругие
	2	Сферической формы, плотные

Иммобилизация БАВ_2 в альгинатные капсулы была проведена в следующем порядке:

1. Приготовление раствора БАВ_2: в колбу вместимостью 100 $см^3$ наливали 50 $см^3$ экстракта, содержащего 20 ± 2 г белка, и доводили до метки дистиллированной водой;

2. Приготовление 1,5%-го раствора альгината натрия: в колбу вместимостью 100 $см^3$ вносили 1,5 г альгината натрия и приливали 100 $см^3$ раствора БАВ_2, полученный раствор перемешивали с использованием магнитной мешалки в течение 2 ч до получения однородной смеси.

3. Приготовление 2%-го раствора кальция хлорида: в колбу вместимостью 1000 $см^3$ вносили 20 г кальция хлорида и доводили до метки дистиллированной водой.

4. Полимеризация капсул: в стакан вместимостью 1000 $см^3$ приливали 800 $см^3$ 2%-го раствора кальция хлорида и капельно с помощью перистальтического насоса вводили суспензию альгината натрия в течение 60 мин. В процессе приготовления раствор непрерывно перемешивали на магнитной мешалке.

5. Полученные капсулы промывали дистиллированной водой и хранили в 50 – 100 $см^3$ дистиллированной воды при 4 ºС не более 48 ч;

6. Лиофильную сушку капсул производили после удаления избытка влаги при температуре –20 ºС и давлении 1,5мПа.

Величину сорбции вносимых биоактивных комплексов оценивали путем измерения остаточной концентрации белка методом Лоури в формирующем растворе кальция хлорида после отделения полученных капсул фильтрованием. Степень включения БАВ_2 в агарозный гидрогель составил 80 ± 2 %, в альгинатные капсулы (при концентрации кальция хлорида 2 %) – 71 ± 1 %, внешний вид и характеристики представлены в таблице 6.

Таблица 6. Внешний вид инкапсулированного в полимерные носители БАВ_2

Наименование биополимера	**Внешний вид**	
Агарозный гидрогель	Чешуйки желтоватого цвета размером 1,7 – 2,0 мм	
Альгинатные капсулы	Гранулы желтовато-коричневого цвета диаметром 1 – 1,5 мм	

Таким образом предложена технология подбора метода инкупсулирования белково-пептидных комплексов в биосовместимые носители.

4.2. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО МЯСНОГО ПРОДУКТА, ОБОГАЩЕННОГО БИОАКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В настоящее время из пищевых белков выделяют биоактивные пептиды с различными биологическими эффектами. При этом среди многочисленных методов выделения наиболее широко применяют ферментативный гидролиз цельного белка. Так, из мясного сырья выделен ряд биоактивных пептидов с использованием протеаз бактериального, растительного и животного происхождения, в частности пищеварительных ферментов – пепсина, трипсина и химотрипсина (Jang A., Lee M., 2005; Ryan J. T. et al, 2011; Admassu H. et al, 2018). Пептическое расщепление скелетных мышц сельскохозяйственных животных и птицы приводит к генерации многочисленных пептидов, способных укреплять иммунитет и обладающих биологическими активностями (противовоспалительной, противоопухолевой, гипотензивной, антимикробной, антиоксидантной, цитопротективной и гиполипидемической) (Matsui T. Et al, 2006; Cinq-Mars C. D. et al, 2008; Kim, E. K. et al, 2009). Показано, что пептиды с низкой молекулярной массой обладают более сильным биологическим эффектом благодаря более высокой абсорбции в кишечнике. Биоактивные пептиды содержат всего несколько аминокислотных остатков за счет чего они способны беспрепятственно преодолевать эпителиальный барьер пищеварительного тракта, проникать в кровоток и, поступая к периферическим тканям оказывать влияние на органном и системном уровнях (Yust M. M. et al, 2003; Lee S. Y., Hur S. J., 2017).

Использование гидролизатов в технологии пищевых продуктов предложил Arihara K. (2006). Однако гидролизаты и биологически активные пептиды имеют некоторые недостатки, которые ограничивают их применение в рецептурах функциональных и специализированных пищевых продуктов и пищевых добавках. Так, высокая гидрофильность может приводить к физико-химической нестабильности, потере функциональных свойств и микробной деградации, что ограничивает использование пептидов при производстве продуктов на жировой

основе, вызывая сложности при хранении. С другой стороны, низкая биодоступность и биостабильность ограничивает биофункциональность пептидов: некоторые пептиды подвержены влиянию реакционноспособных соединений или факторов нестабильности окружающей среды таких, как температура, свет, pH, ионная сила, ионы металлов и окислители/восстановители. В результате этого они теряют свою биологическую активность. Среди прочих недостатков пептидных гидролизатов можно привести высокую степень горечи, которая снижает сенсорную восприимчивость, и, как следствие, приводит к ограничению их использования в пищевой промышленности (Udenigwe C. C., 2014; Mohan A. et al, 2015).

Анализ литературных данных показал, что гидролизаты куриного белка, содержащие глипролины – пептиды, имеющие на С-конце последовательность глицил-пролин или пролил-глицил-пролин, – обладают выраженными иммуномодулирующими, цитопротекторными и гипотензивными свойствами. В экспериментах показано их эффективное влияние на снижение кровяного давления. (Möller N. P. et al, 2008; Wichers H., 2009). К гидролизатам белков, используемых в пищевой и фармацевтической промышленностях, предъявляют различные требования, которые обусловлены в первую очередь степенью расщепления белка. Для создания специализированных (в т.ч. энтерального зондового питания) и функциональных продуктов питания желательно применение белковых гидролизатов, содержащих 15 – 20 % свободных аминокислот, ди-, три- и олигопептиды с молекулярной массой около 3000 Да (Королёва О. В., 2013).

В соответствии с этими данными была проведена работа по разработке рецептуры и подбору технологических режимов производства СМП_2 с включением БАВ_2. Определено, что для получения хороших органолептических характеристик продукта (отсутствие горечи), оптимальное количество гидролизата в рецептурной композиции не должно превышать 2,0 %. Кроме того, в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к снижению количества потребляемой соли (Драпкина О.М., 2015), а также для дополнительного снижения развития гипертензии, количество поваренной соли, вносимое при производстве пищевых продуктов, не должно превышать 0,3 % (Таблица 7).

Таблица 7. Рецептурный состав специализированного мясного продукта

Ингредиент, %	КМП	КМПф	СМП_2	СМП_2ф
Свинина жилованная, с массовой долей жировой ткани не более 30 %	65,0	65,0	-	-
Свинина от свиней-реконвалесцентов жилованная, с массовой долей жировой ткани не более 30 %	-	-	65,0	65,0
Гидролизат куриного белка	-	2,0	-	2,0
Крахмал	3,0			
Поваренная соль	0,3			
Вода питьевая	До 100			

В части технологии была скорректирована консистенция – продукт вырабатывали в виде пюреобразного паштета для нивелирования дисфагии, характерной при острых нарушениях мозгового кровообращения (Яковлева А. Н., 2007). Технологический процесс экспериментальной партии образцов мясного продукта (из свинины / прижизненно модифицированной свинины с/без добавления БАВ_1) представлен на рисунке 4.

Рисунок 4 - Технологическая схема производства экспериментального мясного продукта

Наработка экспериментальных партий мясного продукта включала следующие технологические операции: мясное сырье, полученное от свиней-

реконвалесцентов и свиней, не подвергшихся модификации, предназначенные для приготовления продукта дефростировали, промывали, срезали загрязнения, клейма, технические зачистки, жиловали для получения свинины полужирной с содержанием жировой ткани не более 30 % и нарезали на куски размером 2,5 – 5 см; сырье измельчали в куттере при 3000 об/мин; фаршевую массу загружали в камеру гомогенизации вакуум-производственной установки, затем в камеру подавали соль, крахмал, БАВ_1 (для продуктов КМПф и СМП_2ф), питьевую воду, поваренную соль; для составления паштетной массы и пюреобразной консистенции устанавливали скорость измельчения 3000 об/мин, визуально определяя степень перемешивания и гомогенизации (до получения однородной нежной консистенции), производили нагрев массы до температуры (70 ± 5) °С; полученную массу фасовали в тару из комбинированного материала либо в полимерные многослойные пленки, массой нетто 100 г; наполненные банки и пакеты подвергали контрольному взвешиванию; укупоренные банки, либо пакеты, автоклавировали при температуре 115 ºС в течение 35 мин, противодавление составляло (0,20 – 0,22) Мпа. Банки или пакеты с продуктами охлаждали под душем холодной водой в течение 5-10 мин и сортировали.

Хранение упакованных экспериментальных мясных продуктов производили в соответствии с правилами хранения, утвержденными НТД: при температуре от 0 до 20 °С, относительной влажности воздуха (75 ± 5) %. Срок годности экспериментальных мясных продуктов в банках из ламистера и многослойных пакетах составлял не более 6 мес (после вскрытия рекомендуется хранить не более 48 ч при температуре от 0 до 6 °С). Выработанные образцы соответствовали требованиям качества и безопасности, предъявляемым к аналогичным по виду продуктам по показателям промышленной стерильности (отсутствие мезофильных аэробных, факультативно-анаэробных и мезофильных анаэробных микроорганизмов), содержанию токсичных элементов (свинец, мышьяк, кадмий, ртуть в 3 – 5 раз ниже допустимых уровней) (Приложение А).

Глава 5. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИИ ОЦЕНКИ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ И РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ

Растущий спрос на продукты питания, обладающие различными функциональными свойствами, требует более детального исследования разрабатываемых и внедряемых в производство подобных продуктов. Наряду с изучением состава, показателей качества и безопасности, становится необходимым также изучение заявляемых разработчиками и производителями эффектов на здоровье потребителя. Традиционно такие исследования проводят с использованием различных биотест-систем, включая лабораторных животных (системы *in vivo*), изолированные органы и ткани живых организмов (системы *ex vivo*), а также клетки, отдельные органеллы и белки (системы *in vitro*). Далее в главе будут рассмотрены модели с использованием *in vitro* и *in vivo* систем, с помощью которых возможно оценить свойства как биоактивных веществ различной природы, так и продуктов питания. Также будут рассмотрены возможности использования комплексного подхода с сочетанием различных методов.

5.1 ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ И ПРОГНОЗА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ

В главе рассмотрены современные методы анализа, применяемые для изучения биоактивных соединений как в нативном виде, так и содержащихся в функциональных и специализированных пищевых продуктах, а также представлены современные критерии для расчета нутриентной адекватности продуктов.

Оценка веществ белковой природы

Для изучения функциональных белков различного происхождения используют следующие основные протеомные методы: аминокислотный анализ, электрофоретическое фракционирование и масс-спектрометрический анализ пептидов, сиквенс последовательности аминокислот.

Содержание свободных и связанных аминокислот в сырье и продуктах, традиционно определяемых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием автоматических аминокислотных анализаторов, является базовым исследованием для определения количества заменимых (ЗАК) и незаменимых (НАК) аминокислот и изучения биологической ценности пищевых белков (Moore D.R., Soeters P. B., 2015).

Анализ общих аминокислот невозможен без стадии пробоподготовки – гидролиза исследуемого белка. Для аминокислотного анализа необходимо, чтобы целевые белки или пептиды были полностью гидролизованы для высвобождения всех аминокислотных остатков. Однако полного ферментативного гидролиза белков до аминокислот все еще не достигнуто, так как «суперфермент», способный гидролизовать каждую пептидную связь не найден. Для решения данной проблемы сегодня применяют комбинирование нескольких протеаз с разной специфичностью. Предложены альтернативы классическому химическому кислотному гидролизу, которые включают последовательную обработку исследуемого объекта различными протеазами для достижения большей полноты гидролиза. Однако кислотный и щелочной (для определения триптофана) гидролиз остался наиболее часто используемым методом пробоподготовки для изучения аминокислотного состава (Masuda A., Dohmae N., 2010.).

Принцип Митчела Х. и Блока Р. (1946), основывающийся на том, что биологическую ценность белка ограничивает лимитирующая аминокислота и что основной характеристикой белковой полноценности пищевых продуктов и рационов является показатель аминокислотного скора, притерпел значительные изменения (Boye J. et al, 2012). Расхождение расчетных показателей и результатов, полученных в медико-биологических исследованиях, а также накопление данных

об изменениях белков в процессе технологической обработки сырья, выявление спектра антиалиментарных соединений, влияющих на их усвояемость (фитиновая кислота и ингибиторы трипсина) привело к тому, что в 1989 г. экспертами ФАО/ВОЗ был предложен критерий PDCAAS, учитывающий при расчете аминокислотного скора усвояемость соответствующего белка, с учетом общей (фекальной) усвояемости, характеризующейся азотным балансом между азотом потребленной пищи и азотом фекалиев (Schaafsma G., 2000).

PDCAAS в настоящее время используют для рутинной оценки переваримости белка многокомпонентных продуктов. Однако он нецелесообразен при оценке качества белка продуктов, которые составляют основную долю рациона, например, детских смесей, продуктов энтерального питания, новых источников белка и дополнительных продуктов питания, потенциально содержащих антипитательные факторы. За последние 30 лет были получены данные, доказывающие правильность использования показателя т.н. истинной усвояемости, раскрывающий баланс азотистых веществ на участке «ротовая полость – тонкий кишечник», для понимания обеспеченности физиологических потребностей человека.

Это привело к тому, что в 2011 г. экспертами ФАО/ВОЗ рекомендовано рассматривать аминокислоты как отдельные питательные вещества и вносить двойную поправку – для белка и аминокислот (АК) отдельно. Современная методика расчета биологической ценности продуктов и рационов DIAAS, основанная на массиве данных относительно истинной усвояемости отдельных АК, учитывает биологическую доступность НАК конкретно в подвздошной кишке тонкого кишечника (Moughan P. J. et al, 2005; Махинько, В. Н. с соавт., 2017). Данная методика, ввиду максимальной близости полученных результатов к данным клинических испытаний, является наиболее точным показателем усвоения белка, учитывает перевариваемость НАК в подвздошной кишке, что обеспечиват высокую достоверность расчетной оценки биологической ценности существующих и разрабатываемых пищевых продуктов (Gilani G. S., 2012; Hendriks W. H. et al, 2012; Fuller M., 2012; FAO, 2013).

PDCAAS и DIAAS, раскрывающие информацию об аминокислотном профиле, необходимо корректировать с учетом критериев усвояемости рассматриваемого источника белка, которые получают в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, которые широко используются для рутинных исследований пищевых белков или продуктов (Chapman D. G. et al, 1959; Покровский А. А., 1975; Высоцкий В. Г. с соавт., 1976; Высоцкий В. Г. с соавт., 1977; De Souza C. F.V. et al, 2009). Современные исследования оценки биодоступности и биологической ценности белка, продуктов и рационов включает множество критериев (Boye J. at al, 2012). Автором был проведен анализ используемых в научных исследованиях критериев, который в Таблице 8.

Стоит отметить, что при изучении биологической ценности (БЦ) белков необходимо учитывать следующее:

- усвояемость аминокислот аналогична, но не равна усвояемости сырого белка, усвояемость отдельных АК может также варьироваться;
- существует ограниченная способность пищевых аминокислот всасываться в кишечнике, при этом те аминокислоты, которые не полностью всасываются в тонком кишечнике, используются кишечной микробиотой в толстом кишечнике (Fuller M., 2012), в связи с чем оценка переваримости в током кишечнике является более точным показателем, характеризующим биодоступность изучаемого белка;
- в расчетах для получения «истинных» оценок усвояемости необходимо учитывать эндогенный белок, в том числе ферменты желудка и кишечника, муцины и отшелушивающиеся клетки стенки кишечника;
- необходимо учитывать влияние на усвояемость и утилизацию белка пищевой матрицы, в том числе высокое содержание пищевых волокон, возможное присутствие антипитательных факторов, а также технологическая обработка может снижать усвояемость белка и аминокислот (Gilani G. S., 2012).

Таблица 8. Спавнительная таблица основных критериев оценки качества пищевых белков

Методы оценки белка	Принцип/ Уравнение	Недостатки	Ссылка
Аминокислотный скор (C)	$\frac{\text{мг АКх в 1 г исследуемого белка}}{\text{мг АКх в 1 г эталонного белка}} \times 100\%$ Усвоение белка ограничивается той НАК, которая находится в относительном недостатке; первая лимитирующая АК – аминокислота, скор которой самый низкий в белке (АКlim).	• отсутствие данных о биодоступности НАК; • технологическая обработка может изменять состав и структуру АК, их усвояемость; • всасывание АК потенциально может зависеть от длины пептида;	FAO, 1991
Минимальный аминокислотный скор (Cmin, AAS)	$\frac{\text{мг АКlim в 1 г исследуемого белка}}{\text{мг АКlim в 1 г эталонного белка /паттерна требований}} \times 100\%$		
Прогнозируемый коэффициент эффективности белка (P-PER/ ePER)	1) $-0{,}684 + 0{,}456 \times \text{Leu} - 0{,}047 \times \text{Pro}$ 2) $-0{,}468 + 0{,}454 \times \text{Leu} - 0{,}105 \times \text{Tyr}$ 3) $-1{,}816 + 0{,}435 \times \text{Met} + 0{,}780 \times \text{Leu} + 0{,}211 \times \text{His} - 0{,}944 \times \text{Tyr}$, где: Leu – лейцин, Pro – пролин, Tyr – тирозин, Met – метионин, His – гистидин.	• не измеряет истинную эффективность белка;	Alsmeyer R.H., 1983; Biel W. & Jaroszewska A., 2019
Прогнозируемая биологическая ценность (P-BV)	$10^{2,15} \times q_{\text{Lys}}^{0,41} \times q_{(\text{Phe+Tyr})}^{0,60} \times q_{(\text{Met+Cys})}^{0,77} \times q_{\text{Thr}}^{2,4} \times q_{\text{Trp}}^{0,21}$		Mørup I. & Olesn, E., 1976.
Кажущаяся перевариваемость АК (APD) **Метод *in vivo***	$\frac{(I-F)}{I} \times 100$, где I – белок, потребленный с пищей; F – белок фекалий (в эксперименте с изучаемым белком).	• не учитывает концентрацию и биодоступность НАК; • не учитывает эндогенный белок в фекалиях;	Gilani G.S. & Sepehr E., 2003
Истинная перевариваемость белка (CPD, TD) **Метод *in vivo***	$\frac{I-(F-F^0)}{I} \times 100$, где I – белок, потребленный с пищей; F – белок фекалий (в эксперименте с изучаемым белком); F 0 – эндогенный белок фекалий (на безбелковой диетой).	• не учитывает концентрацию и доступность НАК;	

продолжение Таблицы 8

Перевариваемость белка **Метод *in vitro***	210,46-18,10×X, где X – pH при гидролизе образца через 10 мин.	• не измеряет истинную усвояемость (расчётный метод); • не учитывает концентрацию и доступность НАК;	Hsu H.W., 1977
Азотистый баланс (АБ, NB) **Метод *in vivo***	$I - (F - U)$, где I – азот, потребленный с пищей; F – азота фекалий (в эксперименте с изучаемым белком); U – азот мочи.	• большой пул мочевины в организме указывает на длительную задержку в выявлении очевидности поступления/ выхода азота; • необходим поправочный коэффициент в расчетах; • фактические минимальные физиологические потребности не учтены;	FAO, 1991; WHO/FAO/UNU, 2007
Коэффициент эффективности белка (КЭБ, PER) **Метод *in vivo***	$\frac{(B - B^0)}{I}$, где B0 – масса тела животного в начале опыта; B – масса тела животного в конце опыта; I – суммарное количество белка, потребленного животным за тот же период, г.	• потребность крыс в некоторых АК выше, чем у людей; • белок, используемый для обслуживания организма, не учитывается; • увеличение массы тела не всегда соответствует увеличению белка в организме; • значения варьируются в зависимости от уровня потребления белка; • низкая точность и воспроизводимость;	FAO, 1991

продолжение Таблицы 8

Максимальная эффективность белка (PERmax)	Определяется как PER к оптимальному уровню пищевого белка (эталон)	• те же, что и у КЭБ, за исключением определения оптимального потребления белка.	Buamah T. F. & Singsen E. P., 1975
Коэффициент чистой эффективности белка (КЧЭБ, HPR)	$\frac{(\Delta B - \Delta B^0)}{I}$, где ΔB – прирост массы тела экспериментальных животных, г; ΔB0 – потеря веса животных на безбелковой диете; I – суммарное количество белка, потребленного животным за тот же период.	• те же, что и КЭБ	Sarwar G., 1997
Чистое использование белка (NPU)	Доля полученного белка сохраняется $\frac{(0{,}16\times I)-(U+2)-(0{,}1\times B)}{(0{,}16\times I)}$, где I – белок, потребленный за 24 ч, г; U – азот мочи, экскретируемый за 24 ч; B – масса тела животного, кг.	• измеряется, когда содержание белка в рационе ниже необходимого; может быть неуместен, когда рацион адекватен;	WHO/FAO/UNU, 2007
Индекс белка (PR)	Оптимальная суточная доза белка ×PER		
Относительная питательная ценность (RNV)	Отношение употребленной пищи и эффективности переваривания (усвояемости) питательных веществ	• те же, что и для PER и NB; • не подходит для образцов с лимитирующей АК Lys; • не учитывает метаболические потери азота;	Addo K. et al, 1996
Очевидная биологическая ценность (ABV)	Доля полученного азота сохраняется $\frac{(I-F-U)}{I-F)} \times 100$, где I – азот, потребленный с пищей; F – азота фекалий (в эксперименте с изучаемым белком); U – азот мочи.		

продолжение таблицы 8

Истинная биологическая ценность (БЦ, TBV)	Доля полученного азота, удерживаемого с учетом метаболических потерь азота $\frac{I-(F-F^0)-(U-U^0)}{I-(F-F^0)} \times 100$, где I – азот, потребленный с пищей; F – азота кала (в эксперименте с изучаемым белком); F^0 – эндогенный азот фекалий (в эксперименте с безбелковой диетой); U – азот мочи (в эксперименте с изучаемым белком); U^0 – эндогенный азот мочи (в эксперименте с безбелковой диетой).	• не учитывает факторов, влияющих на усвоение белка и его взаимодействия с другими веществами до всасывания; • измеряется, когда содержание белка в рационе ниже необходимого; неуместен, когда рацион адекватен; • сильно варьирует в зависимости от количества потребленного белка; • для разных продуктов может быть одинаковой при низком потреблении белка и сильно варьировать при высоких уровнях потребления; • белки, лишенные одной НАК могут иметь БВ до 40.	FAO/WHO/UNU, 1985; Schaafsma G., 2000; Srikantia S. G., 1981.
Относительная биологическая ценность (rBV)	Биологическая ценность испытуемого белка относительно яичного белка $\frac{\text{БЦ}_{\text{исс}}}{\text{БЦ}_{\text{яйцо}}} \times 100$	• те же что и для БЦ; • при разных уровнях поступления азота различные показатели БЦ: при более низком уровне поступления выкокоценного белка показатель БЦ бкдет низким	FAO/WHO/UNU, 1985

продолжение Таблицы 8

Показатель усваиваемой незаменимой аминокислоты (DIAAS)	$\frac{\text{мг НАК в 1 г исследуемого белка}}{\text{мг НАК в 1 г эталонного белка /паттерн требований}} \times 100\ \%$ Для удобства этот показатель рекомендуется выражать в процентах, для чего наименьшее полученное значение среди всех аминокислот умножают на 100.	• в случае отсутствия полной информации об истинной усвояемости всех НАК допускается производить расчет только для пяти наиболее дефицитных (Lys, Met, Cys, Thr, Trp) • формула эталонного белка меняется (2013), расчет DIAAS для отдельных видов пищевых продуктов и их смесей разный; • не оценивает использование АК после их всасывания.	FAO, 1991;
Усвояемость белка скорректированного аминокислотным скором PDCAAS	Основывается на определении содержания белка, АК профиля и перевариваемости белка $\frac{\text{мг АКlim в 1 г исследуемого белка}}{\text{мг АКlim в 1 г эталонного белка /паттерн требований}} \times$ $\times$ истинная фекальная переваримость $\times$ 100 %	• усекаются до 100% или 1, что ограничивает сравнение разных по составу АК белов; • не учитывают антипитательные факторы; • необходимость внесения поправок на биодоступность отдельных АК; • оценка переваримости азота в фекалиях переоценивает биодоступность АК (переваривания кишечной микрофлорой); • отсутствие стандартизированных методов определения перевариваемости АК; • нет данных о возрастных различиях в перевариваемости АК в фекалиях и подвздошной кишке; • люди потребляют белок из различных источников, значения отдельных источников могут не иметь практического применения.	FAO, 1991; WHO/FAO/UNU,2007; Sarwar G., 1997; Gilani G. S., Sepehr E., 2003; Srikantia S. G., 1981.

Стоит отметить, что в настоящее время для расчетов нутриентной адекватности и сбалансированности состава поликомпонентных продуктов разрабатываются методики *in silico*. Созданы и совершенствуются отечественные компьютерные программы для разработки пищевых продуктов сбалллансированных по основным нутриентам (Никитина М. А., Сусь Е. Б. (а) 2015; Лисицын А. Б. с соавт., 2016; Бруевич Н. А., Никитина М. А., 2020), активно формируются информационно-аналитические системы и базы данных основных сырьевых источников и продуктов питания, базирующиеся на результатах широкомасштабных физико-химических исследованиях нутриентного, аминокислотного и жирнокислотного составов. Среди наиболее используемых стоит отметить «Справочник химического состава пищевых продуктов» (Никитина М. А., Сусь Е. Б. (б), 2015), «Химический состав пищевых продуктов, используемых в Российской Федерации» (http://web.ion.ru/food/FD_tree_grid.aspx), USDA Food Composition Database (https://fdc.nal.usda.gov), FAO/INFOODS Food Composition Databases (http://www.fao.org/infoods).

Описанные подходы нашли продолжение в совместной с ФГАНУ «ВНИМИ» экспериментальной работе по изучению биологической ценности белков творога, выработанного с применением микробной трансглутаминазы по традиционной технологии. В рамках данной работы в экспериментах in vivo оценивали многие из приведенных выше критериев, в том числе аминокислотный скор и коэффициенты эффективности белка, истинную усвояемость азота, азотный баланс. В результате установлено, что ферментативная модификация белков молока позволяет увеличить биологическую ценность и усвояемость белка творога, детально результаты представлены в публикациях Зобковой З. С. с соавт. (2017, 2018).

Приведенный обзор современных критериев оценки биодоступности и биологической ценности пищевых продуктов и белков может с успехом применяться в научной деятельности. Однако существует необходимость в разработке стандартизированного метода *in vitro* переваримости АК в кишечнике, а также базы данных, включающей значения переваримости аминокислот в кишечнике для наиболее распространенных пищевых продуктов.

Далее представлены результаты проведенного нами теоретического анализа и экспериментального обоснования протеомных технологий, применяемых для изучения функциональных белковых соединений.

Типирование и идентификация таких соединений возможны с использованием прикладной протеомики, традиционным методом которой является электрофоретическое разделение белков по молекулярной массе (Westermeier R. et al, 2008; Brewis I. A., Brennan P., 2010).

Традиционно молекулярно-массовое распределение белков сырья и пищевых продуктов осуществляют методом одномерного и двумерного гель-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующей визуализацией путем окрашивания гелей Кумасси G-250 и азотнокислым серебром (Чернуха И. М. с соавт., 2016; Ахремко А. Г. с соавт., 2017; Чернуха И. М., Ахремко А. Г., 2018). Использование градиентного акриламидного геля (4 – 10 %) позволяет разделять белки с ММ от 5 до 400 кДа (Laemmli U. K. 1970). Соотнесение выявленных полос фракций белка с полосами маркерных белков на одномерной электрофореграмме позволяет сделать заключение о составе исходного белка и молекулярной массе каждой фракции.

Использование одномерного электрофореза использование может быть ограниченным в связи со сложностью идентификации конкретных белков, ввиду того, что в одной полосе присутствует несколько белковых соединений, как мажорных, так и минорных, которые, как правило, и характеризуют биологическую специфичность действия.

Внедрение в общелабораторную практику высокоразрешающего двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (ДЭ) по методу О’Фарелла, претерпевшего с 1975 г. по настоящее время множество различных модификаций и вариаций, укрепился как наиболее эффективный метод для получения точных и достоверных результатов в исследовании белкового профиля. Данный метод позволяет создавать протеомные карты, где каждое «пятно» имеет известную молекулярную массу и изоэлектрическую

точку, которые соответствуют определенному белку или группе белков (O'Farrell P. H., 1975). При этом изменения в интенсивности пятен на геле или их подвижность может свидетельствовать об их модификациях и использоваться в качестве маркеров. Принципиальным прорывом стало внедрение методов масс-спектрометрии, позволяющих определять молекулярную массу пептидов в смеси (Ji Q. at al, 2015).

Масс-спектрометрия, принцип которой заключается в разделении потока ионов исследуемого объекта по массам, сегодня является самым распространенным методом для идентификации белков благодаря своей высокой точности и достоверности. Для получения смеси пептидов из белкового материала проводят гидролиз. Чаще всего для этой цели применяют трипсин, позволяющий получить смесь пептидов массой от 500 до 4000 Да. Широкое использование трипсина поджелудочной железы свиньи или крупного рогатого скота при гидролизе образцов белка для протеомного анализа, обусловлено его высокой специфичностью и образованием умеренно больших фрагментов белковых цепей с основным С-концом, которые подходят для тандемного масс-спектрометрического анализа (Giansanti et al., 2016). Кроме того, показано, что для подготовки проб для протеомных исследований возможно использование не только трипсиноподобных ферментов (Trevisol A. et al, 2016; Tavano O. L. et al, 2018).

Для идентификации белков и пептидов сегодня используют времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS, MALDI-TOF-MS) и электрораспылительную ионизацию – масс-спектрометрию с квадрупольной ионной ловушкой (ESI-Q-IT-MS), которая часто используется для получения данных о пептидных последовательностях (Демидов Е. А., 2016; Замаратская Г., 2017). Широкое распространение получила комбинация MALDI-TOF-масс-спектрометрии с классическим гель-электрофоретическим разделением белков для их идентификации. В исследовании Susnea I. с соавт. (2013), показано преимущество использования неокрашенного геля для анализа

MALDI-MS (для детекции пятен при их вырезании используется естественная флуоресценция ароматических белковых аминокислот при 343 нм), заключающееся в ускорении процесса исследования, более низких пределах обнаружения и уменьшении фона при анализе MALDI-MS. Идентификацию и биоинформационный анализ полученных спектров проводят с использованием международных баз поиска и идентификации данных.

В соответствии с вышеописанным, принципиальная схема изучения функционально значимых белков включает выполнение одномерного и двумерного электрофореза, последующий сайт-специфичный протеолиз отдельных белковых и пептидных фракций, получение масс-спектра образовавшихся пептидов и компьютерный анализ полученного спектра пептидов с существующими базами данных для идентификации исходного белка (MASCOT MS/MS или другие в зависимости от целей исследования с последующей идентификацией в UniProt Protein Database, PepBank Database). Данная схема, сочетающая традиционные и современные методы с высокой разрешающей способностью, а также доступность мировых белковых баз данных, в достаточной мере отработана в исследованиях протеомного состава мясного сырья продуктивных животных (Shishkin S. S. et al, 2014; Чернуха И. М., с соавт., 2016; Akhremko A., et al, 2020).

В рамках экспериментального обоснования проведена работа по сравнительному изучению мышечных тканей различной локализации (ипси- и контрлатеральной сторон тела) свиней-реконвалесцентов (опыт), ложнооперированных свиней (ЛОЖ) и и свиней, не подвергшихся модификации (контроль) протеомными методами.

Методом одномерного электрофореза в образцах мышечных тканей и мозга свиней свиней был выявлен широкий спектр белковых соединений с высокой молекулярной массой, который представлен на рисунке 5. Значимых отличий как среди опытных и контрольных образцов, так и образцов тканей с разных сторон тела не выявлено. Однако программная обработка позволила

графически визуализировать некоторые изменения в распределении и интенсивности окрашивания белковых фракций на геле (Рисунок 5).

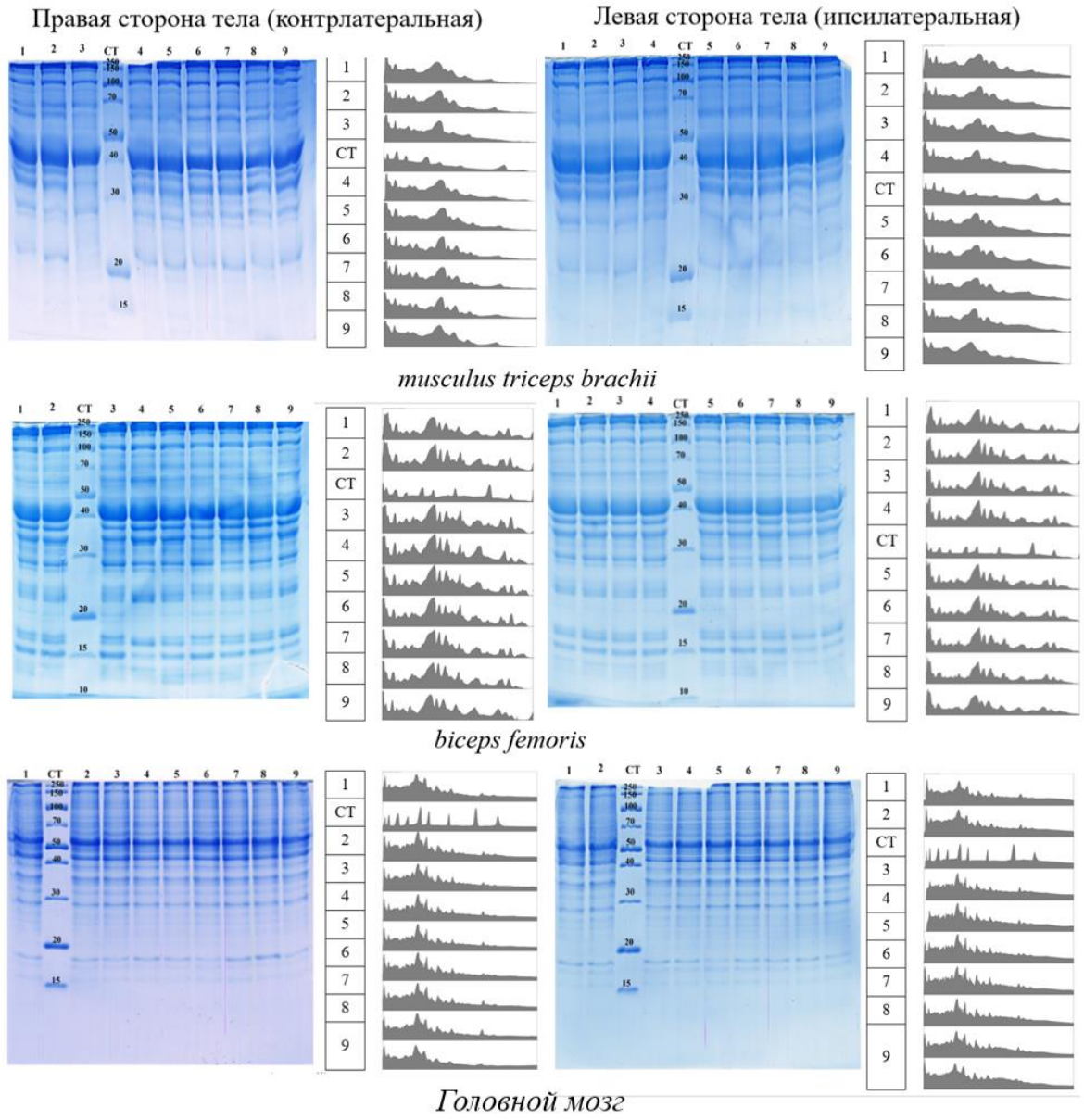


Рисунок 5 – Одномерные электрофореграммы (слева) и графическая визуализация распределения белковых фракций (слева, ПО JmageJ)

В результате обработки данных были получены следующие закономерности (Таблица 9): на графиках плотности для *musculus triceps brachii* (контролатеральная) наблюдалось увеличение интенсивности в диапазоне молекулярных масс (ММ) 30-20 кДа на 3,72% и 3,38% при сравнении мышц ЛОЖ и контроль, и на 6,4% и 5,13% соответственно при сравнении мышц опыт с контролем. Для *musculus triceps brachii*

(ипсилатеральная) выявлено увеличение интенсивности в диапазоне 50-40 кДа на 4,14% в образцах ЛОЖ и на 6,39% в образцах опыт по сравнению с контролем. На графиках плотности для *biceps femoris* отмечено увеличение интенсивности окрашивания фракций в области 40 кДа на 7,73% (контрлатеральная) и 3,05% (ипсилатеральная) при сравнении мышц опыт с контролем.

Таблица 9. Плотность окрашивания белковых фракций на одномерных электрофореграммах.

№ пика	**Мм, кДа**	***musculus triceps brachii***				***biceps femoris***			
		контрлатеральная		**ипсилатеральная**		**контрлатеральная**		**ипсилатеральная**	
		(2)/(1)	**(3)/(1)**	**(2)/(1)**	**(3)/(1)**	**(2)/(1)**	**(3)/(1)**	**(2)/(1)**	**(3)/(1)**
1	250	2,03	0,45	0,07	-3,29	**-3,09***	**-5,23***	**1,64***	3,65
2	150								
3	100	**2,5***	1,14	0,44	1,31	**1,29***	1,63	-0,29	0,22
4	70	-1,62	-1,32	**0,33***	**-0,34***	1,33	0,65	0,52	-0,78
5	50	-6,25	-6,77	4,14	6,39	1,74	1,27	0,52	**0,01***
6	40					**3,57***	**7,73***	1,43	3,05
7	30	**3,72***	**6,4***	-0,21	-1,89	1,03	0,84	-0,76	0,32
8	20	3,38	5,13	-1,09	1,98	-0,06	-0,07	0,27	0,52
9	15	0,48	-0,03	**0,54***	0,8	-1,59	-1,85	**0,93**	**-2,00**

Примечание: (1) – контроль; (2) – ЛОЖ; (3) – опыт; * - отличия при $p<0,01$.

При анализе графиков плотностей для ткани ипсилатерального полушария мозга выявлено увеличение интенсивности белковых фракций в области 100 кДа (на 2,03 %), 70 кДа (на 3,51 %), 40 кДа (на 4,09 %) у ЛОЖ, уменьшение в области 50 кДа (на 4,34 %) и увеличение в области 40 кДа (на 4,8 %) в образцах опыт по сравнению с контролем. В образцах контрлатерального полушария мозга выявлено увеличение плотности окрашивания белковых фракций в области 250 кДа, 70 кДа и 50 кДа на 1,47 %, 2,89 % и 3,69 %, соответственно, для ЛОЖ и на 4,14 %, 1,73 % и 1,76 % соответственно для опытных образцов.

Таким образом, в тканях ложнооперированных свиней наблюдалось количественное нарастание белковых фракций в диапазоне Мм 40-100 кДа

(для ипсилатерального полушария головного мозга) и в диапазоне 50-70 и 250 кДа (для контрлатерального полушария), в области 30-50 кДа (в мышечных тканях *musculus triceps brachii* и *biceps femoris)*. У свиней-реконвалесцентов отмечено увеличение белков в диапазоне 30-40 кДа (для ипсилатерального полушария мозга), 50-70 и 250 кДа (для контрлатерального полушария мозга, в области 40-50 кДа – для мышц l. dorsi и *biceps femoris*, в диапазоне 20-40 кДа – для *musculus triceps brachii*.

Биоинформационный анализ выявленных на одномерных электрофореграммах белковых фракций в мышечных тканях свиней предположительно выявил увеличение содержания белка теплового шока Hsp70 (Мм 70 кДа), экспрессирующегося при повреждениях различного генеза; цепей тропомиозина альфа-1 (Мм 32,7 кДа) и альфа-3 (Мм 33 кДа), связывающихся с актиновыми филаментами в мышечных и немышечных клетках. Предположительно, фракция белков в диапазоне 20-40 кДа проявляется сильнее в тканях мозга свиней-реконвалесцентов за счет увеличения содержания нейротрофического фактора роста и дифференциации нейронов и синапсов головного мозга BDNF (28,3 кДа), способствующего выживанию и дифференциации нейронов периферической и центральной нервной системы. Изменение экспрессии данного нейротрофина может быть связано с дегенерацией нейронов (Longo F. M., Massa S. M., 2014). Увеличение интенсивности фракций в диапазоне 40-50 кДа может быть вызвано повышением экспрессии креатинкиназы М-типа (43 кДа), В-типа (42,7 кДа), U-типа (47 кДа), участвующих в переносе энергии в тканях с сильно колеблющимися потребностями в энергии, в том числе в скелетных мышцах и мозге. Нарастание интенсивности окрашивания белковых фракций в диапазоне 50-60 кДа возможно обусловлено повышенной экспрессией ангиопоэтина-2 (56,9 кДа), уменьшающго отек мозга, что продемонстрировано в работе Li J., Li C. S., Yuan W. et al., 2017).

Протеомное изучение головного мозга свиней методом двумерного электрофореза с последующим анализом изображений выявил порядка 700

пятен в каждом геле, при этом порядка 400 пятен являлись конститутивно присутствующими для обоих полушарий мозга. Сравнение ипсилатерального и контрлатерального полушария мозга контрольных свиней выявило группу фракций характерных для контрлатерального полушария мозга в диапазоне 57-60 кДа, пять белков в диапазоне 40-50 кДа, три белка с Мм 29-33 кДа и семь белков с Мм 16-27 кДа, отмеченные красным цветом и фигурными стрелками на Рисунке 6, А.

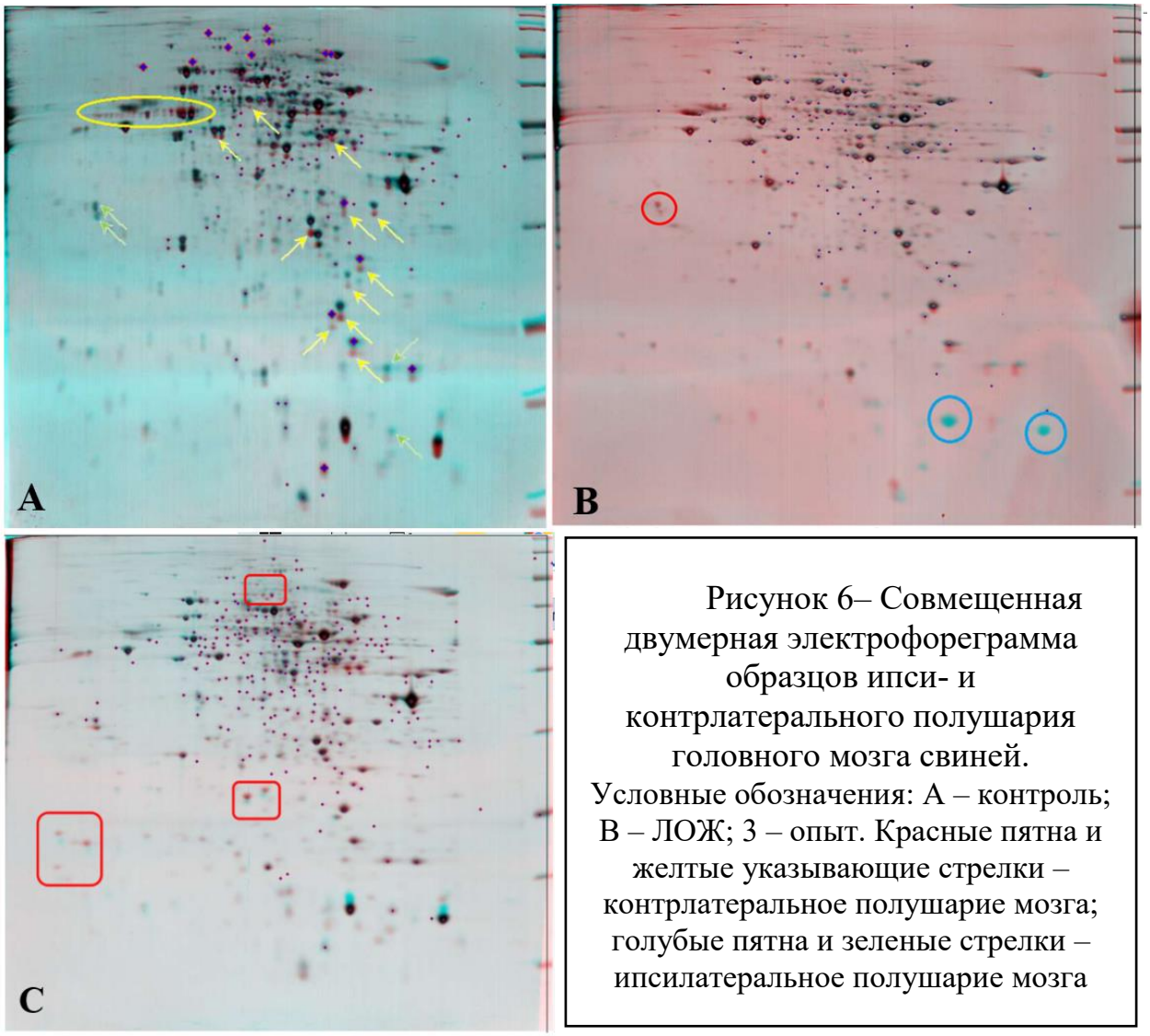


Рисунок 6– Совмещенная двумерная электрофореграмма образцов ипси- и контрлатерального полушария головного мозга свиней. Условные обозначения: А – контроль; В – ЛОЖ; 3 – опыт. Красные пятна и желтые указывающие стрелки – контрлатеральное полушарие мозга; голубые пятна и зеленые стрелки – ипсилатеральное полушарие мозга

Для ипсилатерального полушария мозга интактных животных отмечено всего четыре белковых пятна в диапазоне 32,5-33,0 кДа, 17,0 кДа и 13,0 кДа, выделенные голубым цветом на Рисунке 6, А. Интересно, что у ложнооперированных животных в ипсилатеральном полушарии отсутствуют

две фракции в 13,0 кДа и 13,4 кДа, которые интенсивно проявляются в контрлатеральном полушарии (Рисунок 6,В) и предположительно являющиеся альфа-эндосульфином (ENSA, 13,4 кДа), действующим как стимулятор секреции инсулина, и пептидом, стимулирующий кальцитониновый рецептор 2 (CRSP-2, 13,0 кДа), соответственно. При этом, в ипсилатеральном полушарии ложнооперированных свиней более выражены два белка с массой 32,6 и 33,0 кДа (рисунок 6, В), присутствующие и у интактных животных, вероятно являющиеся 5-гидрокситриптамин рецептором 1D (HTR1D, 32,6 кДа), функционирующий как рецептор для различных алкалоидов и психоактивных веществ, регулирующий высвобождение 5-гидрокситриптамина в мозге и тем самым влияет на нервную активность, играющий роль в вазоконстрикции; и транскрипционным фактором 1 (POU1F1, 33,0 кДа), участвующий в спецификации фенотипов лактотропа, соматотропа и тиреотропа в развивающейся передней доли гипофиза.

В опытных образцах изменения по большей части происходили в области ниже 25 кДа и 76-90 кДа по сравнению с интактными и контрольными образцами (рисунок 6, С). В контрлатеральном полушарии опытных животных обнаружен белок с молекулярной массой 86 кДа, предположительно амилоид-бета белок А4 (APP, 86,9 кДа), функционирующий как рецептор клеточной поверхности и выполняющий физиологические функции на поверхности нейронов, связанные с ростом нейритов, адгезией нейронов и аксоногенезом.

Для получения более достоверных отличий было проведено сравнение совмещенных двумерных электрофореграмм по полушариям: контроль-ложнооперированные и ложнооперированные – опыт (Рисунок 7).

При сравнении тканей мозга контрольных свиней с ложнооперированными было обнаружено пять областей различающихся белков, в основном были отмечены изменения в контрлатеральном полушарии мозга: появление фракции в области 90 кДа и семь ранее не обнаруженных белков в области от 20 кДа до 40 кДа. В случае сопоставления образцов ложнооперированных и опытных животных были выявлены совершенно иные

белковые пятна как в ипсилатеральном, и в контрлатеральном полушарии мозга. Выявлено шесть областей белков в диапазоне 30-50 кДа: три фракции с Мм 46 кДа и один белок – 44 кДа для опытных образцов в ипсилатеральном полушарии мозга, и две белковые фракции в диапазоне 30 кДа и 43 кДа для контрлатерального полушария. Так же отмечено три белка с Мм 37 кДа и два белка в диапазоне Мм 44 кДа в ипсилатеральном полушарии мозга, белковые пятна с Мм 34 кДа и 40 кДа в контрлатеральном полушарии мозга для ложнооперированных животных.

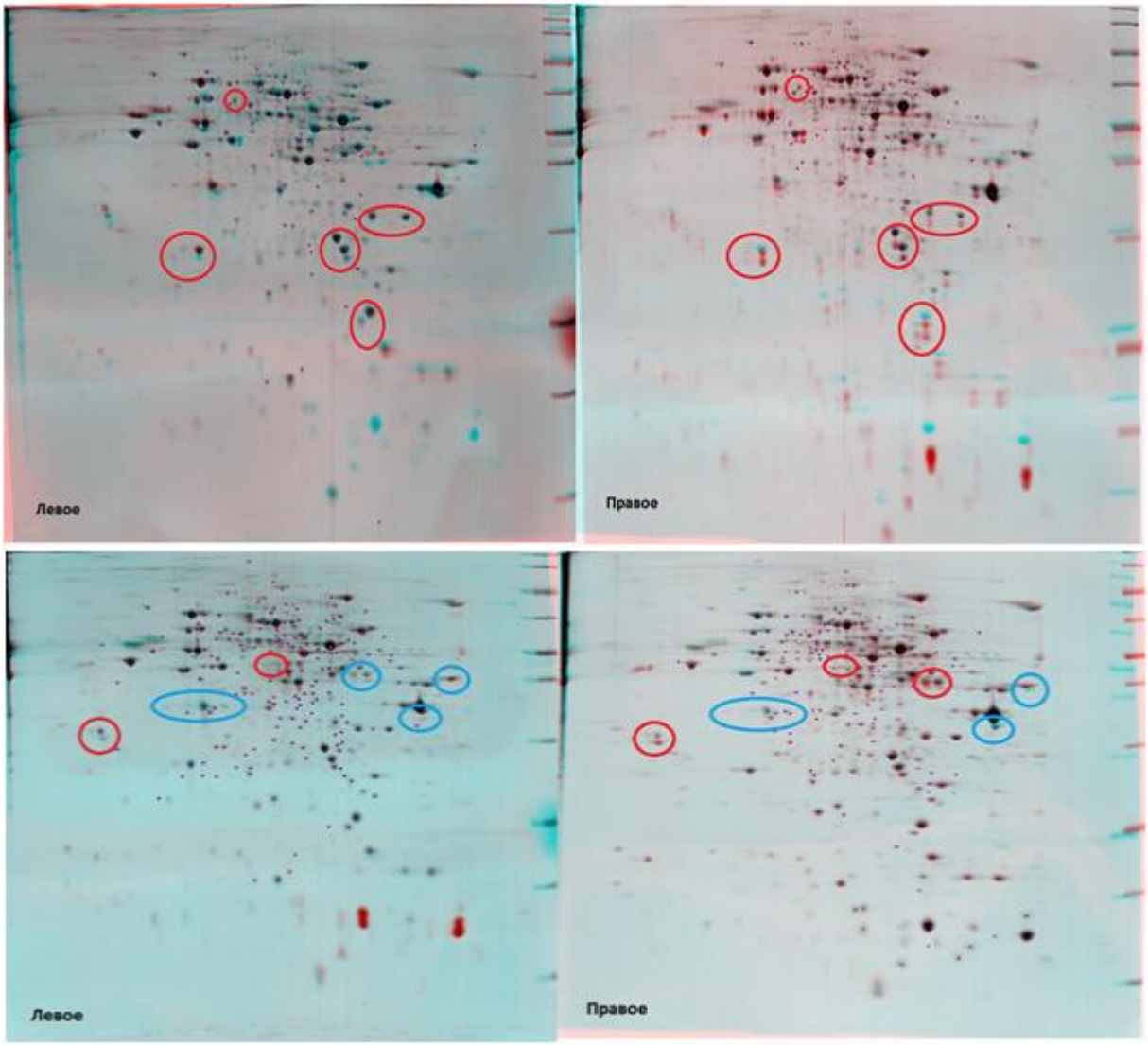


Рисунок 7 – Совмещенная двумерная электрофореграмма образцов головного мозга свиней. Условные обозначения: А – совмещение электрофореграмм «контроль»/ «ЛОЖ»; В – «ЛОЖ»/»опыт»; левое – ипсилатеральное полушарие головного мозга (в которое производили

воздействие; правое – контрлатеральное полушарие головного мозга (противоположное)

Таким образом, маркерными белками для опытных животных выбраны: фракция 30,37 кДа (предположительно йодтирониндейодиназа II типа, необходимая для обеспечения мозга соответствующими уровнями 3,5,3'-трийодтиронина в критическом периоде; фракция 40,61 кДа (предположительно рецептор ноцицептина, играющий роль в регуляции двигательной активности с помощью нейропептида ноцицептина; фракция 43,5 кДа (предположительно тубулин – тирозинлигаза, катализирующая посттрансляционное добавление тирозина к С-концу детерозинированного альфа-тубулина; фракция 43,97 кДа (предположительно лактозилцерамид 1,3-N-ацетил-бета-D-глюкозаминилтрансфераза, играющая ключевую роль в синтезе углеводных цепей лакто- или неолактогенного ряда на гликолипидах; фракция 46,5 кДа.. Используя базу данных UniProtKB/Swiss-Prot, удалось определить вероятно присутствующие белки в тканях головного мозга свиней (Приложение Б).

Результаты изучения мышечных тканей musculus triceps brachii методом двумерного электрофореза приведены на рисунке 8. При анализе электрофореграмм выявлены изменения фракции миозиновых легких цепей (MLC, 19,0-22,5 кДа, pI 4,95-5,24) и компоненты пируват дегидрогеназы (PDHB, 33,5 кДа, pI 5,50). В образцах тканей ложнооперированных свиней по сравнению с интактными выявлена деградация вышеупомянутых белков, в то время как у опытных животных происходит нарастание интенсивности данных фракций, изменениям также подверглись цепи тропомиозина. Стоит отметить появление в опытных образцах индивидуального белка в кислотной зоне геля с Мм14,3 кДа и pI, который в перспективе может являться маркерным.

Биоинформационный анализ выявленных фракций в тканях свиней-реконвалесцентов позволил предположить присутствие: белка теплового шока Hsp70 (Мм 70 кДа, pI 5,27); тропомиозина (Мм 33,5 кДа, pI 4,71);

нейротрофина-3 (Мм 13,7 кДа, pI 9,34), нейротрофического фактора головного мозга (Мм 13,5 кДа, pI 9,59) и его предшественника (Мм 26,2 кДа, pI 8,98). При этом отмечено уменьшение степени выраженности пятен лёгкой цепи миозина 2 (Мм 19 кДа, pI 4,95) и яркое проявление белков креатинкиназы (Мм 41 кДа, pI 6,75) и тропонина Т (Мм 31 кДа, pI 6,80).

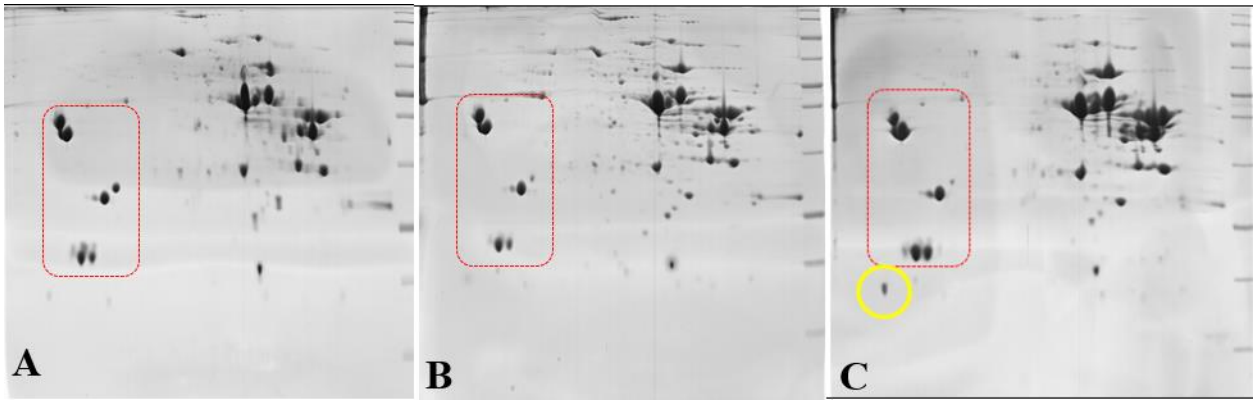


Рисунок 8 – Двумерные электрофореграммы мышц свиней

Таким образом, в результате сравнительного биоинформационного анализа протеома тканей головного мозга среди 139 белков, определены возможные 80 соединений, обладающие биологическими эффектами, среди которых порядка 30 могут проявлять нейротрофические и ангиогенезные свойства (факторы роста, нейротрофины и пр.). Их наличие в мышцах свидетельствует о высоком потенциале сырья, которое вполне может применяться для производства специализированных продуктов, обладающих нейрореабилитационным действием.

Общим результатом проведенных сравнительных исследований мясного сырья, полученного от свиней реконвалесцентов, является доказательство необходимости применения протеомного анализа для выявления макерных белков. Стоит отметить, что рассмотренные протеомные технологии, применяющиеся сегодня для изучения белков растительного и животного происхождения (Toldrá F., Nollet, L., 2013), имеют значительный потенциал для изучения специализированных и функциональных продуктов питания и ингредиентов.

Оценка веществ липидной природы

Методы извлечения веществ липидной природы из матрицы, в том числе биологической, широко описаны (Иванкин А. Н., 1998; Неклюдов А. Д. Иванкин А. Н., 2003; Christie W. W., Han X., 2003; Акмурзина В. А. с соавт., 2012; Морозова Н. С. с соавт., 2012) и включают жидкостную экстракцию с использованием различных растворителей (неполярных – гексана, петролейного эфира – для экстракции сложных эфиров жирных кислот, ацилглицеринов; полярных – метанол, ацетонитрил – для экстракции фосфолипидов, липопротеинов, гликолипидов) и их сочетаний – метод Фолча с модификациями (Matyash V. et al, 2008); твердофазную и сверхкритическую флюидную экстракцию (Ruiz-Gutierrez V., Perez-Camino M. C., 2000). Для разделения и количественного анализа липидов сегодня широко используют хроматографические методы (Mondello L. at al, 2008), в том числе тонкослойную хроматографию (ТСХ) и высокоэффективную тонкослойную хроматографию (ВЭТСХ) в сочетании с денситометрией, позволяющей провести быстрый скрининг всех классов липидов в образце; газовую хроматографию (ГХ) с пламенно-ионизационным детектированием / масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) / ИК-спектроскопией, позволяющие выявлять жирные кислоты, стерины, нейтральные гликосфинголипиды, диацилглицерин и триацилглицерин, глицерофосфолипиды; жидкостную хроматографию (ЖХ) и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), детектирующие жирные кислоты, глицерофосфолипиды, стерины, сфинголипиды, фенольные липиды, диацилглицерин и триацилглицерин.

Сочетания методов жидкостной хроматографии обеспечивают более детальную и точную оценку некоторых липидов в образце. Например, сочетание ГХ/ГХ позволяет определять жирные кислоты, стерины, жирные эфиры; ЖХ/ЖХ – триацилглицерин; ЖХ/ГХ – триацилглицерин, стерины, жирные кислоты (Акмурзина В. А. с соавт., 2012). Для разделения нескольких классов липидов или соединений, принадлежащих к одному классу липидов

также применяют капиллярный электрофорез (КЭ), с помощью которого возможно изучение следующих классов липидов: жирные кислоты, сфинголипиды, глицерофосфолипиды, кардиолипины (Hancu G. et al, 2015).

Развитие масс-спектрометрии, высокая селективность и чувствительность масс-спектрометров и возможность их комбинирования с хроматографической техникой (первичное разделение ГХ, ВЭЖК) привело к разработке методов, позволяющих получить данные о молекулярной массе, элементном составе и изотопном распределении, структурной информации и наборе фрагментов соединения. Сегодня существует огромное количество публикаций с описанием методологии проведения исследований с сочетанием методов ГХ и МС (Ivanova P. T. et al, 2004; Knittelfelder O. L. et al, 2014.).

В последние годы для липидного анализа отдается предпочтение таким методам, как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), универсальный метод, позволяющий качественно и количественно проанализировать молекулярную структуру сложных смесей (Diehl B.W.K., 1998), а в сочетании с ВЭЖХ становится мощным методом разделения и структурного определения неизвестных соединений в сложных биологических матрицах; колебательная спектроскопия, позволяющая обнаружить изменения в режиме *real time* в естественных условиях без использования каких-либо меток и с пространственным разрешением в мкм-диапазоне. Колебательная спектроскопия включает в себя: метод ближней ИК-области (NIR) – детекция жирных кислот и стероидных липидов; спектроскопия комбинационного рассеяния (Raman) – детекция глицерофосфолипидов, стероидных липидов и сфинголипидов и ИК-спектроскопию с Фурье преобразованием (FTIR) – детекция жирных кислот (Wójcicki K. et al, 2015; Herrero A. M. et al, 2017; Shukla A. K., 2020).

Биоинформационный анализ полученных спектров также проводят с использованием международных баз поиска и идентификации данных. Таким образом, для изучения липидов как в пищевых продуктах и ингредиентах, так и биологических жидкостях применяется широкий спектр аналитических

методов. Однако ни один из рассмотренных методов не позволяет достичь полного профилирования липидов, в связи с чем использование разнообразных сочетаний и дополнительных методов позволит получить более полную информацию об исследуемом образце (Magdi M. et al, 2014; Cruz R. M. S. et al, 2014). Жирные кислоты, включающие неэтерифицированные (ненасыщенные, свободные, НЭЖК), в т.ч. мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК, MUFA) и полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК, PUFA), и этерифицированные (насыщенные, НЖК), образующиеся при расщеплении триглицеридов и фосфолипидов, являются основными компонентами пищевых жиров. Как биологические соединения, жирные кислоты играют важную роль в метаболизме, здоровье и развитии различных заболеваниях (сердечно-сосудистые заболевания (Wu H. et al, 2020), неврологические заболевания (Langley M. R. et al, 2020), неалкогольная жировая болезнь печени (Rasineni K., Casey C. A., 2012).

В настоящее время для характеристики жирнокислотного состава сырья и продуктов применяются различные индексы (Chen J., Liu H., 2020), позволяющие предположить их влияние на здоровье человека, в том числе пациентов подверженных различным заболеваниям.

В таблице 10 представлен сравнительный анализ критериев оценки жирнокислотного состава.

По мнению автора, рассмотренные критерии оценки жирнокислотного состава могут применяться как для мясного сырья и отдельных ингредиентов, так и для многокомпонентных продуктов питания, в том числе специализированного и функционального

Таблица 10. Сравнение методов оценки биоэффективности сырья и продуктов по расчетным индексам их жирнокислотного состава

Наименование	Принцип, формула	Недостатки	Ссылка
Отношение общего содержания ПНЖК к общему содержанию НЖК	$\frac{\Sigma \text{ПНЖК}}{\Sigma \text{НЖК}}$ Наиболее часто используемый индекс для оценки пищевой ценности продуктов, его влияния на ССЗ. Предполагается, что все ПНЖК в рационе могут снижать уровень ОХ и ОХ ЛПНП, в то время как все НЖК способствуют повышению ОХ в сыворотке крови. Чем выше это соотношение, тем больше положительный эффект. Для мяса и мясопродуктов: 0,11 – 2,042. Рыбы и рыбных продуктов: 0,50 – 2,10.	• не учитывает вклад МНЖК, повышающих активность рецепторов ЛПНП и снижающих ОХ в сыворотке крови; • не все НЖК одинаково влияют на ОХ (С18:0 биологически нейтральна); • не все ПНЖК положительно влияют на профилактику ССЗ.	Dietschy J. M., 1998; Wu H., Xu L., Ballantyne C. M., 2020
Индекс атерогенности (ИА, IA)	$\frac{[\text{C12:0} + (4 \times \text{C14:0}) + \text{C16:0}]}{\Sigma \text{НЭЖК}}$ Указывает на связь между суммой проатерогенных ЖК и суммой НЭЖК. Чем ниже ИА, тем больше положительный эффект. Для сырья: 0,03 –3,58. Для продуктов: 1,42 – 5,13.	• в знаменателе не учтена С18:0, снижающая ОХ ЛПНП; • не все ПНЖК следует оценивать одинаково; • не учитывается влияние трансжиров.	Ulbricht T., Southgate D., 1991; Slastin V.et al, 2015
Индекс тромбогенности (ИТ, IT)	$\frac{(\text{C14:0} + \text{C16:0} + \text{C18:0})}{[0{,}5 \times \Sigma\text{МНЖК} + 0{,}5 \times \Sigma\text{ПНЖК}n6 + 3 \times \Sigma\text{ПНЖК}n6 + \text{n3/n6}]}$ Характеризует тромбогенный потенциал ЖК, учитывая гношение между протромбогенными ЖК и нтитромбогенными. Чем ниже ИА, тем больше положительный эффект	• не учитывает вклад некоторых МНЖК и трансжиров.	

продолжение Таблицы 10

Отношение общего содержания гипохолестеринемических ЖК к гиперхолестеринемическим ЖК (H/H ratio)	$\frac{(\text{cis C18:1} + \Sigma\text{ПНЖК})}{(\text{C12:0} + \text{C14:0} + \text{C16:0})}$ Достаточно точно отражает влияние ЖК состава на ССЗ. Чем ниже ИА, тем больше положительный эффект.	• не учитывает вклад некоторых МНЖК.	Santos-Silva J., Bessa R., Santos-Silva F., 2002
Индекс здоровья (HPI)	$\frac{\Sigma\text{НЭЖК}}{[\text{C12:0} + (4 \times \text{C14:0}) + \text{C16:0}]}$ Обратная величина ИА, чем выше, тем больше положительный эффект. Для мясных продуктов: 1,27 – 2,786. Для молочных продуктов: 0,32 – 1,29. Для рыбных продуктов: 1,54 – 4,83.	• те же недостатки, что и у ИА.	Chen S. et al, 2004
Суммарное содержание эйкозапентаеновой и докозагексаеновой ЖК	$20{:}5(\text{n3}) + 22{:}6(\text{n3})$ Из-за низкого содержания в наземных растениях и животных этот индекс в основном используется для оценки пищевой ценности морепродуктов, особенно рыбы. Рекомендуемое ФАО ВОЗ количество 0,25 – 2 г/сут.	• не применим к большинству видов пищевых продуктов	Rincón-Cervera M. Á.et al, 2020; Burdge G. C., Jones A. E., Wootton S. A., 2002
Соотношение линолевой кислоты и α-линоленовой кислоты (LA/ALA)	$\frac{\text{C18:2 n6}}{\text{C18:3 n3}}$ Используется при оценке пищевой ценности детского питания (в т.ч. детских смесей)		

Оценка и прогнозирование веществ углеводной природы

Физиологическая роль углеводов, являющихся основными нутриентами в организме обширна. Углеводы составляют до 60% от общей калорийности суточного рациона человека, входят в состав структур многих клеток и жидкостей, участвуют в синтезе нуклеиновых кислот, регулируют жировой обмен, противодействуя накоплению кетоновых тел при окислении липидов. Пищевые волокна связывают токсичные вещества в кишечнике, способствуют снижению гнилостной микрофлоры, ХС и желчных кислот, обладают пребиотическими эффектами, позволяют снизить расходование АК на метаболические нужды организма. Для количественного определения моно-, ди-, олиго- сахаров сегодня используют методы ГЖХ (в том числе для выявления: глюкозы, сахарозы, фруктозы, лактозы, арабинозы, ксилозы, галактозы, мальтозы, рафинозы, сорбита и инозита); ВЭЖХ (в том числе для выявления: глюкозы, фруктозы, арабинозы, фукозы, галактозы, ксилозы, лактозы, лактулозы, мальтозы, мальтотриозы, маннозы, сахарозы, раффинозы, стахиозы, сорбита, инозита, мальтита, ксилита, изомальта, лактитола), в том числе обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (для выявления:глюкозы, лактозы, мальтозы, маннозы, сахарозы, фруктозы) (Р 4.1.1672 – 03). Поляриметрически определяют крахмал; гравиметрически – пектин; колориметрически и титрометрически – общий сахар и сахарозу; ферментативным методом – нерастворимые и растворимые пищевые волокна (Р 4.1.1672 – 03; Захарова А. М. с соавт., 2013).

Таким образом, приведенные в главе современные методические подходы к исследованию соединений белковой, липидной и углеводной природы, могут быть применены для изучения как общих показателей продуктов (сбалансированность по аминокислотному и жирнокислотному составу), так и к БАВ, потенциально обладающих специфической активностью. Важно отметить, что применение описанных выше методик позволяет изучить потенциальные БАВ нативно присутствующие в продуктах, образующиеся в процессе переработки и дополнительно внесенные в пищевую матрицу. Однако необходим подбор методик для изучения биологической и, в том числе специфической, активности БАВ. Данному вопросу посвещена следующая глава.

5.2 ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ МЕТОДАМИ *IN VITRO*

Широкое распространение и внедрение в практику методов биологических исследований *in vitro*, дословно – «в пробирке», обусловлено их относительной дешевизной и возможность получать достаточные по объему, воспроизводимые и достоверные экспериментальные данные (Трахтенберг И. М. с соавт., 2008). Данные методы преимущественно используются для изучения ключевого эффекта и механизма действия различных соединений, а в некоторых случаях применяются для прогнозирования токсичности. Биологические методы *in vitro*, где объектами исследования являются культуры клеток, сделали возможным исследование взаимодействия биоактивных веществ напрямую с клеткой и определение их влияния на клеточные и субклеточные структуры, исключая компенсаторные и регуляторные механизмы целостного организма, имеющие место при исследованиях *in vivo* (Holme J. A., Dybing E., 2002). Однако модели *in vitro* требуют постоянного уточнения и совершенствования по мере развития науки и техники, с нахождением компромисса между технологической сложностью и эффективностью.

5.2.1 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МОДЕЛЕЙ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРЕВАРИВАНИЯ НУТРИЕНТОВ ПРОДУКТОВ И СЫРЬЯ, А ТАКЖЕ БАВ

Методы *in vitro* и *ex vivo*, воспроизводящие процессы переваривания и всасывания, сегодня используются для изучения биологической ценности, биодоступности и прогнозирования потенциальных позитивных и негативных эффектов компонентов сырья и продуктов. Для имитации процессов переваривания используют различные статические и динамические модели, общими для которых

является точное имитирование процесса пищеварения и пищеварительных жидкостей предполагаемого объекта – животного или человека. В зависимости от характера исследования предполагаемый анализ должен быть воспроизводимым и более дешевым, чем доступные методы *in vivo*, а также простым в исполнении, давая быстрые результаты. Современные модели пищеварения *in vitro*, описанные в литературе, являются достаточно упрощенными по сравнению с естественными условиями. Такие модели включают в себя ограниченное количество моделируемых параметров: одно- и двухкомпонентных смесей ферментов, кислотно-основной среды, температуры и времени. Так, традиционно для определения степени расщепления и усвояемости белков пищевых продуктов используют методику А. А. Покровского-И. Д. Ертанова, показатели которой рассчитываются как разница в содержании белка до и после переваривания в системе «пепсин-трипсин». Также известны модели на основе панкреатина – например, для изучения молочных гидролизатов (Maeno M. et al, 1996), а также сочетания панкреатина и пепсина для молочных смесей, молочных белков и грудного молока (Hernández-Ledesma B., et al, 2007). Моделирование кислотно-основной среды, температуры и времени преимущественно используется для изучения динамики высвобождения биоактивных соединений из полисахаридных носителей (Каширина Е.И., 2019), ввиду того, что некоторые полисахариды (в частности, альгинат и агароза) не подвергаются воздействию ферментов в верхних отделах пищеварительного тракта и полностью гидролизуются ферментами кишечной микрофлоры в толстом кишечнике (Хотимченко, Ю. С. с соав., 2005). Для обоснования модели кислотно-основной среды было рассмотрено три модели, имитирующие кислотно-щелочную среды отделов ЖКТ (Таблица 11).

Таблица 11. Состав и pH сред, имитирующие условия участков ЖКТ человека

Модель	Модельные растворы, pH	Ссылка
A	Ротовая полость: фосфатный буфер pH 7,0; 10 мин. Желудок: раствор соляной кислоты pH 3,0; 90 мин. Тонкий кишечник: фосфатный буфер pH 7,0; 90 мин.	Каширина Е. И., 2019
B	Желудок: 0,1Н раствор соляной кислоты pH 1,0; 90 мин. Двенадцатиперстная кишка: фосфатный буфер pH 6,0; 30 мин. Тонкий кишечник: фосфатный буфер pH 7,4; 90 мин.	Манаенков О. В., Сидоров А. И., Молчанов В. П., 2010
C	Желудок: раствор соляной кислоты pH 1,5; 60 мин. Двенадцатиперстная кишка: фосфатный буфер pH 6,0; 30 мин. Тонкий кишечник: фосфатный буфер pH 7,4; 60 мин.	Василевская Е. Р., Иванова Е. А., 2019

Апробацию моделей проводили на разработанных белок-полисахаридных матрицах. Характер высвобождения белково-пептидных комплексов оценивали путем измерения белка в модельных растворах во время инкубации.

Установлено, что агарозный гидрогель претерпевал полное растворение в моделях А и В – на фазе «желудка» через 90 и 70 мин; в модели С – на фазе «двенадцатиперстной кишки» через 30 мин. Альгинатные капсулы сохраняли сферическую форму и целостность на фазе «желудка», растворяясь полностью и высвобождая БАВ_2 на фазе «тонкого кишечника»: в модели А через 90 мин; в моделях В и С через 60 мин. Таким образом, выявлена адекватность модели С для изучения деградации полисахаридных капсул и характера высвобождения целевых веществ в условиях, имитирующих кислотно-основную среду отделов ЖКТ.

Для изучения метаболизма нутриентов сложно-компонентных продуктов, а также оценки распада и растворения лекарственных препаратов на основе знаний о физиологических процессах разрабатываются различные модели, достаточно полно воспроизводящие условия ЖКТ. Такие модели, помимо широкого спектра ферментов (альфа-амилазы, трипсина, химотрипсина, липазы, желчных солей) (Minekus M. et al, 2010; Rivera S. et al., 2014), могут включать этап удаления конечных продуктов расщепления или быть дополнены процессом, имитирующим частичные моторные функции желудка. При этом описанные модели не предусматривают тонические и перистальтические сокращения, непрерывное изменение pH и температуры, различные скорости потока содержимого желудка. Для решения этой проблемы были разработаны динамические модели

пищеварения. Среди прочих можно выделить системы, состоящие из последовательных отсеков (Guerra A., 2012). В системе, разработанной Minekus, M. A. с соавторами (1995), в первом отсеке происходит смешение желудочных соков с измельченной пищей, во втором отсеке имитируется перемешивание и сокращение желудка, далее «полупереваренное» содержимое попадает в третий отсек посредством клапана, при этом более крупные частицы нагреваются и с обратным холодильником попадают в предыдущую камеру, чтобы перевариться повторно. Системная модель, разработанная Mainville I. с коллегами (2005), включает «ротовую полость», «желудок», в котором моделируют перемешивание исследуемого объекта с «желудочными соками», и «двенадцатиперстную кишку», в которой в смесь добавляются «дуоденальные соки». В рамках апробации нами выбрана статичная модель экспериментального пищеварения *in vitro* по методу (Minekus M. A., 2014), рассмотренная на рисунке 8.

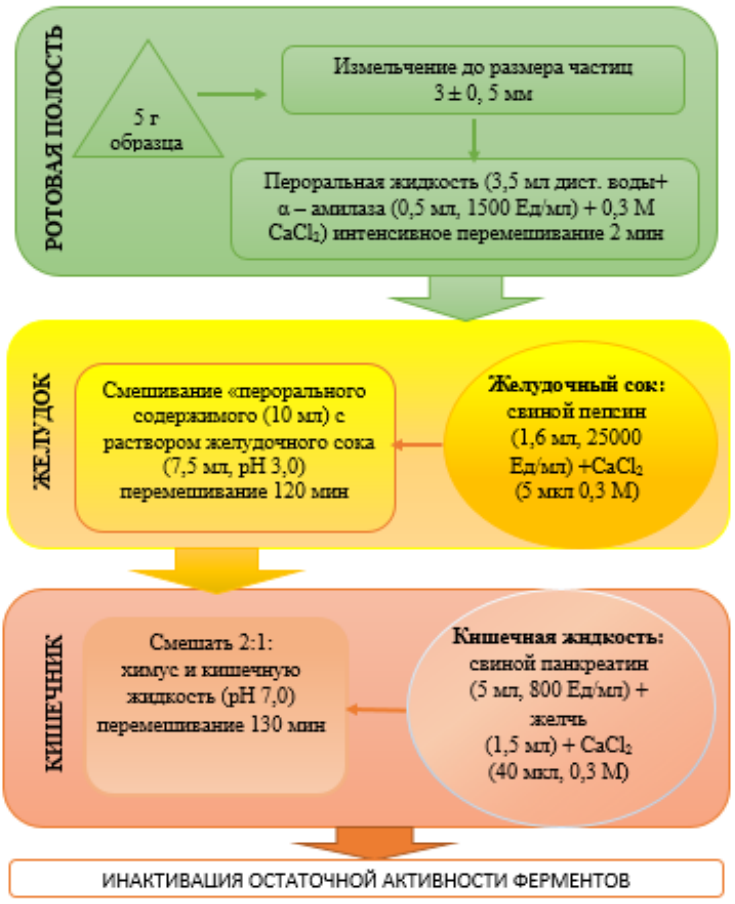


Рисунок 9 – Модель переваривания *in vitro*

Для апробации, представленной на рисунке 8 модели, образцы СМП_1 были подвергнуты воздействию имитированных пищеварительных жидкостей с фиксированным значением pH в течение определенного времени. Для моделирования экспериментального пищеварения все компоненты ЖКТ (слюна, желудочный сок и кишечная жидкость) были предварительно нагреты до физиологической температуры тела человека – до 37 °C. Для имитирования пережевывания твердой пищи производили измельчение соответствующего количества объекта исследования (5 г) с использованием ручной мясорубки. Далее к измельченному образцу добавляли имитационную жидкость ротовой полости (3,5 мл), представляющую собой щелочной раствор (0,5 мл α-амилазы, 25 мкл 0,3 М $CaCl_2$ и 975 мкл воды), перемешивали до образования пастообразной консистенции в течение 2 мин. Имитирование желудочного пищеварения обеспечивали путем смешивания 10 мл жидкого перорального содержимого с 7,5 мл раствора желудочного сока и последующим добавлением 1,6 мл раствора свиного пепсина 25 000 Ед/мл, полученного в исходном растворе желудочного сока и 5 мкл 0,3 М $CaCl_2$. Для снижения pH до физиологического значения в желудке добавляли 1 М HCl и 0,495 мкл воды. Время переваривания составило 60 мин. Далее моделировали кишечное пищеварение, при котором 20 мл желудочного химуса смешивали с 10 мл кишечной жидкости. Пищеварительные ферменты добавляли в виде панкреатина (5,0 мл раствора панкреатина 800 Ед/мл) из свиной поджелудочной железы. Далее добавляли 1,5 мл консервированной желчи и 40 мкл 0,3 М $CaCl_2$. Время кишечного переваривания достигало 60 мин. Для нейтрализации смеси до pH 7,0 добавляли 0,6 мл 1 М NaOH и 986 мкл воды. Оценку степени расщепления нутриентов оценивали измерением количества белка в имитируемых растворах во время инкубации и электрофоретическими исследованиями. Детальное описание полученных результатов представлено в работе (Василевская Е. Р. с соавт., 2019). Установлена тенденция уменьшения концентрации белка и абсолютного его содержания на стадии «желудка», что свидетельствует о накоплении значительных количеств поли- и олигопептидов, образующихся в результате активного гидролиза белков СМП_1 свиным пепсином, расщепляющим центральные пептидные связи.

На стадии «тонкого кишечника» выявлено снижение образования пептидных комплексов с ионами двухвалентной меди, что, в свою очередь, обусловлено накоплением карбоксильных групп аминокислот, а также свободных аминокислот, ввиду специфичности действия трипсина и химотрипсина. С помощью одномерного электрофореза визуализированы продукты гидролиза белков мясного продукта на стадии, имитирующей пищеварение в желудке и кишечнике.

Дальнейшее изучение продуктов расщепления биополимеров пищи необходимо проводить с использованием хромато-масс-спектрометрических методов, описанных в главе 5.1.

Рассмотренные модели переваривания могут быть использованы для изучения характера расщепления основных нутриентов, с акцентом на соединения белковой природы, несущих в себе функциональные аминокислотные последовательности с разнообразной биологической активностью. Кроме того, были предложены подходы к моделированию различных условий кислотно-основной среды,характерных для разных отделов ЖКТ, которые могут быть с упесхом применены для оценки стабильности таргетных систем доставки.

5.2.2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА ИЗУЧЕНИЯ ГИПОТЕНЗИВНЫХ СВОЙСТВ *IN VITRO*

В настоящее время для оценки гипотензивных свойств биоактивных соединений и пищевых продуктов разработаны различные *in vitro* модели, основанные на спектрофотометрических, флуориметрических, ВЭЖХ, радиохимических или электрофоретических методах. Многие из них ориентированы на определение способности исследуемых объектов оказывать ингибирующее влияние на ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), который по современным представлениям играет ключевую роль в патогенезе основных форм гипертонической болезни (Иванова О. М., 2004). Несмотря на многообразие *in vitro* методов определения АПФ-ингибирующей активности, в их методологии

отмечаются сходные этапы. Ключевой реакцией при определении АПФ-ингибирующей активности является реакция трансформации субстрата в побочный продукт, катализируемой собственно АПФ. В дальнейшем убыль субстрата определяют различными методами. При этом наличие АПФ-ингибитора отмечается как частичное или полное ингибирование реакции трансформации субстрата под действием АПФ, определяемого спектрофотометрическими и флуориметрическими методами, а также ВЭЖХ. Результаты определения АПФ-ингибирующей активности выражают в процентах ингибирования по отношению к положительному контролю, в единице IC50, соответствующей концентрации исследуемого образца, при которой наблюдается 50% ингибирование активности АПФ (Geng F. et al, 2010; Ahmad I. et al, 2017). В зависимости от метода анализа используются следующие субстраты: гиппурил-гистидил-лейцин (Hig-His-Leu), например, о-фталальдегид, о-аминобензоил-фенилаланил-аргинил-лизил(динитрофенил)-пролин и о-аминобензоил-тирозил-фенилаланил-аргинил-лизил(динитрофенил)-пролин – при флуориметрических, спектрофотометрических и ВЭЖХ (Shin Z. I. et al, 2001; Daliri E. B. et al, 2020); глицил-глицин-гистидин (Hip-Gly-Gly) (Juillerat L. et al, 1990; Ferrario C. M., Mullick A.E., 2017) – при колориметрии (Королёва О. В., 2013).

В связи с тем, что пищевые продукты являются многокомпонентными системами, оказывающими выраженное интерферирующее влияние на результаты спектрофотометрических измерений, для анализа их на АПФ-ингибирующую активность целесообразно применение флуориметрических и ВЭЖХ методов. Последние позволяют оценивать количество образовавшегося из субстрата конечного продукта посредством хроматограммы с набором пиков с различными молекулярными массами, соответствующих компонентам системы. Методика хроматографической регистрации конвертации субстрата гиппурил-гистидил-лейцина в гиппуровую кислоту посредством ВЭЖХ-МС, характеризующаяся быстротой, низким уровнем детекции и высокой специфичностью, может являться оптимальной, однако, в связи с высокой трудозатратностью и необходимостью в дорогостоящем оборудовании, имеет ограниченное использование.

Флуориметрические методы для определения АПФ-ингибирующй активности используют субстраты с внутренним тушением флуоресценции, специфически взаимодействующих с N- и С-терминальными активными центрами АПФ (Ahmad I. et al, 2017).

Для апробации была выбрана флуориметрическая методика АПФ-ингибирующей активности по Araujo M. C. с соавт. (2000) в модификации Торкова А. А. с соавт. (2012). В эксперименте использовали препарат АПФ, выделенный из ткани легкого кролика (активность – 0,1 Ед/мл), который растворяли в 1 мл 0,1 М трис-HCl буфера (50 мМ хлорида натрия и 10 мкМ хлорида цинка). В качестве субстрата был использован трифторацетат о-аминобензоил-фенилаланил-аргинил-лизил(динитрофенил)-пролин, характеризующийся свойством внутреннего тушения флуоресценции. Стоковый раствор субстрата готовили следующим образом: навеску массой 1 мг растворяли в 300 мкл диметилсульфоксида, концентрацию субстрата определяли спектрофотометрически при длине волны 365 нм. Рабочий раствор субстрата готовили из стокового путем разбавления последнего 0,1 М трис-HCl буфером до концентрации 10 мкМ. В качестве положительного контроля использовали синтетический препарат каптоприл, обладающий известной АПФ-ингибирующей активностью.

Реакцию проводили в черных несорбирующих 96-луночных микропланшетах, в лунки которых вносили 20 мкл раствора АПФ. В лунки «опыт» добавляли по 50 мкл раствора каптоприла в различных концентрациях, в лунки «контроль» – 50 мкл деионизированной воды. Планшет герметично закрывали пленкой и инкубировали в течение 15 мин при 37 ºС в термошейкере. После этого в каждую лунку вносили по 130 мкл рабочего раствора субстрата. Флуоресценцию определяли при длине волны 320 нм и регистрировали при 420 нм (Рисунок 10, А). Определение зависимости остаточной активности АПФ от десятичного логарифма вносимой в реакционную среду концентрации каптроприла (Рисунок 10, В) и расчет по калибровочной кривой выявило, что (IC50) для каптоприла составило 0,6425 нмоль/л реакционной среды.

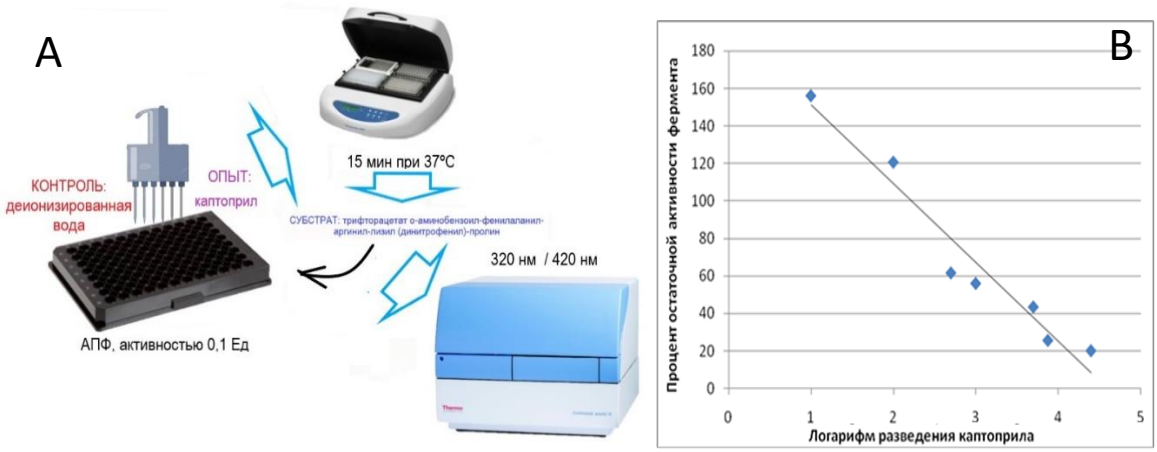


Рисунок 10 - Схема проведения эксперимента (А) и результаты определения остаточной активности АПФ (%) и десятичного логарифма концентрации каптоприла (В)

Таким образом, полученные результаты можно рассматривать как экспериментальное обоснование выбранного метода для определения АПФ-ингибирующей активности различных функциональных и специализированных ингредиентов и продуктов.

5.2.3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ (*IN VITRO* И *EX VIVO*)

В настоящее время разработано значительное количество методов анализа антиоксидантной активности различных соединений.

Одними из распространенных методов анализа антиоксидантов, в том числе в пищевых продуктах и ингредиентах, является методика определения антиоксидантной емкости (АОЕ) по катион-радикалу АБТС (ABTS), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity / поглощающая способность кислородных радикалов) и хемилюминесценция. Первый метод основан на реакции ферментативного распада АБТС, который под действием персульфата калия превращается в катион-радикал АБТС*+, являющийся хромофором с тремя максимумами поглощения – 415, 645 и 734 нм (Re R. et al., 1999). Добавление к реакционной смеси антиоксиданта приводит к дозо- и времязависимому снижению интенсивности образования окрашенного продукта, что может определяться спектрофотометрически при длине волны 415 нм. Таким образом, изменение интенсивности окрашивания реакционной смеси между начальной и конечной точкой инкубации, пересчитанное по отношению к стандартному антиоксиданту (например, тролокс), позволит вычислить антиоксидантную емкость исследуемого вещества в тролокс-эквивалентах. Стоит отметить, что данный метод позволяет проводить оценку вклада как липофильных, так и гидрофильных антиоксидантов, а также различных их смесей. Однако необходимо проведение дополнительных исследований, особенно при изучении ингредиентов белковой природы (например, гидролизатов), поскольку компоненты могут блокировать процесс ферментативной генерации катион-радикала АБТС, что может приводить к завышению показателей АОЕ.

Метод ORAC, основанный на определении абсорбционной ёмкости антиоксидантов по отношению к кислородным радикалам (ROO• и RO•), заключается в измерении изменения интенсивности флуоресценции в зависимости от времени протекания реакции (Logo T. F. S., 2019). В качестве

флуоресцирующего вещества традиционно используют флуоресцеин натрия, обладающий достаточно стабильной флуоресценцией (Ou, B. et al, 2001). Источником свободных радикалов, в соответствии с термической реакцией, является вещество 2,2’-азобис(2-амидино-пропан) дигидрохлорид. Образовавшиеся свободные радикалы, воздействуя на флуоресцеин натрия, уменьшают свечение, а при добавлении в систему антиоксидантов гашение свечения уменьшается. ОАЕ рассчитывают по градуировочному графику и выражают в эквивалентах Trolox.

Также сегодня широкую распространенность приобрели такие фотометрические и флюориметрические методы исследования антиоксидантной активности (АОА), как FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power), CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Power), DPPH (2,2-diphenyl-1picrylhydrazyl) (Zhong Y., Shahidi F., 2015). Основной принцип метода FRAP заключается в измерении восстановления связанного в комплекс Fe (III) под действием АО, которое сопровождается интенсивным синим окрашиванием. Источником ионов трехвалентного железа, как правило, является хлорид железа (III), фотометрическим реагентом – трипиридилтриазин (TPTZ), образующий комплекс с ионами трехвалентного железа (Гимадиева А. Р. с соавт., 2015; Kesic A. et al, 2015). Оптическую плотность раствора регистрируют при длине волны 594 нм, значения АОА определяют по градуировочному графику, выражая их в эквивалентах моль стандартного антиоксиданта (например, дигидрокверцетина, аскорбиновой кислоты и др.).

Метод CUPRAC, основанный на восстановлении заключенной в комплекс двухвалентной меди под действием АО, сопровождается изменением цвета раствора от светло-голубого до желто-оранжевого. В качестве лиганда традиционно используют 2,9-диметил-1,10-фенантролин (Neocuproine). Оптическую плотность регистрируют при длине волны 450 нм, значения антиоксидантного потенциала определяют аналогично методу FRAP (Цюпко Т. Г. с соавт., 2011; Özyürek M. et al, 2011).

Метод DPPH, основанный на измерении восстановительной способности АО в отношении хромогенного радикала, сопровождается появлением желтого цвета (Kedare S. B., Singh R. P., 2011).

Несмотря на центральную роль *in vitro* методов в оценке антиоксидантной емкости функциональных ингредиентов и продуктов, существуют также методы *ex vivo*. Преимуществом использования в качестве тест-объектов культивируемых клеткок по сравнению с методами *in vitro* заключается в возможности оценки свободнорадикального окисления (СРО) непосредственно в живых клетках, моделирующих процессы в организме человека (Лисицкая К. В., 2017). Отдельно стоит отметить, что данные эксперименты проводят, как правило, с использованием клеточных культур, моделирующих кишечную стенку (например, Caco-2), поскольку она является первым барьером на пути поступающих с пищей соединений (Samaranayaka A. G. P. et al., 2010; Calatayud M. et al., 2013).

Методик оценки антиоксидантной активности *ex vivo* различных соединений достаточно много. Общая стратегия для всх методик включает инкубацию клеток в присутствии потенциального антиоксиданта, дальнейшем воздействии инициатора СРО и оценке активности радикалов в клетке (Лисицкая К. В. с соавт., 2012). Для генерации СРО в клеточной культуре наиболее часто используют синтетические радикалы ААРН, ABTS, DPPH, что обусловлено их стабильностью и длительностью жизни по сравнению с природными радикалами (пероксильным, супероксид анион-радикалом и др) (Лисицкая К. В., 2017). Радикалы вызывают оксидативное повреждение структур культивируемых клеток, в частности вызывают увеличение проницаемости митохондриальной мембраны клеток, приводящее к высвобождению из митохондрий цитохрома С и активации каспаз, которые являются одним из главных маркеров клеточной гибели (Serviddio G., Sastre J., 2010). Таким образом, оценка проницаемости митохондриальной мембраны клеток может быть адекватным маркером клеточной гибели, индуцируемой свободными радикалами.

Среди распространенных методик оценки интенсивности СРО в культурах клеток наиболее распространены методы с использованием флуорохромов

(например, дихлорофлуоресцеин ацетат – DCFDA, DCFH-DA, дигидродамин, гидроэтидин), способных проникать в живые клетки, где под действием внутриклеточных ферментативных систем из нефлуоресцирующих соединений происходит образование флуоресцентных продуктов. Стоит отметить, что такие еще недавно широко распространенные в *ex vivo* экспериментах, флуорохромы, как луминол и луцигенин, в настоящее время используются мало в связи с низкой специфичностью (Armstrong J. S., Whiteman M., 2007; Лисицкая К. В., 2017). DCFDA является наиболее удобным флуорохромом для детекции интенсивности непосредственно в культуре, так как он проникает в клетки и аккумулируется в цитозоле, где под действием эстераз клетки деацетилируется в дихлорофлуоресцеин (DCF). Свободные радикалы (пероксильный, радикал NO_2, карбонат-радикал, гидроксил-радикал) конвертируют нефлуоресцентное соединение в флуорохром с пиком флуоресценции около 525 нм при длине волны возбуждающего света 498 нм. Данный метод получил широкое распространение в связи с относительной простотой, достаточно высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов (Лисицкая К. В. с соавт, 2012) и был использован в данной работе.

Стоит отметить, что при определении антиоксидантных свойств функциональных пищевых компонентов *ex vivo* необходимо в каждом случае интерпретировать получаемые результаты в совокупности с результатами *in vitro* экспериментов. Это связано с тем, что пищевые компоненты проходят в организме различные модификации в результате гидролиза в ЖКТ и метаболизма в печени. Как следствие, результаты *ex vivo* необходимо сопоставлять с биодоступностью антиоксидантных компонентов в ЖКТ. Также некоторые пищевые компоненты наряду с антиоксидантным эффектом обладают химиопрофилактическими свойствами (например, флавоноиды) и выявление прооксидантных свойств в клеточных моделях, могут быть обусловлены антиканцерогенным действием, что описано, например, для флавоноидов эпикатехина, эпикатехин-галлата и процианидина В2 на клеточной модели кишечной стенки на основе клеток Caco-2 (Ramos S. et al, 2011). Экспериментальное обоснование проводили в отношении

метода определения антиоксидантной емкости (АОЕ) по пероксильному радикалу (ORAC) и катион-радикалу АБТС посредством определения АОЕ стандартного антиоксиданта 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота – тролокса (Aldrich, США), представляющего собой водорастворимый аналог витамина Е.

Данная методика основана на генерации непосредственно в среде природного радикала – пероксильного радикала. Источником пероксильного радикала служит соединение ААРН, которое термически распадается в присутствии кислорода. Образовавшийся пероксильный радикал взаимодействует с флуоресцентным соединением, которое в результате окисления пероксильным радикалом превращается в нефлуоресцирующий продукт. Убыль количества флуоресцеината натрия оценивают спектрофлуориметрически при длине волны возбуждения флуоресценции 485 нм и регистрации флуоресценции 528 нм. В методике использовали два типа контроля: отрицательный – бланк (без антиоксиданта) и положительный (со стандартным антиоксидантном тролоксом) в дальнейшем с исследуемой пробой. Убыль флуоресценции исследуемого образца по отношению к тролоксу за вычетом значения бланка позволяет вычислить антиоксидантную емкость исследуемого вещества в тролокс-эквивалентах.

Для приготовления стокового раствора тролокса с концентрацией 200 мкМ взвешивали навеску тролокса массой 52 мг и добавляли до 1 л перегнанный этиловый спирт. Из стокового раствора путем растворения в этиловом спирте готовили растворы с концентрацией 20 – 200 мкМ.

Общая схема метода определения АОЕ по пероксильному радикалу представлена на Ррисунке 11.

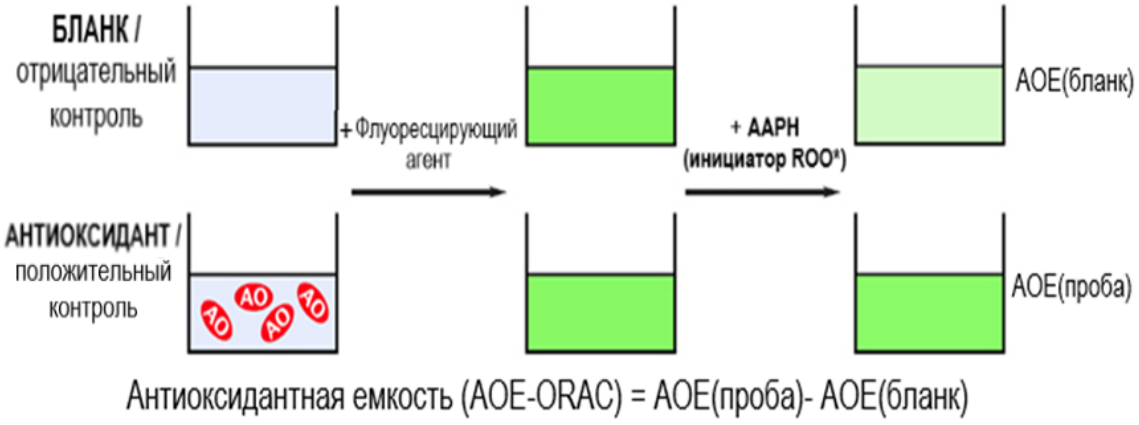


Рисунок 11 - Схема, иллюстрирующая принцип метода определения антиоксидантной емкости по пероксильному радикалу

Поскольку пероксильный радикал характеризуются малым временем жизни, что обуславливает необходимость их генерации непосредственно в реакционной среде, то потребовалось проведение предварительных экспериментов при оценке зависимости реакции от времени (0, 30, 60, 90, 120 мин). Установлено, что через 120 мин инкубации флуоресценция выходит на плато. В связи с этим было принято решение о сокращении интервалов считывания до 30 мин.

Данная методика была также использована для определения *ex vivo* антиоксидантных свойств исследуемых объектов. Для проведения исследования клетки инкубировали на 96-луночном черном планшете в присутствии БАВ_2 в течение 2 ч, далее раствор аспирировали и вносили на 30 мин DCFH-DA. После аспирации раствора в культуру вносили ААРН и определяли флуоресценцию (Лисицкая К. В., 2017).

Необходимо подчеркнуть, что пока не создано идеального метода оценки СРО. Поэтому при использовании существующих методов для изучения антиоксидантных свойств пищевых продуктов и функциональных ингредиентов необходимо применять комплексный подход с разнообразными контролями и учитывать вероятность получения артефактных результатов.

5.2.4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO*

Для изучения свойств лейкоцитов, системно определяющих специфическую реактивность организма и функцию иммунной системы сегодня наиболее распространены такие методы *in vitro,* как розеткообразование, бластотрансформации лимфоцитов, торможения миграции макрофагов, аллергической альтерации лейкоцитов и прочие.

Традиционно иммунную активность различных фармакологических препаратов оценивают в экспериментах *ex vivo* по активности иммунных клеток крови, в частности, с использованием метода розеткообразования (РОК), который отличается относительной дешевизной, достаточной простотой, хорошей воспроисзводимостью.

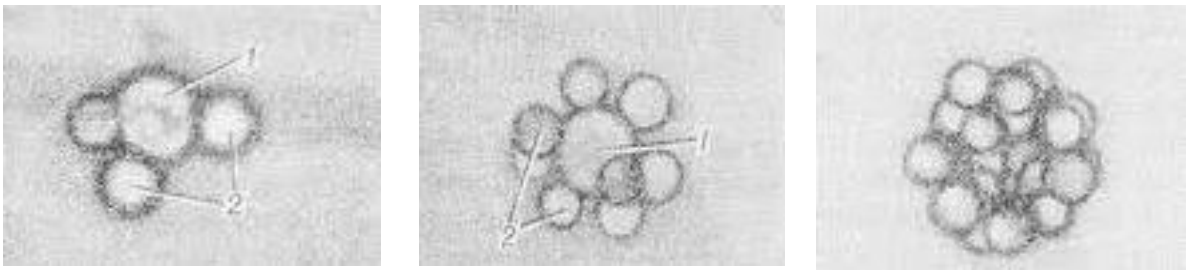
Тест розеткообразования, основанный на взаимодействии лейкоцитарных клеток (лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов) с различной рецепторной структурой с чужеродными агентами. Феномен розеткообразования – спонтанное присоединение к поверхности лейкоцита других (чужеродных) клеток (например, эритроцитов), различных искусственных гранул (например, латексные микрочастицы, красители), существует в нескольких вариантах.

Прямой тест РОК заключается в формировании спонтанных розеток за счет участия антигенов самих эритроцитов или гранулоцитах, моноцитах (например, между лимфоцитами человека или животных и эритроцитами барана или кролика). Непрямой тест РОК проводят с предварительной иммунозацией донора лейкоцитов или искусственно зафиксированном на поверхности эритроцитов антигенов. Также формирование розеток может происходить за счет иммуноглобулинов поверхности В-клеткок или фиксируются на клетках (Dardenne M., Bach J.-F., 1975).

В свою очередь тесты непрямого розеткообразования заключаются в присоединении эритроцитов к поверхности лимфоцитов, имеющих на мембране неспецифичные по отношению к эритроцитам (Е) рецепторы (Fc- и С3- рецепторы) через вставочный компонент антитела (А) или антитела и комплемент (С). При

этом наиболее широко распространенным методом определения биологической активности иммунокорригирующих средств, ввиду своей простоты, является метод непрямого розеткообразования с образованием ЕА – РОК и использованием Т-лимфоцитов морской свинки и эритроцитов кролика. Данная методика и была нами апробирована.

В результате образования комплекса антиген-антитело-комплемент и взаимодействия лимфоцита (гранулоцита, макрофага и др.) с рецепторами эритроцитов (три и более), выражающегося в образовании агглютинатов, образуются фигуры, напоминающие розетки, которые называют розеткообразующим лимфоцитом, или розеткообразующей клеткой (РОК). По количеству присоединенных эритроцитов к поверхности лимфоцита различают: неполный венчик – лимфоцит, окруженный тремя эритроцитами (рисунок 11, А); венчик – лимфоцит, окруженный более чем тремя эритроцитами, образующими фигуру, напоминающую цветок (Рисунок 12, Б); морулу – лимфоцит, полностью окруженный эритроцитами (Рисунок 12, В).



А **Б** **В**

Рисунок 12 – Типы розеткообразующих клеток (РОК).
Условные обозначения: 1 – лимфоцит; 2 – эритроцит;
А- неполный венчик, Б- венчик, В- морула.

Тесты прямого (спонтанного) РОК применяют для определения количества Т-лимфоцитов (т.к. эти клетки несут рецепторы к эритроцитам барана) и оценки иммунного статуса, а в некоторых случаях – для выделения В-клеток.

Нами предположено, что тест спонтенного розеткообразования может быть использован для изучения иммунотропной активности БАВ и продуктов питания (после моделирования ЖКТ или лиофильно высушенных).

Схема постановки реакции представлена на Рисунке 13.

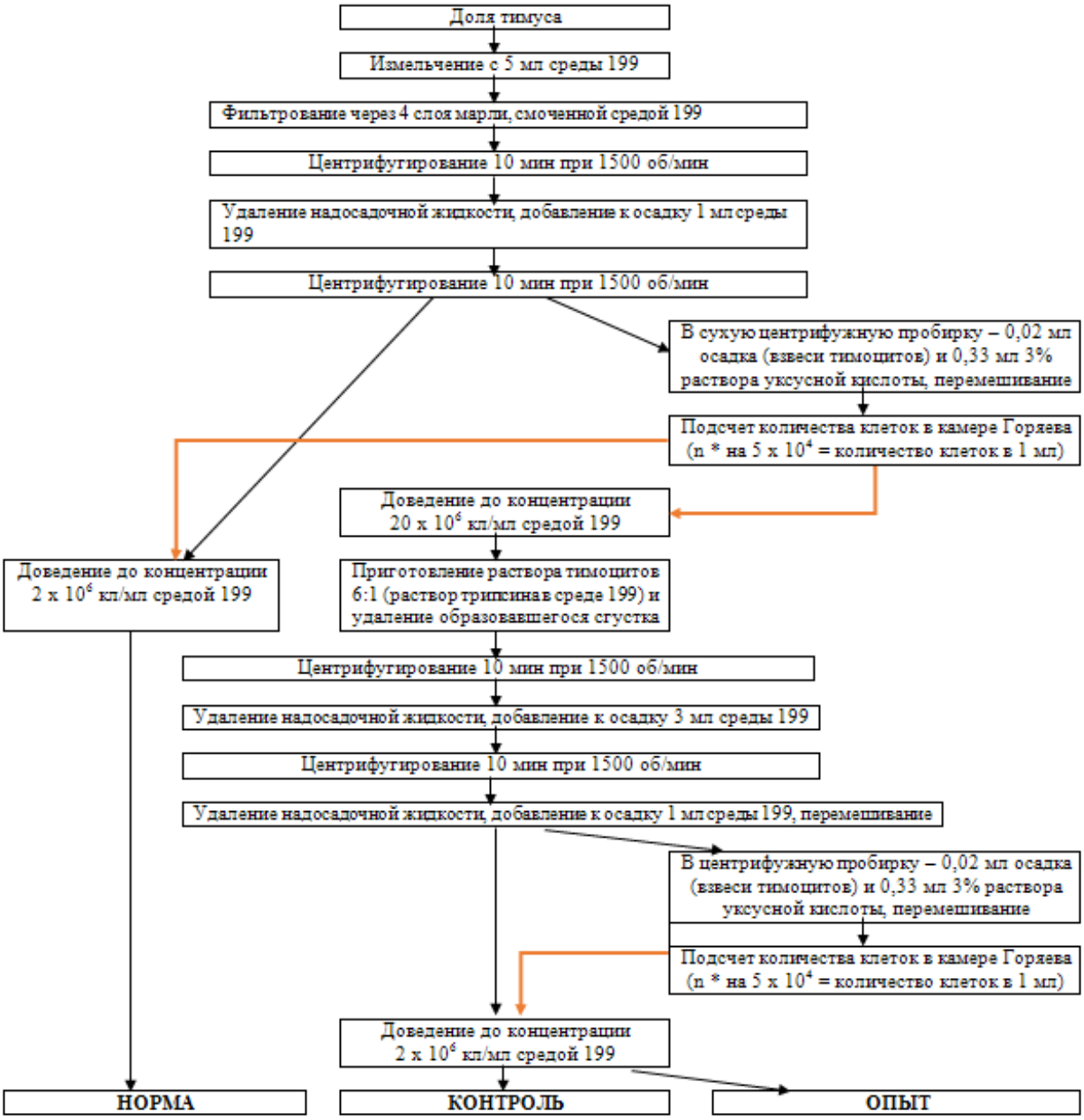


Рисунок 13 - Схема проведения исследования для определения биологической активности методом розеткообразования

Для данного эксперимента необходимы первично изолированные тимоциты, полученные от наркотизированных морских свинок путем экстирпации доли тимуса. Долю тимуса измельчают ножницами, полученную ткань помещают в

стеклянный гомогенизатор (зазор 0,25 мм), приливают 5 $см^3$ среды 199 и гомогенизируют. Гомогенат фильтруют через 4 слоя стерильной марли, смоченной средой 199, и центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин. После этого надосадочную жидкость сливают, а к осадку добавляют 1 $см^3$ среды 199 и тщательно суспензируют.

Далее в сухую пробирку объемом 20 $см^3$ вносят 0,33 $см^3$ 3%-го раствора уксусной кислоты, приготовленной непосредственно перед использованием, добавляют 0,02 $см^3$ взвеси тимоцитов и микроскопируют при помощи камеры Горяева. Подсчитывают количество тимоцитов в 100 больших квадратах. Полученное число умножают на 5×10^4 для определения количества клеток в 1 $см^3$ (если количество клеток в 1 $см^3$ менее 100×10^6, то животное исключают из опыта и заменяют другим). Суспензию клеток доводят до концентрации 20×10^6 клеток/$см^3$ средой 199, одновременно готовят суспензию с концентрацией 2×10^6 клеток/$см^3$ (норма).

Далее в пробирку вносят суспензии тимоцитов (20×10^6 клеток/$см^3$) и приготовленный непосредственно перед использованием 0,5%-ый раствор трипсина в соотношении 6:1, содержимое аккуратно перемешивают, визуально определяя образование сгустка, который необходимо аккуратно удалить из раствора. После данной операции проводят процедуру последовательной отмывки, в 2-3 этапа, клеток от трипсина путем центрифугирования (10 мин при 1500 об/мин), сливая надосадочную жидкость и добавляя к осадку 3 $см^3$ среды 199 и тщательно суспендируя. После этого к осадку тимоцитов приливают 1 $см^3$ среды 199 и тщательно перемешивают. Готовят рабочую суспензию в концентрации 2×10^6 клеток/$см^3$ (контроль) вышеуказанным способом.

Для непосредственного проведения эксперимента в пробирку №1 (норма) вносят 0,1 $см^3$ суспензии клеток в концентрации 2×10^6 клеток/$см^3$, во пробирки №2 (контроль) и №3 (опыт) вносят по 0,1 $см^3$ суспензии тимоцитов, отмытых трипсином в аналогичной концентрации. В пробирку №3 дополнительно вносят разведенный в среде 199 исследуемый объект, приготовленный перед использованием. Затем в пробирки №№1-3 добавляют по 0,1 $см^3$ эритроциты

кролика, отмытые физиологическим раствором и разведенные в среде 199 до концентрации 1%. Взвесь клеток во всех пробирках центрифугируют при 1000 об/мин 5 мин, после чего клетки ресуспендируют и подсчитывают в камере Горяева процентное содержание РОК (тимоцит морской свинки, присоединивший три и более эритроцитов кролика) в каждой из пробирок.

Если количество РОК в пробирке с тимоцитами, необработанных трипсином, (норма) менее 40 % или в опыте менее чем в контроле, результаты исключают из опыта и повторяют исследования. Далее определяют среднее арифметическое процентное соотношение содержания РОК у 5 животных. Биологически активным объект считают, если среднеарифметическое число РОК, обработанных трипсином, восстанавливается не менее чем на 40 % по отношению к норме.

Апробацию данной методики проводили на фармацевтической субстанции – лиофилизированном экстракте вилочковой железы крупного рогатого скота. Результаты исследования в виде распределения случаев РОК представлены на рисунке 14. Показано, что исследуемый объект в 73 % случаях восстанавливает количество розеткообразующих клеток не менее чем на 40 % по сравнению с контролем.

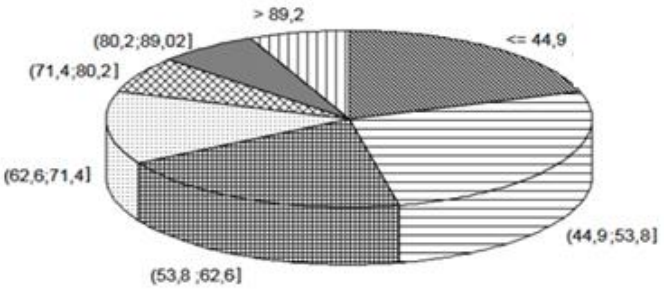


Рисунок 14 – Распределение розеткообразующих клеток при изучении экстракта вилочковой железы крупного рогатого скота

Таким образом отмечена пригодность описанного метода для изучения иммунотропной, в частности тимической активности, для биологически активных соединений.

5.3 ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ МЕТОДАМИ EX VIVO

5.3.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА ИЗУЧЕНИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Пролиферативную активность традиционно изучают на жизнеспособных тканях или клетках. При этом работают преимущественно с клетками животных, полученными методом первичного эксплантата: выделенные кусочки ткани промывают и помещают на поверхность культурального флакона или чашки Петри в небольшом объеме среды с высокой концентрацией сыворотки таким образом, чтобы поверхностное натяжение удерживало кусочки на месте, пока они не прикрепятся к поверхности, после чего и происходит разрастание клеток.

Из первичного эксплантата или диспергированной клеточной суспензии можно получить первичные клеточные культуры. Технология выделения культур клеток и органных культур из эмбриональных тканей является оптимальной, т.к. такие клетки обладают высокой выживаемостью и пролиферативной (способности к росту) активности по сравнению со «зрелыми» клетками.Это обусловлено низким уровнем специализации и наличия реплицирующихся клеток-предшественников. Наиболее удобным объектом для изучения биоактивных веществ и пищевых продуктов являются органотипические культуры тканей, характеризующиеся сохранением структурной целостности исходной ткани, к которым они относятся, где отсутствуют нервные, гуморальные и другие воздействия на клетки. Метод, основанный на изучении влияния исследуемого объекта на рост клеток ткани и выселяющихся клеток в зоне роста эксплантата при сравнении с контролем, является простым в исполнении и относительно дешевым. Количественную оценку результатов проводят прижизненно морфометрическим методом с помощью светового микроскопа при увеличении ×40 со встроенной цифровой камерой. Схема проведения эксперимента представлена на Рисунке 14.

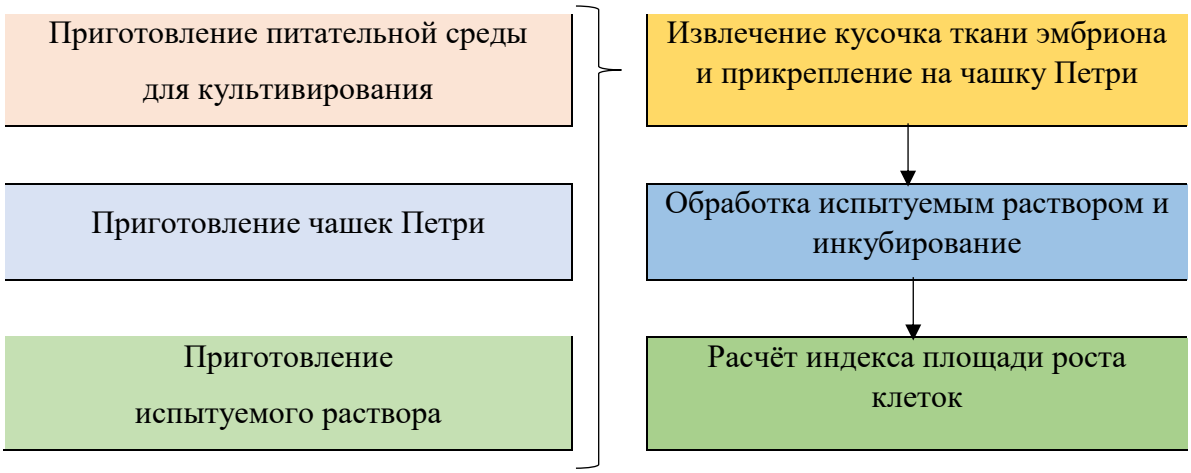


Рисунок 14 – Общий алгоритм проведения исследования пролиферативной активности

Стоит отметить, что на проведение одного анализа используют по три 9 − 10 дневных куриных эмбриона, при этом работу проводят в стерильном боксе.

Перед тем как извлечь эмбрион тупой конец яйца обрабатывают 5%-ым спиртовым раствором йода и 96%-ым этанолом, затем его обжигают и над воздушным мешком стерильными глазными ножницами срезают скорлупу. Эмбрион помещают в стерильную чашку Петри. Глазным скальпелем отделяют небольшие фрагменты ткани эмбриона, из которых с помощью скальпеля и препаровальной иглы готовят от 10 до 15 кусочков ткани размером около 0,5 мм. Каждый кусочек препаровальной иглой прикрепляют к дну чашки Петри. Чашку с открытой крышкой в течение 3 мин выдерживают при комнатной температуре в ламинарном шкафу. Для каждого исследуемого образца готовят по 3 чашки с опытными и с контрольными образцами. Испытуемый раствор перемешивают и в каждую опытную чашку помещают по 3,0 мл раствора, осторожно направляя струю раствора на стенку чашки. В контрольные чашки помещают такой же объем питательной среды. Чашки помещают в термостат с 5%-ым содержанием углекислого газа, влажностью не ниже 60 % и инкубируют 60 ч при (37±1) °С, после чего проводят прижизненное морфометрическое исследование.

Интенсивность роста ткани оценивают по величине индекса площади роста клеток (ИП), который рассчитывают как отношение площади всего фрагмента ткани, включая периферическую зону роста, к исходной площади фрагмента ткани.

Значение ИП выражают в процентах, принимая контрольное значение ИП за 100 %. Образец считают биологически активным, если индекс площади роста клеток (ИП) ткани после стимуляции раствором испытуемой субстанции не менее чем на 20 % превышает ИП в контроле. Для анализа тканеспецифических свойств исследуемого объекта по отношению к определенной органотипической культуре ткани используют ткани различного генеза: мезодермального происхождения (сердце и сосуды, мышечная ткань, фасции и серозные оболочки, кости и хрящи); эктодермального (спинной мозг, периферические нервы и головной мозг, кожный эпителий, некоторые железы внутренней секреции), эндодермального (слизистая пищеварительной и дыхательной систем, почка, железы внутренней секреции).

В рамках обоснования методики проведено исследование биологической активности образцов СМП_1, полученных после модели переваривания *in vitro,* на эксплантатах тканей сердца и сосудов (n=80) куриных эмбрионов и эксплантатах тканей аорты крыс (n=30). Относительно эксплантатов крыс энтодермального происхождения отмечено ингибирование роста (ИП слизистой кишечника снижался на 4,85 % ($p<0,1$), слизистой желудка незначительно увеличивался на 1,3% относительно контроля), мезодермального и энтодермального происхождения – стимуляция пролиферации (до 20% относительно контроля). При этом на эксплантатах тканей куриного эмбриона показано увеличение ИП эксплантатов сердца на 56,6±5,2 %, по сравнению с контролем.

Таким образом, показана возможность применения метода пролиферативной активности для изучения биологической эффективности пищевых продуктов.

5.3.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДА ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ

К настоящему времени описано достаточное количество методов оценки цитопротективного эффекта. В большинстве из них моделируются процессы, происходящие при воздействии цитотоксических агентов на различные клетки. В

качестве тест-систем для изучения механизмов реализации биологического действия пищевых ингредиентов и продуктов используют линии клеток аденокарциномы кишечника Caco-2 и HT-29. Это связано с тем, что слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта является первым клеточным барьером при поступлении ксенобиотиков и других цитоксических агентов в организм человека, а также потенциальных пищевых веществ, обладающих цитопротективными свойствами (Лисицкая К. В. с соавт., 2012).

Меньшее распространение приобрели модели, использующие культивируемые нормальные эпителиальные клетки кишечника человека (HIEC-6, H4 и H4-1) и животных – крысы (IEC и RIE), свиньи (IPEC-J2, PSI-1 и CLAB), теленка (CIEB), козы (GIE), овцы (OSI), что обусловлено различностью биохимических процессов в организме человека и других млекопитающих (Cilla A. с соавт., 2011).

Цитотоксичность в культивируемых клетках индуцируют как при добавлении непосредственно цитотоксического агента, например, ксенобиотика, так и индукторов СРО (например, азосоединение ААРН (Ko J. Y. et al., 2013), поскольку многие повреждающие эффекты ксенобиотических соединений реализуются посредством активации СРО (например, пероксид-радакала). При этом наиболее часто в качестве повреждающих агентов используют кадмий (Satish Rao B. S., 2009), четыреххлористый углерод (Zhao X., 2009) и ртуть. Последний является широко распространенным ксенобиотическим тяжелым металлом, который, поступая в организм с пищей и водой, обладает местным цитопатическим действием, обусловленным оксидативным повреждением тканей и ДНК клеток (Wang L. et al.,2009).

В качестве методики оценки цитопротекции была выбрана система с использованием клеточной линии HT-29 с индуцируемой ионами ртути цитотоксичностью. При экспериментальном обосновании данного метода сначала устанавливали цитотоксические концентрации солей ртути по методике, описанной в работе Bohets H. H. с соавт. (1995). В соответствии с чем были

выбраны предварительные концентрации ацетата ртути 1 – 5 мкМоль. Также был проведен эксперимент по подбору концентраций ионов кадмия.

Для проведения эксперимента клетки НТ-29 культивировали до достижения монослоя, периодичность смены культуральной среды составляла 2 – 3 сут, пассажа – 4 – 6 сут.

Также для проведения эксперимента готовили раствор солей тяжелых металлов, красителя МТТ и додецил сульфат натрия (SDS).

Стоковый раствор ацетата ртути (II) с конечной концентрацией ионов ртути 100 000 мкМоль/л готовили разведением навески массой 31,9 мг в 1 мл ледяной уксусной кислоты и доведением объема раствора до 100 мл дистиллированной водой. Раствор фильтровали через шприцевые стерилизующие фильтры с диаметром пор 0,22 мкм и готовили последующие разведения с концентрацией 5 – 80 мкМоль/л на растворе Хэнкса.

Стоковый раствор нитрата кадмия с концентрацией ионов кадмия 1000 мкМоль/л готовили следующим образом: к навеске массой 59,1 мг добавляли 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и доводили объем раствора до 250 мл дистиллированной водой. Проводили фильтрацию раствора через шприцевые фильтры. Из базового раствора нитрат кадмия готовили последующие разведения с концентрациями ионов кадмия 50 –800 мкМоль/л на растворе Хэнкса.

Для приготовления рабочего раствора МТТ к навеске сухого вещества массой 10 мг добавляли до 20 мл стерильного раствора Хэнкса, прогретого до 37 °С. Раствор смешивали с помощью шейкера и оставляли до полного растворения до 24 ч в темноте. Стерилизовали раствор фильтрованием через шприцевые фильтры. Для приготовления рабочего 10%-го раствора SDS навеску массой 100 мг взвешивали на аналитических весах, затем добавляли до 100 мл стерильный солевой раствор Хэнкса и 5 мкл хлористоводородной кислоты. Раствор оставляли до полного растворения.

Перед экспериментом образовавшие монослой клетки НТ-29 снимали с поверхности пластика с использованием диссоциирующего раствора Версена и 0,25%-го раствора трипсина в соотношении 1:2, полученную суспензию клеток

внисили в центрифужные пробирки и центрифугировали 2 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, добавляли к супернатанту культуральную среду и определяли цитоз суспензии в цитометре. В лунки 96-луночные планшеты проводили пассаж 100 мкл клеточной суспензии (10^6 клеток/мл). Для прикрепления клеток к поверхности культурального пластика перед проведением экспериментов культуральные плашки инкубировали в термостате в течение 12 – 24 ч. Далее проводили аспирацию содержимого лунок и вносили растворы ацетата ртути в повышающихся концентрациях. В качестве «контроля» выступали клетки, которые инкубировали в физиологическом растворе. Инкубацию клеток «опыт» проводили в присутствии растворов ацетата ртути в течение 1 ч.

Количество жизнеспособных клеток в лунках определяли путем окрашивания клеток витальным красителем МТТ в концентрации 0,5 мг/мл. После аспирации из лунок растворов ацетата ртути и контроля вносили в лунки раствор МТТ. Плашки инкубировали в течение 3 – 4 ч в термостате в темноте. После завершения инкубации в лунки вносили 100 мкл 10%-го раствора SDS, после чего определяли оптическую плотность раствора (длина волны 540 нм; длина волны сравнения 690 нм) на микропланшетном фотометре-флуориметре. Для анализа каждой исследуемой концентрации ионов ртути готовили по три лунки. Результаты рассчитывали как среднее значение оптической плотности в лунках «опыт» и «контроль», также определяли стандартное отклонение.

Ионы ртути (II) проявляли цитотоксическое действие на клетки НТ-29 после 60 мин инкубации в диапазоне концентраций от 5 мкМоль/л до 40 мкМоль/л, минимальный цитотоксический эффект на культивируемые клетки регистрировался при концентрации 5 мкМоль/л ионов ртути (Рисунок 15).

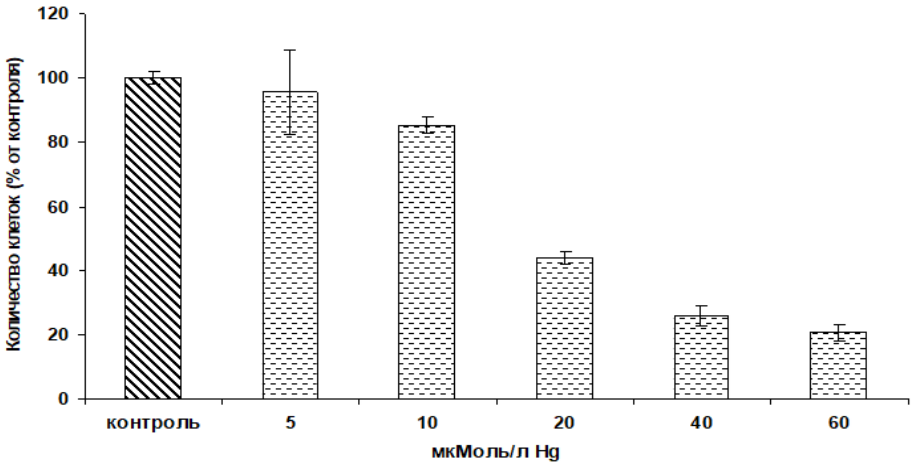


Рисунок 15 - Результаты определения (*ex vivo*) цитотоксического действия ионов ртути (Hg2+) на клетки линии HT-29 (60 мин инкубации)

Результаты определения цитотоксического действия ионов кадмия на клетки HT-29 свидетельствуют о выраженном токсическом действии на клетки линии HT-29 после 60 мин инкубации солей кадмия в диапазоне концентраций от 25 мкМоль/л и выше, при этом LD50 ионов кадмия составляла около 200 мкМоль/л (Рисунок 16).

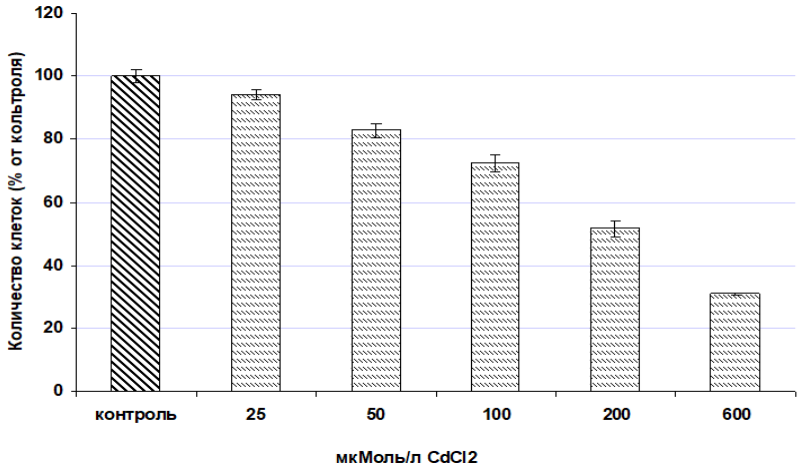


Рисунок 16 – Результаты определения цитотоксического действия ионов кадмия (CdCl2) на клеточной линии HT-29 (1 ч инкубации)

В результате эксперимента обоснованы оптимальные концентрации ионов кадмия и ртути, вызывающих достоверную гибель клеток HT-29. Данная модель впоследствии может быть использована в качестве скрининговой для выявления протективных свойст компонентов пищевых продуктов.

5.3.3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДОВ МЕМБРАНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ

Биологические мембраны являются универсальным образованием клетки за счет регуляции компартментации метаболизма и биохимических реакций как на самих мембранах, так и в примембранном пространстве. Вещества, обладающие биологической активностью, могут как способствовать нарушению функциональной активности мембраны, так и стабилизировать ее свойства и повышать устойчивость в неблагоприятных условиях (Горбатюк Н. О. с соавт., 2015).

В рамках поиска оптимального метода изучения мембранотропной активности пищевых продуктов и функциональных ингредиентов автором рассмотрен метод оценки стабильности гепатоцитов и мембранотропной активности, применяемый в биомедицинских исследованиях для изучения новых БАВ. Для эксперимента необходимо предварительное определение концентраций, обладающих биологической активностью, наиболее часто используют последовательные разведения в 10, 100, 1000 и более раз (Мальцев Д. И., 2013).

Исследование проводят на изолированных гепатоцитах, полученных от молодых животных (мышей, крыс или морских свинок). Для их получения вырезают фрагменты печени (весом 0,5 – 1,0 мг), которые помещают в стерильную посуду (чашки петри, планшеты или флаконы) и приливают 0,9 мл питательной среды 199 и 0,1 мл раствора исследуемого объекта (в нужной концентрации) и инкубируют в течение 2 час при температуре 37 °С. В качестве контроля используют фрагменты ткани, которые инкубируют в 1,0 мл питательной среды 199 без добавления исследуемого образцпа. По истечении времени инкубации каждый фрагмент печени извлекают, просушивают с помощью фильтровальной бумаге, взвешивают, приливают 0,1 мл 0,1 %-го раствора трипанового синего в среде 199 и гомогенизируют с использованием стеклянного гомогенизатора (зазор 50 мкм). Полученную суспензию клеток и ядер исследуют микроскопически, проводя подсчет клеточных ядер в определенном объеме камеры Горяева (0,02 мм^3) (Мальцев Д. И., 2013).

Мембранотропную активность рассчитывают по формуле:

Ма=200 %−[(Nоп./Nк.) × 100%], где

Ма – мембранотропная активность;

Nоп. и Nк – количество клеточных ядер, выделившихся из 1 мг ткани, соответственно в опыте и в контроле.

Альтернативный метод предусматривает инкубацию фрагментов ткани в течение 20 мин при 37 °С, после чего быстро (не более 3 мин) с помощью гомогенизатора готовят суспензию клеток и клеточных ядер в 0,1 мл 0,1%-го раствора трипанового синего в среде 199. Из фрагментов ткани составляют экспериментальные пары: «опыт»/ «контроль». Полученные суспензии клеток и клеточных ядер исследуют микроскопически в камере Горяева как описано выше (Рисунок 17). Необходимо отметить, что весь эксперимент, включая подсчет ядер, должен быть выполнен не более чем за 85 мин. Мембранотропную активность рассчитывают для каждой пары (контроль – опыт) по формуле (Мальцев Д. И., 2013).

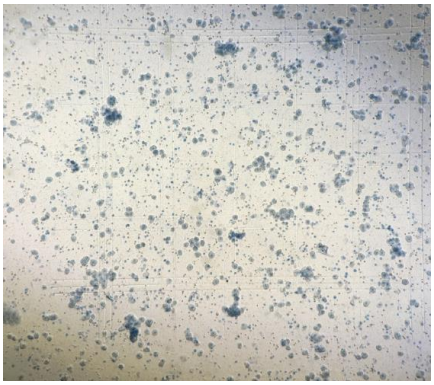


Рисунок 17 - Изображение окрашенных гепатоцитов и вышедших из клеток ядер под микроскопом. Ув. 10х.

Обоснование метода оценки жизнеспособности и стабильности мембран проводили альтернативным методом, в питательную среду вносили образец СМП_1, после модели переваривания *in vitro* (500 нг белка на мл среды). Установлено достоверное увеличение стабильности мембран гепатоцитов: мембранотропная активность достигала значений от 139% до 154%.

Данный метод является дополнением к анализу протективной активности функциональных и специализированных продуктов, позволяющим рассмотреть влияние на защиту клеточной стенки.

5.4. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ МЕТОДАМИ *IN VIVO*

Различные виды и линии лабораторных животных традиционно используют в биомедицинских и фармацевтических исследований. При этом для выявления терапевтических и профилактических эффектов различных агентов широко применяют методы экспериментального моделирования болезней человека. При этом выбор модели необходимо обосновывать с позиции адекватности и соответствия физиологическим процессам человека. Основным принципом экспериментального моделирования функциональных состояний на животных является сравнение особенностей животных и человека и выявление сходных маркеров функционального состояния (Каркищенко Н. Н. с соавт., 2016). На настоящее время собран значительный объем данных об анатомо-морфологических, физиологических и биохимических особенностях различных видов и линий экспериментальных животных, которые позволяют установить степень релевантности получаемых эффектов человеку и прогнозировать результаты клинических исследований (Селезнева А. И. с соавт., 2015).

Широко применяемые в экспериментальной фармакологии методы биомоделирования in vivo (Каркищенко Н. Н., 2005; Хабриев Р. У., 2005; Миронов А. Н., 2013) могут являться основой для изучения безопасности и эффектов биоактивных веществ, функциональных и специализированных продуктов. При этом необходимо отметить, что стандартизированных и подробных методических рекомендаций для их изучения не разработано.

В главе проанализированы возможности моделирования на лабораторных животных ряда патофизиологических состояний, характерных для заболеваний человека, в основе которых лежат функциональные расстройства, которые, по мнению автора, могут быть использованы для изучения эффектов продуктов питания.

В рамках проводимой работы основными этапами выбора и воспроизведения экспериментальных моделей являлись: (1) выбор лабораторных животных; (2) определение схемы моделирования (варьирование компонентов рациона, введение химических агентов – индукторов повреждений, операционных вмешательств); (3) оценка степени тяжести развивающихся нарушений и выявления основных маркеров патофизиологических состояний.

5.4.1. ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СБОЕВ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПУТЕМ ВАРЬИРОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ РАЦИОНА

Современное питание ввиду возрастающей доступности высокоэнергетических продуктов приводит к развитию среди всех возрастных групп метаболического синдрома (МетС), характеризующегося одновременным возникновением как минимум трех из следующих заболеваний: ожирение, гипергликемия и инсулинорезистентность, гипертония или дислипидемия (Bonomini F., 2015). МетС приводит к развитию сердечно-сосудистых заболеваний – ишемической болезни сердца и инсульта, диабета II типа и практически не подлежит коррекции физиологическими методами. Для разработки эффективных мер по профилактике и терапии МетС необходимо детальное изучение процессов развития заболевания, что невозможно без адекватных экспериментальных биомоделей.

Наиболее часто в экспериментах по изучению патофизиологии метаболических нарушений участвуют инбредные животные-биомодели – крысы Sprague-Dawley, Wistar, мыши C57BL/6, сирийские хомяки (Senaphan K. et al, 2015; Suman R. K. et al, 2015; Fujita Y., Maki K. 2015), а также трансгенные животные – крысы линий fa/fa Zucker fatty rats (ZFR) и Zucker diabetic fatty rat (ZDF), Spontaneoulsy hypertensive rats (SHR), мыши линий Lep $^{ob/ob}$ и Lep $^{db/db}$ (C57BL/KsJ-db/db), Agouti yellow (Ay/a-мыши), KKAy/a (Giles K. et al, 2016; Ковалева М. А. с соавт., 2018). При этом значительная часть моделей заключается в варьировании

компонентов рациона с целью воспроизведения стабильных и длительных нарушений углеводного и жирового обмена (Gajda A. et al, 2012).

В настоящее время в исследованиях преимущественно используют коммерческие стандартные лабораторные рационы – полнорационные концентрированные комбикорма, которые предоставляют животным *ab libitum* (в свободном доступе). Однако данные рационы не имеют стандартного состава макронутриентов и состоят преимущественно из растительного сырья (соевый шрот, молотая кукуруза и пр.), побочных продуктов животного происхождения (мясокостная и рыбная мука) и жиров. За очень редким исключением это «закрытые» формулы, охарактеризованные неполностью, – количество каждого используемого ингредиента является проприетарным, что делает практически невозможным точное определение состава конкретной партии без дополнительных исследований (Barnard D. E. et al, 2009; Ferreira R. S. et al, 2017). Недостатком таких диет в исследованиях являются высокие уровни содержания растворимых и нерастворимых волокон, составляющие порядка 20 % от всего рациона (Pellizzon M., 2016); низкое содержание незаменимых жирных кислот – не более 1,5 % от рациона, источником которых, как правило, является растительное масло; неизвестное содержание минорных компонентов, в том числе изофлавоноидов, мышьяка, ртути, полихлорированных диоксинов, которые опосредованно могут оказывать влияние на экспрессию генов и, изменяя фенотип, сильно варьировать результаты эксперимента (Nkwonta C. G. et al, 2013).

Существуют также полусинтетические диеты, представляющие собой смесь из очищенных белков, крахмала, сахаров, определенных жиров и масел. Наиболее распространенными в лабораторной практике являются получинтетические диеты Американского института питания (AIN). Сегодня специалистами AIN разработано достаточное количество составов диет для размножения и содержания лабораторных животных, призванных к стандартизации исследований и повышения воспроизводимости экспериментов за счет сокращения использования «собственно разработанных» учеными составов. Первоначальной диетой AIN была формула AIN-76A, которая впоследствии была пересмотрена и заменена на AIN-93

(Ogunji J. O., Wirth M., 2000). Отличительной чертой AIN-93 является замена кукурузного масла, которое использовалось в рационе до 1993 г., на соевое, имеющее более сбалансированный состав жирных кислот (15 % насыщенных жиров, 54 % линолевой кислоты (n-6 жирные кислоты), 8 % α-линолевой кислоты (n-3 жирные кислоты), 23 % олеиновой кислоты (n-9 жирных кислот). AIN выпускает различный спектр коммерческих полусинтетических диет, различающихся по составу макронутриентов и микроэлементов, что позволяет исследователям варьировать рацион в соответствии с конкретными целями исследования. Для более полного контроля нутриентов и максимального ограничения влияния внешних факторов сегодня применяют синтетические диеты, которые химически определены и состоят из очищенных триглицеридов, свободных жирных кислот, свободных аминокислот, сахаров, витаминов и минералов.

Преимуществами полусинтетических и синтетических диет по сравнению с полнорационными концентрированными комбикормами являются открытые и хорошо охарактеризованные формулы диет. Таким образом, при исследованиях с модификацией рациона, полусинтетические диеты обеспечивают преимущество за счет возможности варьирования, исключения и замены компонентов.

Обзор исследований, направленных на моделирование МетС путем варьирования компонентов рациона позволил выявить три основных подхода: использование диет с высоким содержанием фруктозы/сахарозы; диет с высоким содержанием жира; диет с высоким содержанием фруктозы/сахарозы и высоким содержанием жира (Sasidharan S. R. et al, 2013; Matias A. M. et al, 2018; Апрятин С. А. с соавт., 2016). В качестве жира в рационах используют преимущественно растительные (гидрогенизированное кокосовое масло, пальмовое масло) и животные жиры (лярд, сливочное масло и пр.).

Широкое распространение в экспериментальных исследованиях по моделированию МетС, нашла «Западная диета», содержащая холестерин (0,1 %) и жир (21 %), вызывающая нарушения липидного обмена и развитие стеатоза печени

(Котенкова Е. А., 2015; Veniaminova E. et al, 2020). «Западная диета» представлена на рынке в виде готового рациона ResearchDiet (США).

Интересным представляется изучение долгосрочных эффектов продолжительного потребления животными рациона, богатого холестерином и насыщенными жирами в различных модификациях.

Отдельно стоит отметить, что липидный метаболизм лабораторных грызунов (крысы и мыши) отличается от человеческого соотношением фракций липопротеидов, скоростью обмена, а также локализацией атероматозных процессов в аорте. Так, при участии в эксперименте инбредных животных необходимо использование самцов возрастом более 14 мес. и массой для крыс не менее 300 г, для мышей не менее 35 г. При этом сроки проявления симптомов могут составлять от 50 до 130 сут. Для сокращения сроков эксперимента используют трансгенных животных (например, линии мышей, нокаутных по АПО Е и рецептору ЛПНП, которым скармливают рацион, содержащий до 1,25 % холестерина). Дополнительное введение в рацион витамина D2 способствует процессу кальцинирования атеросклеротических бляшек за счет ингибирования функции щитовидной и паращитовидных желез (Pipelzadeh M. H. et al, 2003; Хабриев Р. У., 2005; Котенкова Е. А., 2015).

Далее приведены результаты экспериментального воспроизведения метаболических нарушений на мышах C57BL / 6 и крысах Wistar, у которых варьировали углеводную и жировую составляющую рациона.

Экспериментальное варьирование углеводной и жировой составляющей рациона для развития метаболических нарушений у мышей

Эксперимент проводили на половозрелых самках мышей C57BL / 6 возрастом 14 нед. (n=28), которых распределяли на группы по 7 особей:

Группа 1 – интактные животные, содержащиеся при равных условиях и потреблявшие контрольный рацион (KD);

Группа 2 – животные, которые потребляли коммерческую западную диету (WD) (ResearchDiets, США);

Группа 3 – животные, потребляющие аналог западной диеты (WDa);

Группа 4 – животные, которые потребляли рацион с высоким содержанием сахарозы (SD).

В качестве контрольного рациона (KD) взят полнорационный комбикорм для содержания крыс и мышей Ssniff V 1534-000 (Германия).

В качестве экспериментальных диет были взяты: западная диета (WD) ResearchDiets (США) и ее аналог, составленный из отечественных компонентов (WDa), а также диета с высоким содержание сахарозы (SD). Рассчитанная калорийность рационов представлена в Таблице 12.

Таблица 12. Калорийность экспериментальных рационов для мышей

Показатель	**Рацион**			
	KD	**WD**	**WDa**	**SD**
Белок, ккал/%	5,74	17,0	16,9	21,0
Жир, ккал/%	2,15	40,0	40,1	11,9
Углеводы, ккал/%	16,01	43,0	43,0	67,1
Калорийность, ккал/г	3,230	4,670	4,670	3,867

Рационы животным предоставлялись *ad libitum*. На протяжении эксперимента животных взвешивали, ежедневно учитывали количество потребленного корма и воды. В данном эксперименте световой день был инвертирован (с 20.00 до 8.00 – день, с 8.00 до 20.00 – ночь). На 19, 20 и 21 сут эксперимента во время темной фазы светового цикла на животных проводили поведенческие тестирования – «новая клетка» и «темно-светлая камера» (19 сут),

тест Порсолта (20 и 21 сут). На 22 сут эксперимента проводили тест на глюкозотолерантность. Продолжительность эксперимента составила 23 сут. Животных выводили из эксперимента путем наркотизации, после чего отбирали кровь из сердца, далее проводили перфузию физиологическим раствором, определяли относительную массу печени, обоих почек, селезенки, сердца и висцерального жира, отбирали образцы крови на исследование содержания WBC, LYM, GRA и MON, %LIM, %GRA, %MON, ОХС, ТГ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП.

Анализ динамики массы тела мышей не выявил статистически значимых изменений в группах сравнения, также не были отмечены существенные изменения в количестве поедаемого корма (Рисунок 18).

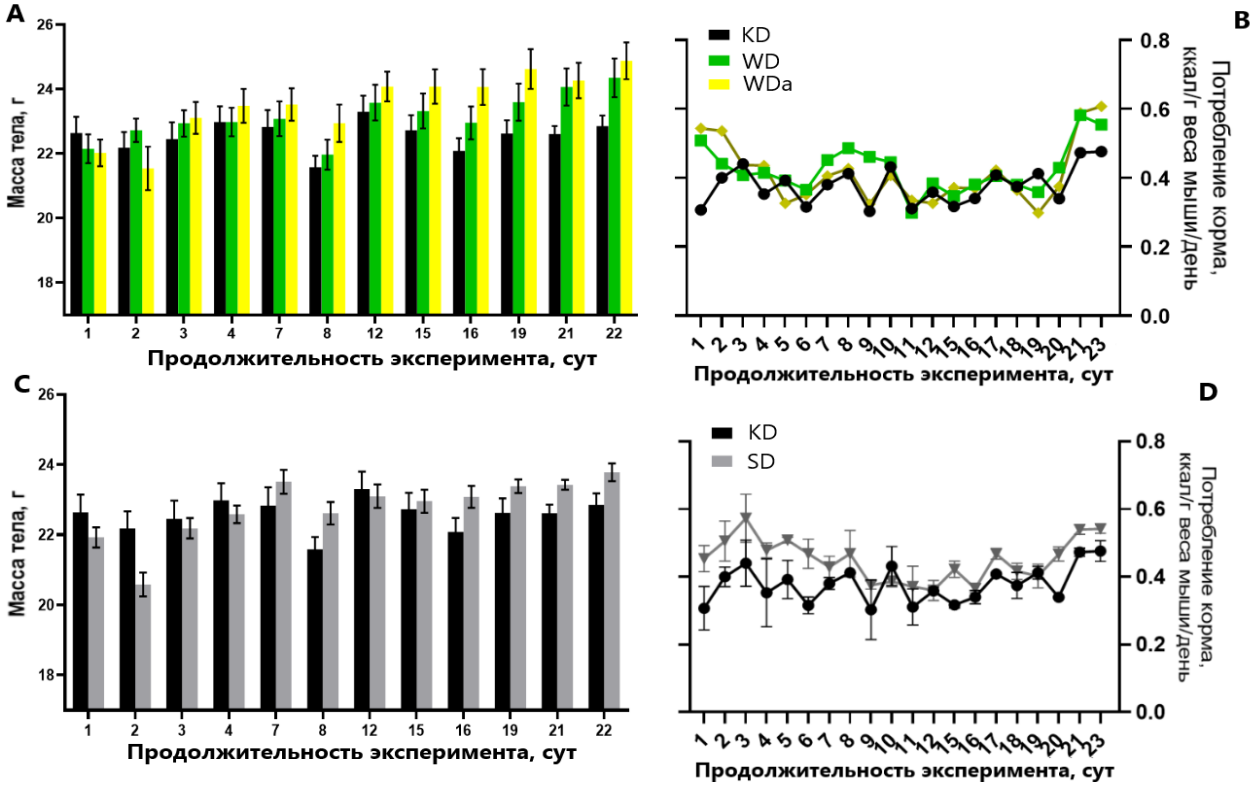


Рисунок 18 – Динамика массы тела мышей в течение эксперимента

Результаты ПГТТ животных представлены на Рисунках 19 и 20. После введения глюкозы восходящее колено гликемической кривой у групп 2 и 3 свидетельствовало о быстром всасывании глюкозы: через 10 мин после введения отмечена высокая концентрация глюкозы в крови, значительно превышавшая величину физиологической нормы, и сохранявшаяся вплоть до 15 мин. Уровень

гликемии через 30 мин после введения глюкозы значительно снизился, но не достиг исходного значения, что свидетельствует о нарушении ее утилизации.

Средняя площадь под кривой у мышей групп 2 и 3 превышала в 1,4 раза таковую у группы 1 (Рисунок 19).

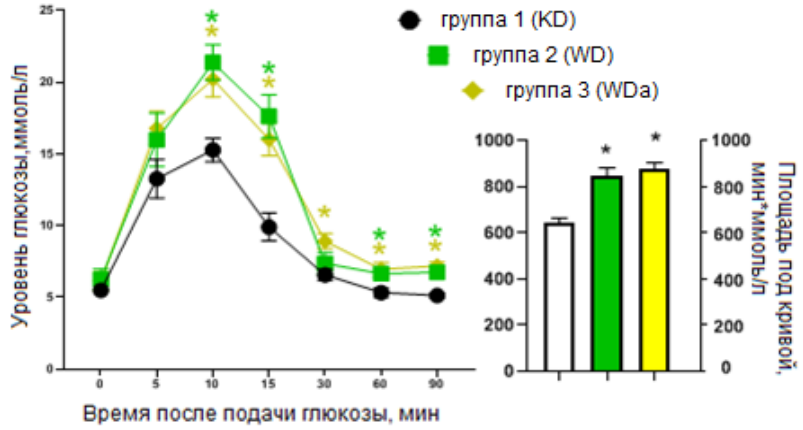


Рисунок 19 –Результаты ПГТТ: изменение уровня глюкозы в крови мышей групп 1 – 3

Потребление SD на протяжении 23 сут приводит к нарушению утилизации глюкозы (Рисунок 20). Об этом свидетельствовало резкое повышение концентрации глюкозы уже через 5 мин после ее введения, которое через 90 мин превышало значения контрольных животных группы 1. Средняя площадь под кривой у мышей группы 4 превышала в 1,23 раза таковую у группы 1.

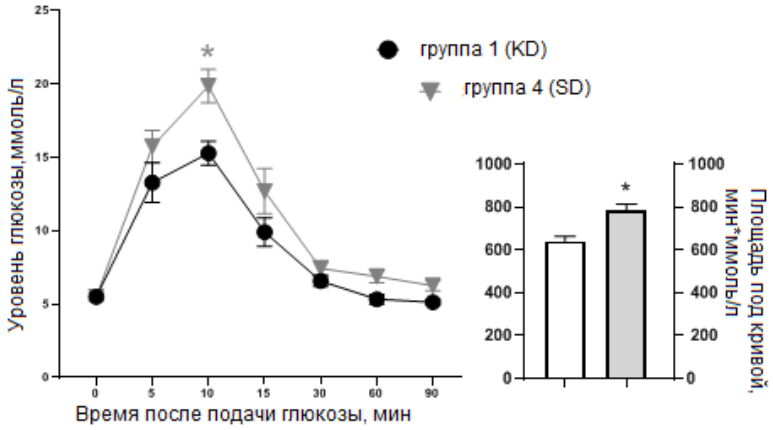


Рисунок 20 – Изменение уровня глюкозы в крови животных групп 1 и 4 в ПГТТ

Сопоставление результатов теста «вынужденное плавание» позволило выявить достоверные различия в поведенческих параметрах мышей групп 2, 3 и 4

(Рисунок 21, А), которые в отличие от мышей группы 1 проявляли более отчетливые признаки депрессивно-подобного поведения: большую часть времени проводили в состоянии пассивного плавания (дрейф и полная неподвижность в воде). Время флоатинга у мышей групп 2, 3 и 4 увеличивалось в 1,44 раза ($p<0,05$), 1,34 раза ($p=0,07$) и в 1,41 раз ($p<0,05$) соответственно относительно группы 1. При этом латентный период иммобилизации у животных групп 2, 3 и 4 был более коротким, но статистически значимым этот показатель (снижался в 2 раза относительно группы 1) был только для группы 3.

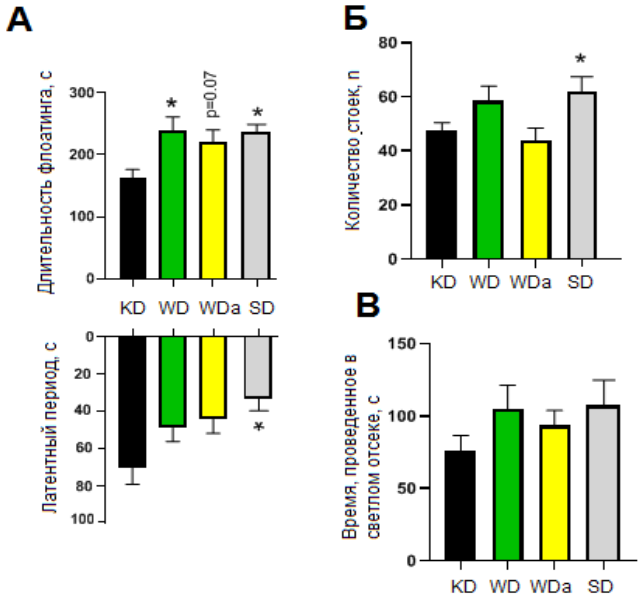


Рисунок 21 – Результаты поведенческих тестов животных.

Условные обозначения: А) тест Порсолта; Б) «новая клетка»; В) «темно-светлая» камера: KD – группа 1; WD – группа 2; WDa – группа 3; SD – группа 4. (* – $p<0,05$ относительно группы 1)

Анализ результатов теста «новая клетка» показал отсутствие статистически значимых изменений в исследовательском поведении мышей, потребляющих рационы WD и WDa: относительно интакта мыши группы 2 увеличивали количество стоек на 28,4 % ($p>0,05$), мыши группы 3 уменьшали на 10,5 % ($p>0,05$). При этом у мышей группы 4 выявлено статистически значимое увеличение количества стоек в 1,3 раза (Рисунок 21, Б).

Поведение мышей экспериментальных групп в тесте «темно-светлая камера» имело сложный характер, но различия не были статистически значимыми. Мыши

группы 1 предпочитали находиться в темной камере, тогда как мыши групп 2, 3 и 4 проводили больше времени в светлом отсеке (на 31,2%, на 20,8 % и 34,6 % относительно группы 1 соответственно) (Рисунок 21, В).

Результаты биохимического анализа плазмы крови мышей (Рисунок 22), позволили выявить следующее: у мышей групп 2 и 3 относительно группы 1 отмечено достоверное повышение содержания ОХС на 34 и 42 %, ХС ЛПНП до 30 %, ХС ЛПВП на 19 и 25 % и ХС не-ЛПВП и не-ЛПНП до 70 %; увеличение активности АЛТ и АСТ до 60 % и более чем на 20 %.

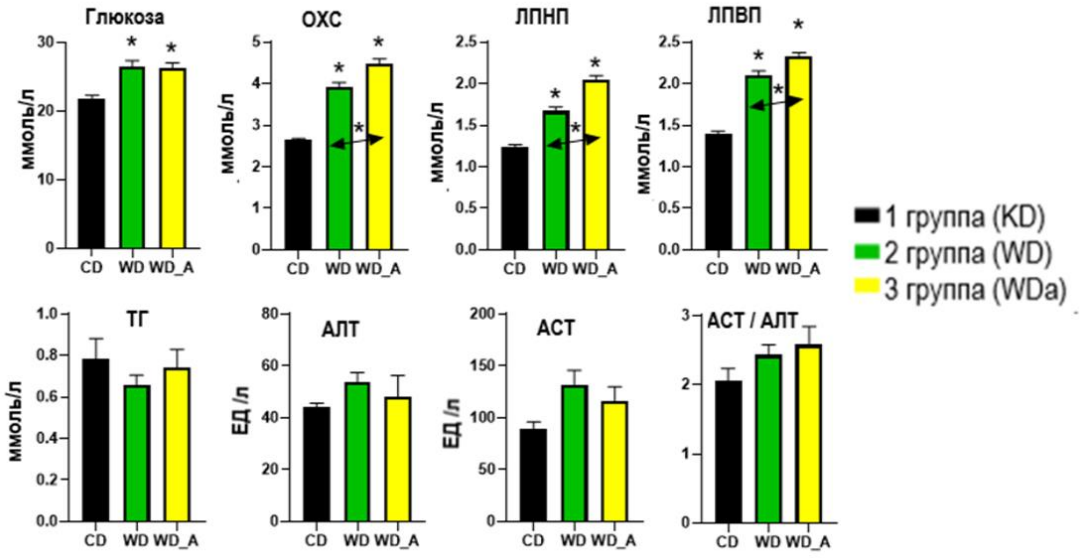


Рисунок 22 – Результаты биохимического исследования плазмы крови мышей

Анализ относительной массы внутренних органов не выявил статистически значимых изменений среди показателей всех экспериментальных групп (Рисунок 23).

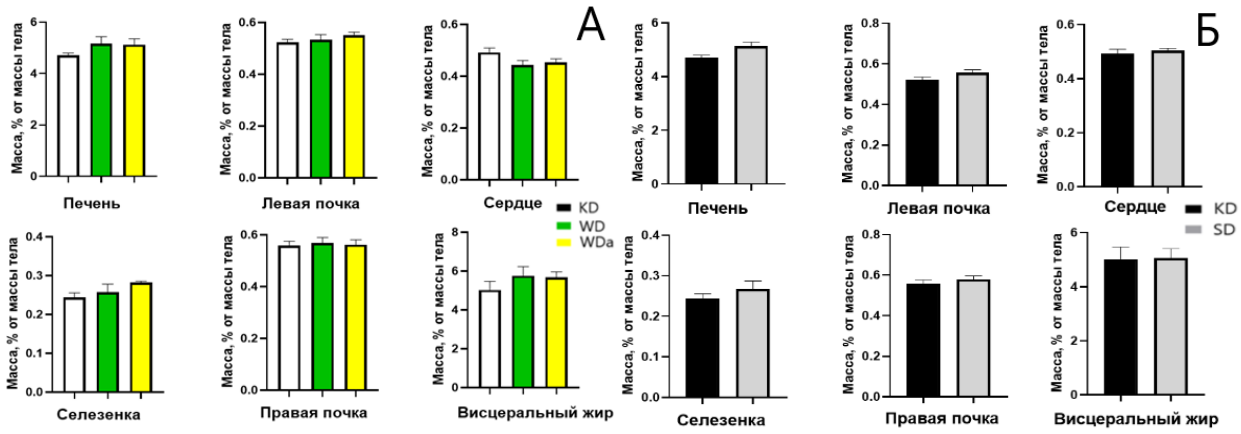


Рисунок 23 – Относительная масса внутренних органов экспериментальных мышей. Условные обозначения: А) групп 1, 2 и 3; Б) групп 1, 4

Гистологическое исследование выявило (Рисунок 24), что ткани печени экспериментальных мышей групп 2, 3 и 4 характеризовались накоплением липидов.

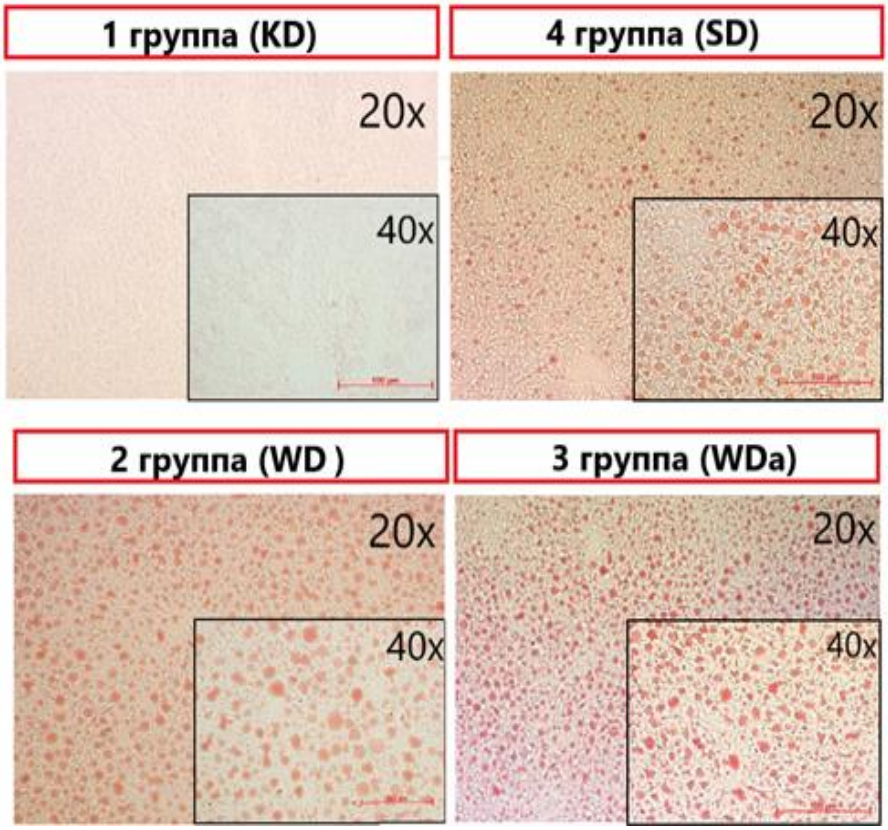


Рисунок 24 – Результаты гистологического исследования тканей печени (окраска ORO, (об. 20/40, ок. 10)

Окрашивание масляным красным позволило выявить нейтральные липиды (красно-оранжевое окрашивание) внутри цитоплазматических вакуолей, нарушающие архитектонику гепатоцитов, смещая их ядра на периферию клеток и сдавливая синусоидальные пространства. При этом, жировые включения имели крупные размеры (макровезикулярный стеатоз) и локализовались преимущественно в зонах печеночных долек расположенных ближе к центральной вене. Относительно группы 1 плотность окрашивания печени ORO у мышей групп 2 и 3 увеличивалось на 57 % и 68 %, у животных группы 4 – до 40 %.

Таким образом, показано, что богатая сахаром диета на протяжении 24 сут вызывает у мышей нарушения утилизации глюкозы и поведения (средняя площадь под кривой и время флоатинга увеличивалась в 1,2 и в 1,4 раза) и может быть

использована для изучения продуктов питания и ингредиентов, используемых в антидиабетическом питании (наряду с определением инсулинового индекса), а также продуктов с гипогликемической активностью,

В результате исследования показана возможность использования рационной модели «западной» диеты, содержащей 30% жира и 2% холестерина, для развития метаболических нарушений у мышей по типу неалкогольного стеатоза печени, характеризующихся снижением толерантности к глюкозе (средняя площадь под кривой увеличивалась в 1,4 раза); выраженным повышением в сыворотке крови ХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП и ХС не-ЛПВП и не-ЛПНП (более чем на 40%, 30%, 25%, 70%, соответственно) и стеатозом печени (плотность окрашивания печени ORO и активность АЛТ и АСТ увеличивалось до 60% и более чем на 20%), продолжительности флотинга (в 1,3-1,4 раза) при низком воздействии на катаболизм белков, лейкоцитарный профиль и при отсутствии влияния на массу тела и внутренних органов.

В соответствии с вышепредставленными результатами исследования в качестве основных маркеров, характеризующих функциональные нарушения по типу «неалкогольного стеатоза печени», выбраны: тест Порсолта, ПГТТ, WBC, %LIM, %GRA, %MON, ОХС, ТГ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ХС не-ЛПВП и не-ЛПНП, активность печеночных ферментов (АсАт, АлАт), гистологическое исследование печени (ORO).

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.

Моделирование липидных сбоев в организме лабораторных крыс путем варьирования жирового компонента рациона

Эксперимент проводили на крысах-самцах стока Wistar конвенциональной категории весом (380 ± 20) г, которых произвольно распределяли на две группы (варьирование по группе ± 10 г):

Группа 1 – интактные животные, потреблявшие на протяжении всего эксперимента общевиварный рацион (n=10);

Группа 2 – животные, подвергавшиеся моделированию алиментарной гиперлипидемии (АГЛ) в течение 91 сут (n=15).

Для моделирования АГЛ (Лисицын А. Б. с соавт., 2013) общевиварный рацион (ОР), представляющий собой полнорационный комбикорм (50 %) и проваренную перловую крупу (50 %), обогащали холестерином и животным жиром. Также крысам группы 2 перорально вводили витамин D2.

На Рисунке 25 представлена схема варьирования жирового компонента.

Продолжительность эксперимента, нед.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12-13
Лярд свиной, %			0,10	0,03	0,08	0,05					0,10	
Лярд бараний, %			0,05						0,10			
Холестерин, %	0,015										0,015	0,020
Витамин Д2, МЕ/кг	35000								17500			35000

Рисунок 25 – Схема варьирования компонентов рациона крыс группы 2

В Таблице 13 представлена калорийность рационов лабораторных животных на протяжении 12 нед. эксперимента из расчета на одно животное.

Таблица 13. Калорийность экспериментальных рационов животных в течение эксперимента (на 1 животное)

Питательное вещество	**Содержание**	**Продолжительность эксперимента, нед.**													
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14 – 17**
Группа 1 (интакт)															
Белки	ккал	26,0±0,5													
Жиры		24,0±0,3													
Углеводы		20,2±0,2													
Энергетическая ценность		63,2±0,5													
Группа 2 (АГЛ)															
Белки	ккал	28,3 ±0,5		26,1±0,5				30,0±0,5		25,2±0,5		28,3±0,5			27,0±0,5
Жиры		25,1±0,5		83,0±0,2	76,0±1,1		55,5±1,5			24,0±0,3		25,5±0,5			25,0±0,5
Углеводы		21,0±0,1		20,0±0,3				21,0±0,5		18,0±0,3		20,5±1,0			20,5±0,2
Энергетическая ценность		65,5±1,0		113,8±3,4			91,0±3,0			115,1±3,5		65,2±0,9			63,2±0,5
Холестерин	г	0,65	1,0	-								1,05			-
Витамин Д2	МЕ/кг	35 000						17 500				35 000			-

В процессе эксперимента проводили взвешивание животных на 15 нед. (106 сут) и 17 нед. (120 сут). Животных выводили из эксперимента оглушением в CO_2-камере, отбирали кровь из сердца, отбирали и взвешивали печень, почки, селезенку, сердце и висцеральный жир для определения относительной массы внутренних органов (в % от общей массы тела животного). В образцах крови животных определяли содержание ОХС, ТГ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП.

В процессе проведения эксперимента в группе 2 отмечена гибель крыс, которая наблюдалась начиная с 5 нед. эксперимента и составила за весь период эксперимента 26,7 % (Таблица 14).

Таблица 14. Количество погибших животных в течение эксперимента

Группа животных	**Период эксперимента, сут**					**За весь период эксперимента**
	7	**37**	**43**	**92**	**101**	
1 – интакт	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
2 – АГЛ	0/15	1/15	1/14	1/13	1/12	4/15

Динамика масса тела животных группы 1 стабильно увеличивалась с 0 по 5 нед. эксперимента (крысы набирали в среднем по 12 – 15 г/нед), с 5 по 7 нед масса тела была стабильной, с 8 по 11 нед масса тела крыс увеличивалась в среднем на 6 – 8 г/нед. Дальнейшее наблюдение выявило снижение массы тела животных на 14 и 16 нед. (до 6 г/нед.), с 12 по 19 нед масса увеличивалась в среднем на 0,5 – 1,0 г/нед. (рисунок 22). Масса тела животных группы 2 претерпевала значительные изменения на протяжении всего периода эксперимента. Стремительное увеличение массы животных наблюдалось с 0 по 1 нед и со 2 по 3 нед (в среднем до 22,5 г/нед.), чередуясь периодами стагнации (с 1 по 2 нед., с 3 по 5 нед животные набирали в среднем от 5,5 до 9,2 г/нед). С 7 по 14 нед. выявлено значительное снижение массы тела крыс группы 2 (в среднем от 32,7 г до 71,1 г/нед). Начиная с 13 и по 16 нед. масса тела животных снова увеличивалась (в среднем на 6,1 г/нед.), на 17 нед. масса тела снова снижалась (на 4,0 г/нед). Стоит отметить, что наибольшая разница между массой тела животных групп 1 и 2 отмечена на 1 и 3 нед. В этот период масса тела животных группы 2 была выше, чем у группы 1 на 5,1 % (p=0,085) и на 5,5 % (p=0,142). На 13 и 14 нед. масса тела крыс группы 2 была ниже, чем в группе 1 на 9,9 % (p=0,113) и на 7,0 % (p=0,121) соответственно (Рисунок 26).

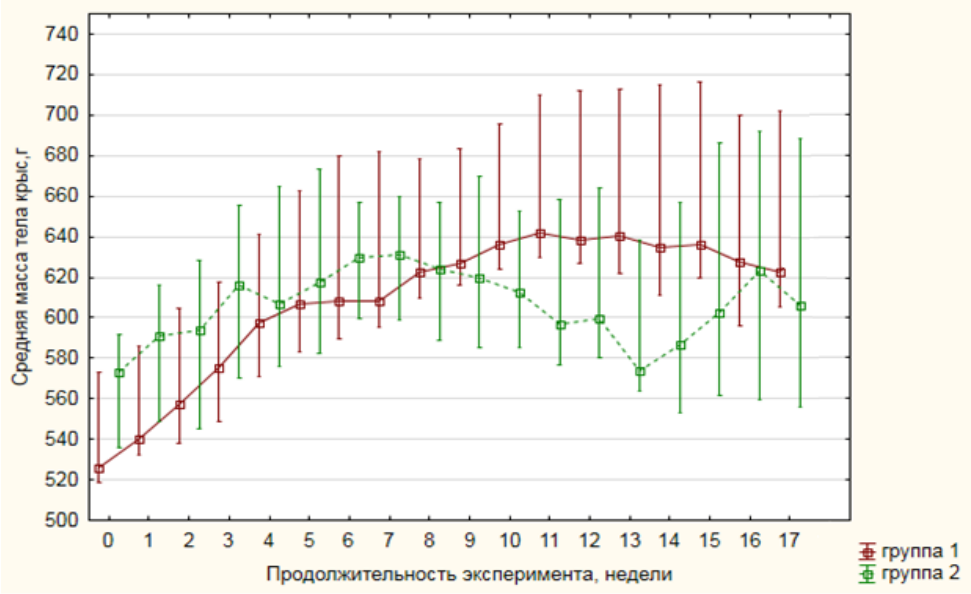


Рисунок 26 – Масса тела животных в течение эксперимента (данные представлены в виде M±m)

Моделирование АГЛ у животных сопровождалось ухудшением общего состояния: сгорбленной позой, неопрятностью шерстного покрова, аллопециями и воспалением кажных покровов в области шейного отдела, передних конечностей, что соответствовало полученным ранее результатам (Котенкова Е. А., 2015). Анализ гематологических показателей крови животных представлен в Таблице 15.

Таблица 15. Гематологические показатели крови крыс с АГЛ (Me [P25–P75])

Показатель	**Группа**	**Сутки**	
		T1 (106 сут)	**T2 (120 сут)**
WBC, 10^9/l	1	9,9 [7,3 – 9,9]	10,7 [10,4 – 11]
	2	13,5 [7,1 – 14,1]	10,1 [8,0 – 13,6]
LYM, 10^9/l	1	6,3 [5,6 – 7,9]	9,0 [8,5 – 9,2]
	2	6,8 [5,3 – 7,3]	**5,8 [5,5 – 6,7]***
LYM, %	1	76,8 [75,2 – 79,7]	81,8 [81,3 – 84,1]
	2	**51,9 [49,6 – 62,0]***	**70,4 [59,4 – 72]***
MID, 10^9/l	1	0,2 [0,1 – 0,3]	0,1 [0,1 – 0,1]
	2	**0,8 [0,5 – 1,6]***	0,2 [0,1 – 0,4]
%MON	1	2,0 [0,6 – 4,2]	0,6 [0,6 – 0,6]
	2	7,2 [5,6 – 10,2]	**1,8 [1,2 – 3,2]***
GRAN, 10^9/l	1	1,6 [1,5 – 1,8]	1,8 [1,6 – 2,0]
	2	**5,1 [2,2 – 6,0]***	**2,8 [2,2 – 5,5]***
%GRAN	1	20,6 [18,3 – 22,6]	17,3 [15,3 – 18,1]
	2	**38,0 [31,5 – 42,8]***	**28,6 [26,2 – 38,8]***
RBC, 10^{12}/l	1	7,4 [7,4 – 8,1]	8,1[7,7 – 8,3]
	2	**8,8 [8,3 – 9,1]***	8,2 [7,7 – 8,6]
HGB, g/l	1	128,0 [127,0 – 143,0]	146,5 [142,8 – 150,0]
	2	**150,0 [144,5 – 156,5]***	137,5 [130,5 – 150,3]
HCT, %	1	37,3 [36,9 – 41,5]	40,8 [40 – 41,8]
	2	**44,4 [43,2 – 45,6]***	40,0 [38,2 – 43,0]
MCV, mkm^3	1	51,0 [50,0 – 51,0]	51,0 [50,0 – 52,0]
	2	50,5 [50,0 – 51,0]	50,0 [49,0 – 51,5]
MCH, mkm^3	1	17,5 [17,1 – 17,9]	18,2 [17,8 – 18,3]
	2	17,2 [16,7 – 17,4]	17,1 [16,9 – 17,7]
MCHC, g/l	1	345,0 [343,0 – 348,0]	358,0 [349,5 – 362,0]
	2	340,0 [332,0 – 343,3]	**347,5 [339,8 – 348,5]***
PLT, 10^9/l	1	723,0 [719,0 – 729,0]	822,0 [723,0 – 826,0]
	2	735,0 [603,5 – 795,0]	707,0 [663,0 – 811,3]*
PCT, %	1	0,5 [0,5 – 0,5]	0,7 [0,6 – 0,8]
	2	0,5 [0,5 – 0,6]	**0,5 [0,5 – 0,6]***
MPV, mkm^3	1	6,6 [6,5 – 6,7]	6,6 [6,4 – 6,7]
	2	**7,1 [6,9 – 7,3]***	**7,0 [6,8 – 7,2]***
PDWc, %	1	32,6 [31,9 – 32,6]	32,7 [31,9 – 33,4]
	2	**34,4 [33,2 – 36]***	33,3 [33 – 33,8]
GRAN/LYM	1	0,3 [0,2 – 0,3]	0,2 [0,2 – 0,2]
	2	**0,8 [0,5 – 0,8]***	**0,4 [0,4 – 0,9]***

Примечание: * – $p<0,05$ относительно группы 1.

У животных группы 2 на 106 сут (Таблица 15) относительно группы 1 отмечены следующие изменения: увеличение %MID в 4 раза (p=0,008), GRAN в 3,2 раза (p=0,040) и %GRAN в 1,8 раза (p=0,008), отношения гранулоцитов к лимфоцитам в 2,7 раза (p=0,0019); эритроцитов, гемоглобина и гематокрита в 1,2 раза (p=0,008, p=0,013, p=0,013); среднего объема тромбоцитов и ширины распределения тромбоцитов по объему на 7,0 % (p=0,008) и 5,2 % (p=0,019) при снижении относительного содержания лимфоцитов на 32,4 % (p=0,008).

На 120 сут эксперимента в крови крыс группы 2 относительно группы 1 выявлено (Таблица 15) выявлено увеличение: GRAN в 1,5 раза (p=0,006) и %GRAN в 1,7 раза (p<0,001), %MON в 3 раза (p=0,020), отношения гранулоцитов к лимфоцитам в 2 раза (p=0,003); среднего объема тромбоцитов на 5,7 % (p=0,006) при снижении LIM на 35,5 % (p=0,001) и %LIM на 13,9 % (p<0,001) и средней концентрации гемоглобина в эритроцитах на 2,9 % (p=0,040), тромбокрита на 28,6 % (p=0,014).

При анализе биохимических показателей сыворотки крови животных группы 2 относительно группы 1 на 106 сут эксперимента отмечено (Таблица 16): снижение содержания креатинина на 7,2 % (p=0,032), увеличение активности липазы в 3,8 раза (p=0,037), увеличение ХС в 2,2 раза (p=0,012), ХС ЛПНП – на 24,2 % (p=0,022), не-ЛПНП и не-ЛПВП и индекса атерогенности сыворотки крови в 15,8 раз и в 2,5 раза (p=0,012).

На 120 сут эксперимента наблюдалось снижение содержания альбумина на 10,0 % (p=0,008) и мочевины на 24,3 % (p=0,032), увеличение креатинина на 10,4 % (p=0,016), увеличение активности липазы в 2,8 раза (p=0,008), снижение активности амилазы на 34,5 % (p=0,008), увеличение общего холестерина в 1,6 раза (p=0,008) и ХС ЛПНП в 1,4 раза (p=0,008), увеличение не-ЛПНП и не-ЛПВП в 2,5 раза (p=0,008) и ИА в 1,7 раза (p=0,055) (Таблица 16). При сравнении показателей крови на 106 и 120 сут статистически значимых изменений не выявлено.

Таблица 16. Биохимические показатели сыворотки крови крыс с АГЛ (Me [P25-P75])

Показатель	Группа	Сутки	
		Т1 (106 сут)	**Т2 (120 сут)**
Общий белок, г/л	1	68,30 [66,90 – 73,90]	72,90 [68,70 – 74,40]
	2	67,10 [66,90 – 72,30]	71,25 [69,77 – 71,95]
Альбумин, г/л	1	41,00 [40,80 – 43,60]	39,90 [39,70 – 40,20]
	2	52,50 [47,00 – 57,50]	**35,90 [34,87 – 36,6]***
Креатинин, мкмоль/л	1	6,56 [6,31 – 6,82]	41,00 [40,50 – 42,00]
	2	**6,09 [5,79 – 6,13]***	**45,25 [44,12 – 46,37]***
Мочевина, ммоль/л	1	6,56 [6,31 – 6,82]	7,73 [6,56 – 7,55]
	2	6,09 [5,79 – 6,13]	**5,85 [5,45 – 6,07]***
Билирубин общ., мкмоль/л	1	3,00 [3,00 – 3,50]	2,80 [2,40 – 3,20]
	2	3,70 [3,00 – 3,70]	2,40 [2,40 – 2,55]
Билирубин прямой, мкмоль/л	1	1,80 [1,80 – 2,30]	2,00 [1,40 – 2,00]
	2	1,90 [1,70 – 2,20]	1,60 [1,52 – 1,70]
АсАт, Е/л	1	140,63 [140,62 – 142,39]	101,45 [74,11 – 101,82]
	2	145,05 [110,74 – 151,17]	114,00 [102,80 – 126,13]
АлАт, Е/л	1	47,00 [44,50 – 49,00]	47,00 [46,00 – 50,00]
	2	49,00 [46,00 – 55,00]	52,50 [44,25 – 58,00]
ЩФ, Е/л	1	128,70 [127,90 – 250,20]	160,70 [156,10 – 181,80]
	2	256,20 [253,80 – 274,50]	176,05 [161,90 – 215,70]
ГГТ, Е/л	1	2,40 [2,13 – 3,06]	1,64 [1,49 – 1,97]
	2	2,82 [2,55 – 3,50]	2,54 [2,12 – 2,69]
Липаза, Е/л	1	91,10 [78,23 – 124,72]	67,15 [59,44 – 89,47]
	2	**344,73 [243,00 – 345,48]***	**190,55 [136,98 – 317,10]***
КК, Е/л	1	798,56 [519,67 – 947,55]	616,52 [408,68 – 694,19]
	2	1192,63 [666,88 – 1262,85]	584,72 [515,07 – 653,60]
ЛДГ, Е/л	1	550,9 [450,05 – 559,96]	298,07 [165,23 – 309,34]
	2	420,66 [415,00 – 445,46]	239,92 [212,30 – 334,27]
Глюкоза, ммоль/л	1	14,30 [9,50 – 14,60]	14,20 [10,90 – 15,80]
	2	11,80 [8,60 – 13,40]	16,25 [12,57 – 24,92]
Амилаза Е/л	1	493,00 [469,00 – 653,00]	609,00 [604,00-633,00]
	2	494,00 [405,00 – 519,00]	**399,00 [354,25 – 431,25]***
ОХС, ммоль/л	1	1,34 [1,15 – 1,58]	1,62 [1,34 – 1,82]
	2	**2,90 [2,89 – 2,94]***	**2,64 [2,49 – 2,88]***
ТГ, ммоль/л	1	1,20 [1,20 – 1,30]	1,70 [1,20 – 1,80]
	2	1,80 [1,30 – 2,10]	1,65 [1,30 – 2,10]
ХС ЛПНП, ммоль/л	1	0,69 [0,56 – 0,74]	0,65 [0,52 – 0,66]
	2	**0,91 [0,91 – 0,93]***	**0,93 [0,85 – 1,02]***
ХС ЛПВП, ммоль/л	1	0,56 [0,52 – 0,59]	0,64 [0,52 – 0,66]
	2	0,71 [[0,71 – 0,72]	0,65 [0,63 – 0,80]

продолжение Таблицы 16

не-ЛПНП и не-ЛПНП, ммоль/л	1	0,08 [0,07 – 0,196]	0,41 [0,20 – 0,55]
	2	**1,26 [1,22 – 1,32]***	**1,02 [0,97 – 1,14]***
ИА	1	1,22 [0,92 – 1,69]	1,83 [1,43 – 1,94]
	2	**3,10 [3,00 – 3,13]***	3,03 [2,55 – 3,15]
Калий, ммоль/л	1	6,95 [6,20 – 6,99]	6,15 [5,34 – 6,28]
	2	6,17 [5,75 – 6,70]	5,64 [5,33 – 6,17]
Кальций, ммоль/л	1	3,60 [3,20 – 3,60]	3,70 [3,60 – 4,00]
	2	3,50 [3,50 – 3,80]	3,65 [3,52 – 3,95]
Хлор, ммоль/л	1	92,00 [88,00 – 96,00]	98,00 [94,00 – 98,00]
	2	85,00 [84,00 – 88,00]	99,00 [96,00 – 100,00]
Фосфор, ммоль/л	1	2,40 [2,40 – 3,10]	2,60 [2,50 – 3,10]
	2	3,00 [2,90 – 3,10]	2,45 [2,22 – 2,50]
Магний, ммоль/л	1	1,72 [1,54 – 1,84]	1,27 [1,18 – 1,49]
	2	1,95 [1,88 – 2,00]	1,30 [1,24 – 1,34]

Примечание: * – $p<0,05$ относительно группы 1.

На 106 сут эксперимента у крыс группы 2 отмечено увеличение относительной массы селезенки на 82,0 % и легких до 50 % ($p<0,05$) по сравнению с интактом, снижение относительной массы печени и правой почки до 20% ($p>0,05$). На 120 сут зафиксировано увеличение относительной массы селезенки, печени и легких до 45 % ($P<0,05$), по сравнению с интактом.

На 106 сут у животных с АГЛ отмечено увеличение концентрации МДА на 24,7 % ($p>0,05$) при существенном снижении АОА сыворотки крови в 2,1 раза ($P<0,05$) относительно интакта (Рисунок 27).

На 120 сут у животных с АГЛ также отмечено увеличение концентрации МДА на 60,9 % ($P<0,05$) при снижении АОА сыворотки крови на 36,5 % ($P<0,05$) по сравнению с интактом.

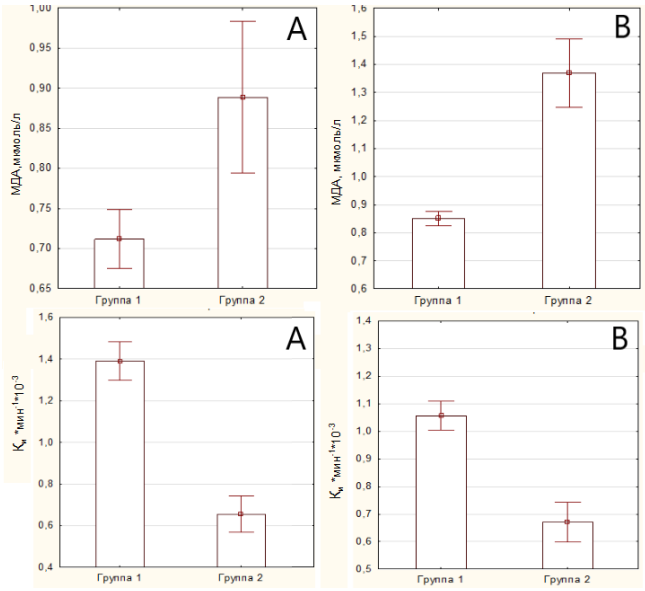


Рисунок 27 – Результаты оценки антиоксидантного статуса крыс с АГЛ. Условные обозначения: А) на 106 сут; В) на 120 сут

Таким образом, у крыс с АГЛ по сравнению с интактом выявлено: на 106 сут – увеличение MID (в 4 раза), GRAN (в 3,2 раза), %GRA (в 1,8 раза), %MON и GRAN/LIM (в 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 ХС (в 2,2 раза, $p<0,05$), ХС ЛПНП (на 24,2 %, $p<0,05$) и ХС не-ЛПНП и не-ЛПВП (в 15,8 раза, $p<0,05$), ИА сыворотки крови (в 2,2 раза, $p<0,05$), МДА (на 24,7 %, $p>0,05$) при снижении АОА сыворотки крови (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 сыворотки крови (в 1,7 раза, $p<0,05$), МДА (на 60,9 %, $p<0,05$), АОА сыворотки крови снижался (на 36,5 %, $p<0,05$). Достоверных изменений относительной массы органов не выявлено.

Описанная модель АГЛ, заключающаяся в варьировании жирового компонента рациона на протяжении долгого периода, позволяет воспроизвести нарушения липидного обмена, сохраняющиеся в течение 21 сут после завершения моделирования. Стоит отметить, что варьирование жирового компонента (от 3 до 5% насыщенных жиров) и холестерина (1,5-2,0%, с значительным перерывом)

обусловлено высоким адаптационным потенциалом крыс, при этом введение большего количества жира может быть нецелесообразным ввиду этой же причины.

Модель может быть использована для изучения медленнодействующих биоактивных веществ и 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 сыворотки крови, АОА, МДА.

Экспериментальное моделирование острой дислипидемии путем введения химических агентов

Для моделирования «быстрых» гиперлипидемий в лабораторной практике в качестве индукторов заболевания широко применяются вещества полусинтетической природы (детергенты). Такие модели применимы для кратковременных исследований, в том числе кинетических, и для изучения профилактических и протекторных свойств объектов. При этом исследование липидоснижающей активности изучаемых объектов проводят либо одновременно с введением детергента (Oulmouden F. et al, 2011), либо после предварительного насыщения организма исследуемым веществом (Хабриев Р. У., 2005). Развитие дислипидемии при использовании детергентов (poloxamer 407, Тритон WR, Твин-80 и пр), обусловлено ингибированием липаз (Ходько С. В. с соавт, 2016) и препятствованию захватывания гепатоцитами циркулирующих в крови липопротеинов, что приводит к резкому увеличению концентрации триглицеридов и ОХ ЛПНП в плазме крови (Friedman M., Byers S. O., 1952; Клишевич М. С. с соавт., 2008; Короленко Т. А., Тузиков Ф. В., Васильева Е. Д., 2010; Girija K. et al, 2011; Kumar D. et al, 2012). Выраженный эффект после введения детергента может сохраняться до 48 ч, а незначительное увеличение липидов в плазме крови наблюдается до 7 сут (Saravanakumar A. et al,, 2010; Bertges L. C. et al,, 2011).

Эксперимент проводили на крысах-самцах стока Wistar конвенциональной категории весом (220,0±5,2) г, которых произвольно распределяли на две группы:

Группа 1 – животные, которым вводили Твин Х-100 (n=20);

Группа 2 – интактные животные, потреблявшие на протяжении всего эксперимента общевиварный рацион (n=8).

Через 24 и 48 ч после введения химического агента отбирали кровь для гематологического и биохимического исследования.

При сравнении результатов гематологического исследования крови крыс группы 1 и 2 (Таблица 17) показано, что введение Твина Х100 через 24 и 48 ч приводило к увеличению содержания MID в 2 и 3 раза (p=0,041; p<0,001), %MON в 2,7 и 6,3 раза (p=0,035; p<0,001) при снижении через 24 ч GRAN и %GRAN на 32,0 % (p=0,517).

Таблица 17. Результаты гематологического анализа крови крыс с ДЛ через 24 и 48 ч (Me [P25 – P75])

Показатель	**Группа 1**		**Группа 2 (интакт)**	**P-value T1 vs T2**
	T1 (24 ч)	**T2 (48 ч)**		
WBC, 10^9/l	7,2 [6,6 – 8,3]	5,4 [4,8 – 6,7]	7,2 [4,2 – 8,9]	0,173
LYM, 10^9/l	5,9 [5,4 – 6,9]	4,1 [3,7 – 5,2]	4,9 [3,0 – 6,5]	0,298
MID, 10^9/l	**0,2 [0,2 – 0,2]***	**0,3 [0,3 – 0,4]***	0,1 [0,0 – 0,1]	**0,005**
GRAN, 10^9/l	1,1 [1,1 – 1,2]	1,1 [0,9 – 1,1]	1,2 [1,0 – 1,8]	0,298
LYM, %	81,9 [81,4 – 83,1]	76,9 [75,9 – 77,7]	76,5 [69,1 – 81,5]	0,230
MON, %	2,7 [2,5 – 2,8]	6,3 [5,6 – 6,9]	1,0 [0,7 – 1,1]	**0,008**
GRAN, %	15,3 [14,5 – 15,8]	16,8 [15,7 – 18,5]	22,5 [17,3 – 29,9]	0,378
RBC, 10^{12}/l	**7,2 [7 – 7,5]***	7,5 [7,5 – 7,6]	8,3 [8 – 8,6]	0,088
HGB, g/l	144,5 [140,3 – 150]	148 [146 – 148,8]	150,5 [146,8 – 153,3]	0,471
HCT, %	**39,5 [37,7 – 40,8]***	**40,0 [38,8 – 40,3]***	42,8 [41,9 – 43]	0,970
MCV, mkm^3	**54,5 [53,3 – 55]***	52,0 [51,1 – 53,0]	51,5 [47,5-53]	**0,030**
MCH, mkm3	**19,8 [19,4 – 20,1]***	**19,6 [19,2 – 19,7]***	18,4 [17,2 – 18,7]	0,970
MCHC, g/l	**365,5 [361,0 – 368,0]***	**372,0 [370,5 – 376,5*]**	351,0 [347,5 – 352,8]	**0,023**
PLT, 10^9/l	**530,5 [498,5 – 654,3]***	**590,0 [498,0 – 607,0]***	702,0 [661,3 – 774,3]	1,000
PCT, %	**0,3 [0,3 – 0,4]***	**0,3 [0,3 – 0,4]***	0,5 [0,4 – 0,5]	0,970
MPV, mkm3	**6,1 [5,8 – 6,2]***	6,3 [6 – 6,4]	6,4 [6,3 – 6,5]	0,286
PDWc, %	32,3 [31,5 – 32,9]	33 [32,4 – 33,7]	32,7 [32 – 33,1]	0,307

Примечание: * – p<0,05 относительно группы 3.

Через 24 ч – к снижению содержания эритроцитов на 13,2 % (p=0,001) при увеличении среднего объема эритроцита через 24 ч на 5,8 % (p=0,009), через 24 и 48 ч – к снижению гематокрита на 7,7 и 6,5 % (p=0,223) при увеличении средней концентрации гемоглобина в эритроците на 7,6 % (p<0,001) и 6,5 % (p=0,004), средней концентрации гемоглобина в эритроцитах на 4,1 % (p=0,025) и на 6,0 % (p<0,001);

снижению содержания тромбоцитов на 24,4 % и на 15,9 % (p=0,007); тромбокрита на 40,0 % (p=0,005 и p=0,002) и среднего объема тромбоцитов через 24 ч на 4,7 % (p=0,022). Через 48 ч происходило статистически значимое увеличение содержания смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток и относительного содержания моноцитов в 1,5 раза, относительного содержания моноцитов в 2,3 раза, снижение среднего объема эритроцитов на 4,6 % и средней концентрации гемоглобина в эритроцитах на 29,9 % (Таблица 17). Результаты биохимических исследований сыворотки крови крыс с ДЛ представлен в Таблице 18.

Таблица 18. Результаты биохимического анализа крови крыс с ДЛ через 24 и 48 час (Me [P25–P75])

Показатель	**Группа 1**		**Группа 2**	**P-value T1 vs T2**
	T1 (24 ч)	**T2 (48 ч)**		
Общий белок, г/л	65,2 [63,8 – 66,2]	66,8 [65,8 – 68,8]	64,5 [64,1 – 64,6]	0,151
Альбумин, г/л	42,2[41,7 – 42,6]	43,2 [43 – 45,2]	41,8 [41,2 – 42,6]	0,310
Креатинин, мкмоль/л	62,0 [61,0 – 62,0]	53,0 [53,0 – 55,0]	55,5 [54 – 62]	**0,008**
Мочевина, ммоль/л	9,0 [8,1 – 9,4]	6,2 [6,2 – 6,7]	7,8 [7,2 – 8,4]	**0,016**
Билирубин (общ.), мкмоль/л	**2,8 [2,7 – 3,2]***	**2,4 [2,3 – 2,5]***	1,7 [1,5 – 1,9]	**0,016**
АсАт, Е/л	**132,7 [124,2 – 159,6]***	82,0 [80,5 – 82,3]	107,7 [81,7 – 112,6]	**0,008**
АлАт, Е/л	**48,5 [48 – 56]***	26,5 [26 – 34]	32,5 [30,5 – 33]	**0,008**
Щелочная фосфатаза, Е/л	308,6 [257,5 – 344,4]	180,3 [178,8 – 226,6]	215,0 [172,2 – 240,9]	0,151
ГГТ, Е/л	2,2 [1,8 – 2,4]	2,0 [1,8 – 3,6]	2,2 [2,2 – 2,7]	0,841
ЛДГ, Е/л	301,3 [266,2 – 540]	195,8 [195,2 – 236,2]	245,9 [206,3 – 363,3]	**0,032**
Глюкоза, ммоль/л	**7,8 [5,8 – 7,9]***	**7,3 [6,4 – 8]***	15,0 [13,4 – 16,8]	0,548
Холестерин, ммоль/л	**4,0 [3,9 – 4,1]***	3,2 [3 – 3,5]	2,2 [2,0 – 2,3]	**0,008**
Триглицериды, ммоль/л	**0,5 [0,5 – 0,5]***	**0,4 [0,4 – 0,4]***	1,2 [1,0 – 2,5]	0,222
ХС ЛПНП, ммоль/л	**2,2 [2,1 – 2,3]***	1,8 [1,7 – 2,0]	0,6 [0,5 – 0,7]	**0,032**
ХС ЛПВП, ммоль/л	**1,6 [1,5 – 1,6]***	**1,4 [1,3 – 1,6]***	1,0 [1,0 – 1,1]	0,310
не-ЛПНП и не-ЛПНП, ммоль/л	0,2 [0,0 – 0,3]	0,0[0,0 – 0,0]	0,4 [0,4 – 0,6]	0,310
ИА	1,5 [1,3 – 1,6]	1,3 [1,2 – 1,4]	0,9 [0,8 – 1,3]	0,151

Примечание: * – p<0,05 относительно группы 3.

Выявлены следующие изменения в крови крыс группы 1 относительно группы 2: через 24 ч – увеличение общего билирубина в 1,6 раза (p<0,001), АсАт и АлАт на 18,8 % (p=0,044) и 33,0 % (p=0,011), общего холестерина в 1,8 раза (p<0,001), ХС ЛПНП в 3,7 раза (p<0,001) и ХС ЛПВП на 62,5 % (p=0,003) при снижении глюкозы в 1,9 раза

(p=0,003) и триглицеридов в 2,4 раза (p=0,030); через 48 ч – увеличение общего билирубина на 70,3 % (p<0,048), ОХС в 1,5 раза (p=0,099), ХС ЛПНП на 37,5 % (p=0,055) и ХС ЛПВП на 28,6 % (p=0,034) при снижении глюкозы в 2 раза (p=0,011) и триглицеридов в 3 раза (p=0,002). Через 48 ч относительно 24 часа наблюдалось достоверное снижение общего билирубина на 14,3 %, АсАт на 38,2 %, АлАт на 45,4 %, ЛДГ на 35,0 %, общего холестерина на 20,0 % и ХС ЛПНП на 18,2 %(Таблица 17).

В результате эксперимента установлено, что ТвинХ100 при однократном введении вызывает достоверные изменения со стороны показателей, характеризующих функциональную активность лейкоцитов (увеличение абсолютного и относительного содержания смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток (в 2 и 3 раза через 24 ч, прогрессирующие до 2,7 и 6,3 раза – через 48 ч); эритроцитов (на 13 %) при увеличении гематокрита (до 8 %), средней концентрации гемоглобина в эритроцитах (на 4 % – через 24 ч), частично сохраняющиеся через 48 ч (увеличение средней концентрации гемоглобина в эритроцитах до 6%); тромбоцитов (снижение содержания тромбоцитов на 24%, тромбокрита на 40 % и среднего объема тромбоцитов (до 5 % – через 24 ч), частично сохраняющиеся через 48 ч (увеличение тромбоцитов и тромбокрита (на 16 % и 40,0 %). Через 24 ч после введения ТвинаХ100 выявлены достоверные изменения со стороны «печеночных» показателей – увеличение общего билирубина (в 1,6 раза), активности АсАт (на 19%) и АлАт (на 33,0 %); липидного спектра – увеличение общего холестерина (в 1,8 раза), ХС ЛПНП (в 3,7 раза); ХС ЛПВП (на 63 %) при снижении триглицеридов (в 2,4 раза), некоторые из которых сохранялись до 48 ч – увеличение общего билирубина (на 70 %), общего холестерина (в 1,5 раза), ХС ЛПНП (на 37 %) и ХС ЛПВП (до 29 %) при снижении триглицеридов (в 3 раза).

Таким образом, модель позволяет воспроизвести кратковременные, но значительные сдвиги в углеводном и липидном обмене крыс, ввиду может быть применима для изучения профилактических (введение детергента после предварительного насыщения организма исследуемым объектом) свойств объектов с выраженными гиполипидемическими эффектами. В качестве основных маркеров, характеризующих функциональные нарушения, были исследованы WBC, MID, АсАт, АлАт, ОХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ТГ, ИА сыворотки крови.

5.4.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНЫХ СИСТЕМ

Повреждения центральной и периферической нервных систем являются проблемой, затрагивающей всех людей. Для разработки адекватных пищевых продуктов для профилактики различных подтипов инсульта и травм, а также реабилитации после заболевания необходимо проведение комплексных исследований, в т.ч. числе с использованием животных-биомоделей (Takahiko I. et al, 2019). Успех таких исследований зависит от выбора экспериментальной модели, поскольку неадекватная модель может привести к ограничениям, которые ставят под угрозу результаты и анализ. Кроме того, экстраполяция результатов моделей животных на людей может быть ненадежной. Для моделирования инсульта в основном используют грызунов, из-за стоимости, этических соображений, наличия стандартизированных нейроповеденческих оценок и простоты физиологического мониторинга (Liu H. et al, 2017; Vahidinia Z., 2019). Для изучения нейропротективных свойств различных агентов в качестве объектов исследования используют как мышей, так и крыс (Ellenbroek B., Youn J., 2016). Однако ввиду большего размера последних (во взрослом возрасте крысы весят в 8 – 10 раз больше, чем мыши), эксперименты с их использованием гарантируют ряд практических преимуществ, особенно в отношении хирургических процедур. Модели повреждения головного, спинного мозга и периферических нервов с использованием крыс имеют большую трансляционную ценность (Kjell J., Olson L., 2016). Кроме того, у крыс и мышей показаны существенные различия в пластичности нейронов гиппокампа и корковой области головного мозга (Snyder J.S. et al, 2009). Установлено, что скорость нейрогенеза в гиппокампе половозрелых крыс намного выше, чем у мышей и, что важно, у крыс новые клетки созревают примерно на 2 нед. раньше, чем у мышей, а вероятность их активации в 10 раз выше (Lazarov O., Hollands C., 2016).

Существует линия крыс, склонных к инсульту (SHR и SHRSP), которые представляют собой экспериментальную модель, характеризующуюся высокой

частотой спонтанных инсультов, а также повышенной чувствительностью к экспериментально индуцированной фокальной ишемии головного мозга (Rubattu S. Et al, 2017). Преимущества использования крыс SHR в исследовании инсульта заключаются в наличии сопутствующей гипертонии и в развитии воспроизводимого инфаркта адекватного размера после окклюзии дистальной средней мозговой артерии. В то же время данная модель имеет существенные недостатки – крысы SHR и SHRSP являются дорогостоящими и при достижении определенного возраста отмечается высокая смертность животных. Также необходимо отметить, что данные крысы являются устойчивыми к терапии (Yao H., Nabika T., 2012). Кроме того, у крыс SHRSP обычно бывает ишемический или реже геморрагический инсульт в коре, а не в стволе мозга, мозжечке или базальных ганглиях, как у пациентов с гипертонией (Iida S. et al, 2005). Поэтому для изучения нейропротекторных свойств в качестве биотест-системы были выбраны крысы стока Wister, как основные модели для моделирования повреждения центральной и периферической нервной системы.

В современных публикациях упоминаются два основных типа моделей нарушения высшей нервной деятельности с применением химических агентов для развития у животных постинсультного синдрома и хирургические модели спонтанного инсульта (Krafft P. et al, 2012).

Ишемические повреждения в основном вызываются повреждением сосудов – перевязкой средней мозговой артерии либо сонных артерий у крыс (Tamura A., Graham D. J., 1981; Топчян А. В. с соавт., 1996; Гаевый М. Д., с соавт., 2001). Стоит отметить достаточно малое количество моделей инсульта с геморрагической этиологией, в то время как геморрагический инсульт составляет порядка 15 % всех случаев инсульта и приводит к высокой смертности. Основные модели были разработаны еще в XX веке и основаны на прямом введении аутокрови или бактериальной коллагеназы в различные области мозга (James M. L. et al, 2010; MacLellan C. L. et al, 2010; Ren, C. Et al, 2016; Liu H. Et al, 2017). При этом в качестве объектов используются преимущественно крупные животные (приматы, свиньи, кролики), реже лабораторные грызуны (Sansing L. H. Et al, 2011; Marinkovic

I. Et al, 2014; O'Lynnger T. et al, 2019). Одним из недостатков моделей с инъекцией аутокрови является использование антисвертывающего агента, что приводит к дополнительным внутренним повреждениям, и ретроградное проникновение гепаринизированной крови по обратному каналу и в нецелевые области мозга (Косицын Н. С., Макаренко А. Н., Пасикова Н. В. и др., 2002).

Экспериментальное воспроизведение посттравматической геморрагии головного мозга

В соответствии с вышепредставленными данными в работе была применена методика воспроизведения экспериментальной острой интрацеребральной геморрагии по Косицыну Н. С. (2002). Эта методика позволяет воссоздать ограниченное повреждение структур мозга и является максимально достоверной и близкой к человеку моделью. Хирургическую модель воспроизводили на наркотизированных крысах в области внутренней капсулы с введением аутокрови.

Для изучения развития цереброваскулярных нарушений крыс стока Wister конвенциональной категории (n=30) распределяли на группы:

Группа 1 – интактные животные, содержащиеся при равных условиях (n=6);

Группа 2 – ложнооперированные животные (n=8);

Группа 3 – животные с посттравматической геморрагией головного мозга (далее ИПГ) (n=16).

После подготовки животных (пищевая депривация, наркотизация, обработка операционного поля) производили рассечение кожных покровов по саггггитальному гребню в лобной и теменной областях, удаляли надкостницу. У ложнооперированных животных группы 2 производили разрезы кожи длиной 5 мм и просверливали отверстие в черепе. У крыс группы 3 операцию проводили следующим образом: высверливали отверстие в проекции внутренней капсулы на глубину 1,3 –1,6 мм в области правого полушария, прокалывали твердую мозговую оболочку заточенной иглой-канюлей с фиксатором и погружали ее на глубину 4 мм. Травматизацию мозга осуществляли мандрен-ножом вращательными движениями по часовой стрелке (5 – 6 раз) для «конусообразного» подсечения

ткани мозга и повреждения сосудов в области *Capsula interna* с введением 100 мкл аутокрови шприцом через 2 – 3 мин после травматизации. По завершении операции разрез зашивали прерывистым швом трехгранными в сечении иглами. Шов обрабатывали спиртовым раствором бриллиантовой зелени.

Для адекватной оценки развивающихся нарушений проводили ежедневное наблюдение за состоянием животных, начиная с первых суток после операционного вмешательства.

В настоящее время для изучения неврологического статуса крыс применяют бальную шкалу Stroke-index McGrow в различных модификациях, позволяющих выявить (в %) крыс с неврологическими нарушениями, а также степень их выраженности. В эксперименте для изучения неврологического статуса крыс на 2, 4, 7, 10, 13 сут эксперимента была применена шкала *Stroke-index McGrow* в модификации Ганнушкиной И. В. (2013) и в модификации Кульчикова А. Е. (2008). Неврологические симптомы по (Ганнушкина И. В. соавт., 2013) регистрировали в баллах по наличию у крыс легкой неврологической симптоматики – вялость движений, слабость конечностей, наличие тремора, односторонний и двусторонний полуптоза/птоза и тяжелые проявления неврологических нарушений – манежные движения, парезы 1 – 4 конечностей, параличи нижних конечностей, боковое положение. Животные с легкой симптоматикой набирают до 2,5 баллов (вялость, замедленность движений, слабость конечностей, тремор, односторонний или двусторонний полуптоз, манежные движения), с тяжелыми проявлениями неврологических нарушений от 3 до 10 баллов (парезы и/или паралич нижних конечностей, боковое положение, коматозное состояние). В соответствии с Кульчиковым А. Е. (2008) неврологическое тестирование проводили путем оценки позных реакций, рефлекса сгибания, реакции постановки лапы на опору, тестирования в открытом поле и подтягивании на перекладине. При тестировании непроизвольным врожденным поведенческим реакциям присваивают балльную оценку. При значениях от 1 до 5 баллов диагностировали легкую степень поражения головного мозга, от 6 до 9 – среднюю, а от 10 до 20 – тяжелую (Яковлев Р. Ю., 2016; Митрошина Е. В. с соавт., 2017).

Двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение и эмоциональность оценивали в тесте «Открытое поле» типа «бокс» на 0, 2, 3, 6, 7, 10, 11 и 13 сут. В течение 3 мин фиксировали поведенческие акты: горизонтальную и вертикальную двигательную активность, «Норковый рефлекс», груминг, количество актов дефекации (болюсов).

Нарушение моторных функций оценивали в тесте удержания на горизонтальном стержне на 0, 2, 6, 10 и 13 сут эксперимента, неспособность животного подтянуть задние лапы к перекладине регистрировалась как слабость конечностей и проявление неврологического дефицита.

На 15 сут эксперимента крыс выводили из эксперимента с помощью CO_2-камеры и отбирали кровь из правого предсердия на гематологические и биохимические исследования. В образцах крови животных определяли: WBC, LYM, %LIM, MID, %MON, GRA, %GRA, RBC, HGB, HCT, MCV, PLT, PCT, общий белок, альбумин, глюкозу, билирубин (общий, прямой), креатинин, мочевину, АСТ, АЛТ, ЩФ, ГГТ, ЛДГ, ОХС, ТГ.

Для изучения морфологических показателей клеток головной мозг фиксировали и разрезали коронально на 2 мм впереди и 2 мм сзади от плоскости места входа иглы (определяемое на поверхности мозга), готовили срезы фронтальной коры головного мозга толщиной 10 мкр, каждый 10-й срез от рострального до каудального отдела полости остаточной гематомы окрашивали по Нисслю и Ван-Гизону (Лилли Р., 1969). О функциональном состоянии выживших нервных клеток судили на основании изменения площади и периметра ядер и перикариона нейронов, гибели нейронов и глиальных клеток, нейроглиального индекса (Макаренко А.Н. с соавт., 2014). Дегенеративными считали клетки с признаками цитолиза, кариолиза, клеток с гомогенно прокрашенными ацедофильными ядрами, лишенные ядрышек (Беленичев И. Ф. с соавт., 2007).

В процессе проведения эксперимента гибели животных группы 1 (интакт) и группы 2 (ложнооперированные) не отмечено, тогда как в группе 3 (животные с моделью посттравматической геморрагии головного мозга) наблюдалась гибель животных, составившая за весь период эксперимента 43,7 % (Таблица 19). Так, в

течение первых суток после операции погибло 12,5 % крыс, далее отмечены смерти на 5, 10, 12, 13 и 14 сут – до 10 % животных.

Таблица 19. Гибель животных в течение эксперимента

Группа животных	**Период эксперимента, сут**						**За весь период эксперимента**
	1	**5**	**10**	**12**	**13**	**14**	
1 – интакт	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
2 – ЛОЖ	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
3 – ГИ	2/16	1/14	1/13	1/12	1/11	1/10	7/16

Во всех случаях гибель была вызвана массивным кровоизлиянием во внутреннюю капсулу головного мозга: мозг гиперемирован, на поверхности правого полушария мозга под твердой мозговой оболочкой отмечалась субдуральная гематома, занимающая теменную и височную области у всех животных. В саггитальном разрезе обнаруживалось массивное кровоизлияние под твердую мозговую оболочку справа и слева со стороны латеральных и базальных отделов обоих полушарий. У 12,5 % павших животных под твердой мозговой оболочкой выявлен тромб, распространяющийся из зоны моделирования в каудальном направлении в область затылочной доли.

При формировании групп (0 сут) масса тела крыс группы 1 составляла 247,0(227,8 – 261) г. Масса тела крыс групп 2 и 3 достигала 218,0(209,5 –220,8) г и 239,0(229,3 – 255,3) г соответственно и была на 11,7 и 3,2 % ниже, чем у крыс группы 1 ($p<0,01$). Динамика массы интактных крыс группы 1 на протяжении всего эксперимента была положительной: увеличивалась в среднем на 2,5 ± 0,9 г в сут (Рисунок 28). Привес за весь эксперимент составил 13,5 % (285,5(285,0 – 304,8). У животных группы 2 (ЛОЖ) относительно группы 1 отмечено снижение массы тела. Так, масса тела животных группы 2 на 1 сут снизилась на 10,2 % ($p=0,058$) и составила 228,5(211,3 – 235,5) г; на 9 сут масса тела упала на 14,3 % ($p=0,083$) и достигла 237,5(225,3 – 260,3) г; на 13 сут масса тела уменьшилась на 7,4 % ($p=0,054$) и равнялась 262,5(228,0 – 274,5) г.

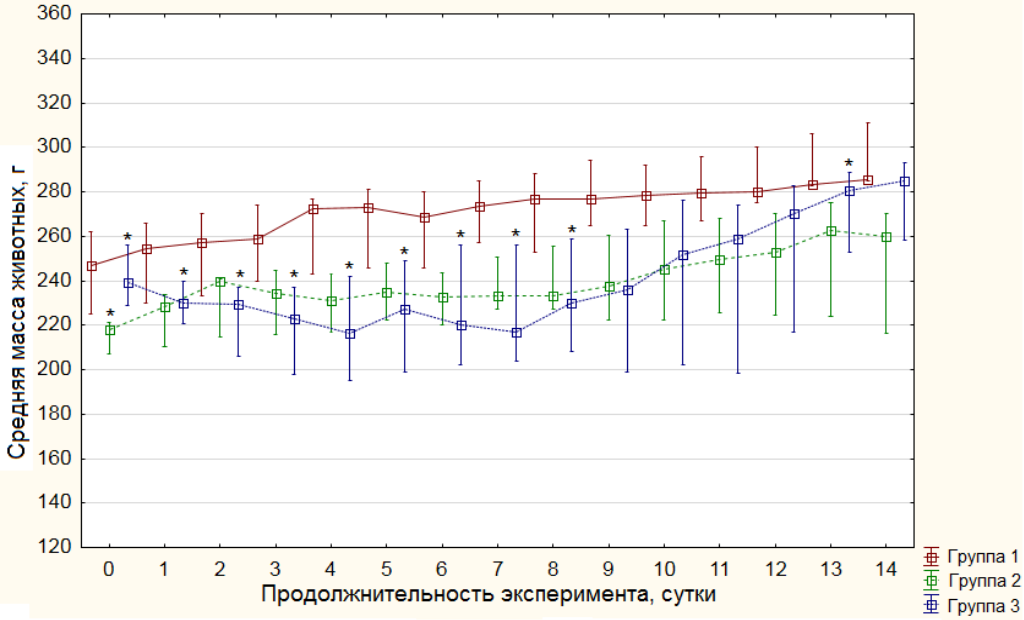


Рисунок 28 – Динамика массы тела экспериментальных крыс (M±m). Условные обозначения: * – группа 3 относительно группы 1 при p<0,05

У крыс группы 3 отмечено снижение массы тела относительно интактных животных группы 1 в период со 2 по 10 сут эксперимента. На 2 и 3 сут эксперимента масса снижалась на 10,7 и 13,9 % (p<0,02), составляя 229,5(209,3 – 236,0) г и 223,0(201,0 – 236,8) г соответственно. Снижение массы на 4 сут достигло 20,5 % (p=0,006), на 5 и 6 сут – 16,9 и 15,5 % (p<0,02). При этом значения составили 216,5(196,8 – 240,3) г, 227,0(199,0 – 249,0) г и 220,0(202,0 – 256,0) г, соответственно. На 7 сут снижение массы достигало 20,7 % (p=0,008), составляя 217,0(204,0 – 256,0) г. На 8 – 10 сут выявлена стабилизация массы: на 8 сут масса тела крыс уменьшалась на 17,0 % (p=0,022), на 9 сут – на 14,8 % (p=0,032), на 10 сут – до 9,5 % (p=0,085). За этот период значения массы составляли 230,0(208,0 – 259,0) г, 236,0(199,0 – 263,0) г и 252(208,8 – 274,0) г соответственно. На 13 сут масса тела крыс группы 3 составляла 285,0(258,0 – 293,0) г и достоверно не отличалась от значений интакта (285,5(285,0 – 304,7) г) и ложнооперированных крыс (260,0(224,7 – 269,0) г).

Анализ результатов оценки неврологического статуса выявил отсутствие проявлений неврологического дефицита у животных группы 1. У животных группы 2 отсутствовали выраженные неврологические нарушения как на 2 сут после

операции, так и при последующем наблюдении (таблица 20), но были зафиксированы вялость, замедленность движений и тремор. Суммарный балл при оценке по шкале McGraw в модификации Ганушкиной И. В. по группе на 2 сут составлял 0,5(0,0 – 0,5), в модификации Кульчикова А. Е. – 2,0(2,0 – 2,0) (Рисунок 29). Неврологический дефицит у животных данной группы характеризовался как легкий и имел тенденцию к регрессу на 4 сут. На 13 сут у 88% крыс проявления неврологического дефицита отсутствовали. У животных группы 3, начиная со 2 сут после операции, наблюдалась разнообразная неврологическая симптоматика, соответствующая дефициту тяжелой степени, с регрессом к 13 сут (Таблица 20).

Суммарный балл на 2 и 13 сут по шкале McGraw в модификации Ганушкиной И. В. по группе составлял 8,5(4,7 – 11,6) и 0,7(0,0 – 7,7), по шкале в модификации Кульчикова А. Е. – 6,0(4,2 – 9,5) и 5,0(4,0 – 6,5) (Рисунок 29) соответственно.

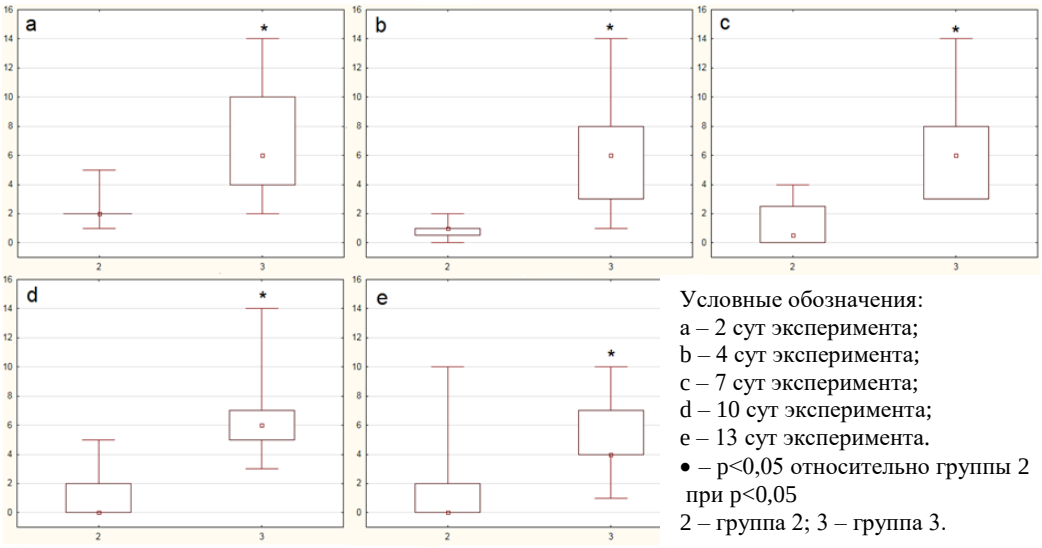


Рисунок 29 – Результаты оценки неврологического дефицита по McGraw в модификации Кульчикова А. Е. Данные представлены в виде диаграммы размаха с границами P25–P75 и отметками минимальных и максимальных значений набора данных.

Таблица 20. Результаты оценки неврологического дефицита по Ганнушкиной И. В. (2013)

Симптомы	Баллы	Период эксперимента, сут									
		2		4		7		10		13	
		2	3	2	3	2	3	2	3	2	3
Вялость, замедленность движений	0,5	62	71	50	64	37	31	25	33	12	40
Тремор	1,0	12	28	12	14	12	15	12	17	12	10
Односторонний полуптоз	1,0	0	50	0	50	0	38	0	33	0	20
Двусторонний полуптоз	1,5	12	0	12	0	12	8	12	8	12	0
Неспособность отдергивать конечность при ее удержании	1,5	0	71	0	71	0	69	0	33	0	20
Односторонний птоз	1,5	0	21	0	36	0	23	0	17	0	10
Двусторонний птоз	1,5	0	28	0	14	0	15	0	8	0	10
Манежные движения	2,0	0	57	0	50	0	38	0	17	0	10
Парез 1 конечности	2,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Парез 2 конечностей	3,0	0	43	0	57	0	46	0	17	0	10
Паралич 1 конечности	3,0	0	28	0	14	0	15	0	8	0	10
Паралич 2 конечностей	4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Коматозное состояние	7,0	0	28	0	14	0	15	0	17	0	10
Летальный исход	10,0	0	12	0	0	0	7	0	8	0	17
Итого по группе	Me	0,5	8,5*	0,2	6,0*	0,0	5,0*	0,0	1,0	0,0	0,7
	P25–P75	0,0–0,5	4,7–11,6	0,0–0,5	1,0–8,5	0,0–0,1	1,0–8,7	0,0–0,0	0,0–9,5	0,0–0,0	0,0–7,7

Примечание: * – относительно группы 2 при $p<0,05$.

Изучение ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «Открытое поле» (таблица 21) у крыс группы 1 показало, что с 7 сут эксперимента наблюдалось постепенное снижение горизонтальной (с 24,0(16,8 – 32,0) до 15,5(12,8 – 19,8) и вертикальной (от 12,0(8,3 – 13,5) до 5,0(2,5 – 6,8) активностей, а также исследовательского поведения (от 11,0(6,8 – 14,5) до 4,0(1,8 – 5,5) и груминга (от 6,0(5,3 – 6,8) до 3,0(3,0 – 3,8), что связано с привыканием животных к экспериментальной установке. Достоверно значимых изменений анализируемых показателей относительно 0 сут для крыс данной группы отмечено не было.

У животных группы 2 по сравнению с группой 1 отмечено значительное снижение горизонтальной активности на 2 и 3 сут эксперимента до 90 % (p=0,064 и p=0,023 соответственно). Относительно 0 сут данный показатель уменьшился на 88,9 и 86,1 % (p<0,001) соответственно. На 7 сут горизонтальная активность крыс группы 2 была соотносима с интактом и результатами теста на 0 сут (p=1,000). Вертикальная двигательная активность относительно интакта снижалась на 2 и 3 сут в 12,0 раз (p=0,063) и в 15,0 раз (p<0,001),и на 7 сут – в 4,8 раза (p=0,014). При этом относительно 0 сут вертикальная активность крыс 2 группы снижалась в 5 раз (p=0,032) на 2 сут. Показано уменьшение числа обследований отверстий на 2 и 3 сут в 3,8 раза (p=0,076) и 9,7 раз (p=0,021). При этом, относительно 0 сут на 3 сут количество случаев обследования отверстий снижалось на 83,3 % (p<0,05).

Таблица 21. Результаты исследования двигательной активности и ориентировочно-исследовательского поведения крыс (Me [P25–P75])

Группа	**Период эксперимента, сут**							
	0	**2**	**3**	**6**	**7**	**10**	**11**	**13**
Горизонтальная активность								
1	45,5 [32,8–55,3]	35,0 [19,3–54,5]	44,0 [32,8–54,5]	20,5 [9,8–50,8]	24,0 [16,8–32,0]	19,0 [8,5–36,3]	12,5 [5,8–17,8]	15,5 12,8–19,8]
2	36,0 [31,3–39,5]	4,0 [2,0–9,3]	5,0 * [2,8–7,0]	9,5 [4,8–23,5]	15,0 [10,3–29,5]	16,5 [12,0–19,5]	16,5 [9,3–26,5]	37,0 11,3–43,3]
3	50,5 [32,3–53,5]	0,5 * [0,0–4,0]	5,5 * [0,0–23,0]	17,0 [6,3 –40,8]	17,0 [6,0–33,0]	24,0 [12,0–54,0]	40,0 * [26,0–43,0]	22,0 10,3–45,3]
Вертикальная активность								
1	11,0 [5,8–12,5]	12,0 [7,0–17,0]	15,0 [10,8–17,8]	12,5 [6,0–21,3]	12,0 [8,3–13,5]	7,5 [5,3–11,3]	6,5 [4,5–7,0]	5,0 [2,5–6,8]
2	5,0 [2,8–9,3]	1,0 [0,8–1,0]	1,0 * [0,8–1,3]	2,5 [1,0–7,0]	2,5 * [1,8–4,0]	3,0 [1,5–6,0]	3,0 [1,0–4,3]	1,0 [0,0–3,3]
3	12,5 [6,3–16,5]	0,0 * [0,0–0,0]	1,0 * [0,0–1,0]	4,0 [1,0 –6,0]	4,0 * [1,0–7,0]	3,0 [1,0–10,0]	5,0 [3,0–11,0]	3,5 [0,8–6,5]
«Норковый» рефлекс								
1	11,0 [8,8–12,5]	13,5 [12,3–17,0]	14,5 [13,3–15,8]	7,0 [5,0–12,8]	11,0 [6,8–14,5]	6,5 [4,0–11,3]	5,0 [4,3–5,0]	4,0 [1,8–5,5]
2	9,5 [7,5–11,3]	3,5 [1,0–5,5]	1,5 * [1,0–2,3]	3,0 [1,8–6,0]	2,5 [1,0–6,8]	3,0 [0,8-4,3]	2,5 [0,0–4,3]	4,5 [0,8–9,0]
3	10,0 [8,5–18,0]	0,0 * [0,0–2,0]	0,0 * [0,0–2,0]	4,0 [1,3 –6,8]	3,0 * [1,0–7,0]	4,0 [1,0–7,0]	3,0 [1,0–6,0]	3,0 [0,8–6,0]
Груминг								
1	5,0 [3,3–6,0]	11,0 [6,5–12,5]	6,5 [6,0–7,0]	5,0 [2,5–6,8]	6,0 [5,3–6,8]	6,5 [4,5–7,8]	3,5 [3,0–4,0]	3,0 [3,0–3,8]
2	4,0 [3,0–5,0]	0,0 * [0,0–1,0]	0,5 * [0,0–1,0]	4,0 [2,8–4,3]	4,0 [3,0–4,3]	3,5 [1,8-5,5]	3,5 [1,8–5,3]	2,0 [0,0–4,0]
3	4,0 [2,0–4,8]	0,5 * [0,0–4,8]	1,0 * [0,0–4,0]	4,0 [0,0 –5,8]	4,0 [2,0–5,0]	1,0 [0,0–8,0]	1,0 [1,0–9,0]	3,0 [0,8–4,3]]

Примечание: * – p<0,05 относительно группы 1.

Груминг у 62,5 % крыс группы 2 отсутствовал на 2 сут, на 3 сут – у 50% животных и, в целом, снижался в 13,0 раза относительно интакта (p=0,021), и на 87,5% относительно 0 сут (p=0,025) показатель достиг значений интакта на 6 сут.

У животных группы 3 при сравнении с группой 1 отмечено статистически значимое снижение горизонтальной активности на 2 сут на 98,5 % (p=0,002) и 3 сут на 87,5 % (p=0,019). Относительно 0 сут активность уменьшилась до 10 раз (p<0,001). С 6 по 10 сут горизонтальная двигательная активность крыс была соотносима с показателями группы 1 (p=1,000), тогда как на 11 сут зарегистрировано резкое увеличение активности животных в 3,0 раза (p=0,022). На 2 сут эксперимента у животных не было зарегистрировано вертикальной активности (p<0,001 относительно интакта и 0 сут). При дальнейшем наблюдении на 3, 6 и 7 сут вертикальная активность крыс была по-прежнему значительно снижена относительно интакта (в 12,0 раза (p<0,001); в 4,2 раза (p=0,072); в 3,0 раза (p=0,022) соответственно) (Таблица 21).

Количество обследованных норок на 2 и 3 сут было значительно меньше, чем в группе 1 (p<0,001). Данный показатель был снижен относительно интакта на протяжении последующего наблюдения: на 6 сут – в 1,75 раза (p=0,170); на 7 сут – в 3,7 раза (p=0,053). К 14 сут исследовательская активность была сравнима с интактной группой. Груминг отсутствовал у 50,0 % крыс на 2 сут. У 21,4 % животных был отмечен сверхинтенсивный груминг. Суммарно показатель уменьшался в 22,0 раза (p<0,001) относительно интакта. На 3 сут данный показатель относительно интакта в среднем по группе был снижен в 6,5 раза (p<0,001), при этом у 21,4 % животных сохранялся сверхинтенсивный груминг. На 10 и 11 сут сверхинтенсивный груминг был отмечен у 38,0 % крыс (Таблица 21). Достоверных изменений относительно 0 сут у животных группы 3 зафиксировано не было. Между группами 2 и 3 достоверных отличий в показателях горизонтальной двигательной активности также не было зарегистрировано. Количество актов дефекации у животных всех групп достоверно не отличалось. Время удерживания на перекладине на 0 сут эксперимента составляло для животных группы 1 29,5(14,5 – 40,0) с, для группы 2 – 30,5(25,2 – 39,2) с, для

группы 3 – 31,5(13,2 – 47,7) с и достоверно не отличалось. На 2 сут у животных группы 2 время удерживания составило 15,0(10,0 – 20,0) с и было снижено относительно 0 сут в 2,0 раза (p=0,455). Также на 2 сут у 50% крыс группы 3 зарегистрировано нарушение моторных функций: время удерживания составило 2,0(0,0 – 6,7) с и было снижено относительно 0 сут в 15,7 раза (p<0,001), относительно группы 1 в 10,2 раза (p=0,011) и относительно группы 2 – в 7,5 раза (p=0,027). На 6 сут у 35,7% животных отмечалась слабость конечностей: время удерживания относительно 2 сут увеличивалось в 6,7 раза (p=0,023) и составляло 13,5(4,7 – 50,5) с, что достоверно не отличалось от значений крыс групп 1 и 2. На 10 сут у 33,3% крыс выявлены нарушения моторных функций: крысы висели на перекладине 8,0(6,0 – 30,0) с, что было меньше значений, чем у животных групп 1 и 2 в 3,9 раза (p=0,406 и p=0,198). На 13 сут моторные нарушения отмечались у 30,0 % животных: время удерживания составило 8,5(5,0 – 15,5) с, что было ниже значений животных группы 2 в 3,1 раза (p=0,013).

Гематологические параметры крови (Таблица 22) животных группы 1 находились в пределах физиологической нормы и соответствовали показателям здоровых крыс Wistar данного пола и возраста. У крыс группы 2 относительно группы 1 выявлено снижение содержания WBC на 18,9 % (p=0,793), в т.ч. снижение %LIM на 7,8% (p=0,362) и MID на 62,5% (p=0,386) на фоне увеличения %GRA в 2,3 раза (p=0,226).

У крыс группы 3 относительно интакта отмечено увеличение MID в 1,89 раза (p=0,002), %MON в 1,4 раза (p=0,340) и GRA в 2,6 раза (p=0,126) при снижении %LIM на 13,6 % (p=0,089), MCV на 4,0 % (p=0,191); относительно группы 2 отмечено увеличение %MON в 3,77 раза (p<0,001), GRA на 11,0 % (p=0,226) и MCV на 6,1 % (p=0,011).

Таблица 22. Результаты гематологического анализа крови крыс с ИПГ (Me [P25–P75])

Показатель	Группа 1 (интакт)	Группа 2 (ЛОЖ)	Группа 3 (ИПГ)
WBC, 10^9/l	7,45 [6,16 – 9,70]	6,04 [5,22 – 7,50]	7,90 [5,72 – 8,25]
LYM, 10^9/l	7,00 [5,54 – 8,22]	5,01 [4,47 – 6,03]	6,02 [5,22 – 6,44]
LYM, %	91,25 [87,95 – 92,85]	84,10 [77,95 – 87,78]	78,80 [74,40 – 86,35]
MID, 10^9/l	0,09 [0,08 – 0,13]	0,04 [0,03 – 0,05]	0,17 # [0,15 – 0,31]
MON, %	1,60 [0,90 – 2,00]	0,60 [0,60 – 0,70]	2,25 # [1,93 – 3,98]
GRAN, 10^9/l	0,57 [0,33 – 1,03]	0,95 [0,76 – 1,17]	1,19 [0,56 – 1,86]
GRAN, %	6,55 [5,55 – 10,55]	15,30 [10,30 – 21,90]	17,00 [8,53 – 23,83]
RBC, 10^{12}/l	7,69 [7,65 – 8,17]	7,82 [7,67– 8,00]	7,43 [7,25 – 8,00]
HGB, g/l	130,50 [125,50 – 136,50]	129,50 [127,25 – 144,25]	131,00 [127,25 – 137,75]
HCT, %	39,79 [38,16 – 41,15]	39,16 [38,11 – 39,61]	39,08 [38,32 – 39,95]
MCV, mkm^3	50,00 [49,00 – 51,00]	49,00 [48,75 – 50,25]	52,00 # [51,00-52,00]
PLT, 10^9/l	733,50 [709,00 – 809,50]	751,50 [660,75 – 826,00]	759,00 [719,00 – 829,25]
PCT, %	0,51 [0,47 – 0,56]	0,48 [0,43 – 0,54]	0,50 [0,48 – 0,55]

Примечание: # – $p<0,05$ относительно группы 2.

Биохимические параметры сыворотки крови (Таблица 23) крыс группы 1 находились в пределах физиологической нормы и соответствовали показателям здоровых крыс Wistar данного пола и возраста.

У крыс группы 2 относительно группы 1 отмечено увеличение содержания глюкозы на 34,7 % ($p=0,027$), креатинина на 22,2 % ($p=0,027$) и активности ГГТ на 23,4 % ($p=0,114$). У животных группы 3 относительно интакта отмечено уменьшение содержания альбумина на 8 % ($p=0,005$), креатинина на 15,6 % ($p=0,159$) при увеличении содержания глюкозы на 66,4 % ($p=0,029$) и холестерина на 17,8 % ($p=0,044$). Активность АЛТ в группе 3 уменьшилась на 44,2 % ($p=0,014$), а в группе 2 – на 45,1 % ($p=0,007$).

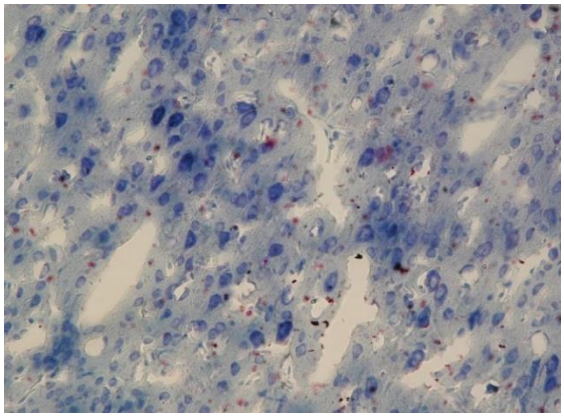
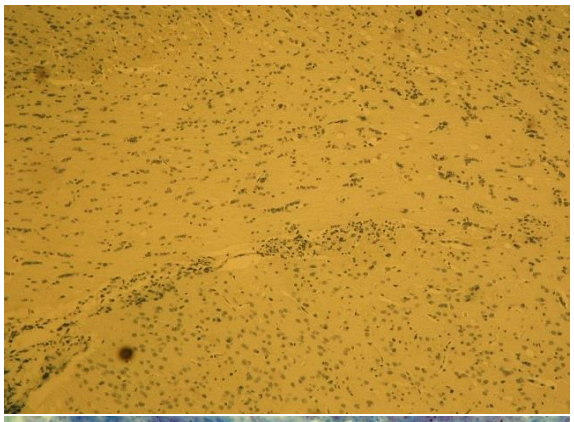
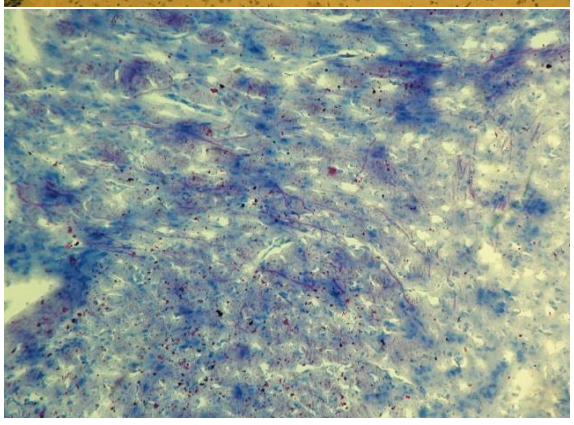
Таблица 23. Результаты биохимического анализа сыворотки крови крыс с ИПГ (Me [P25–P75])

Показатель	Группа 1 (интакт)	Группа 2 (ЛОЖ)	Группа 3 (ИПГ)
Общий белок, г/л	65,30 [64,65 – 66,90]	63,15 [62,20 – 65,25]	68,10 [66,30 – 68,75]
Альбумин, г/л	45,20 [43,70 – 45,60]	43,25 [42,38 – 43,95]	41,60 * [41,40 – 41,85]
Глюкоза, ммоль/л	10,80 [9,10 – 13,58]	16,55 * [16,00 – 17,60]	17,97 # [14,05 – 19,3]
Билирубин общий, мкмоль/л	3,20 [2,90 – 3,40]	3,28 [3,15 – 4,25]	3,50 [3,10 – 3,80]
Билирубин прямой, мкмоль/л	1,80 [1,65 – 1,90]	1,75 [1,68 – 1,95]	1,90 [1,85 – 2,15]
Кретинин, мкмоль/л	54,50 [51,75 – 56,50]	42,38 * [42,00 – 47,33]	46,00 [44,75 – 48,25]
Мочевина, ммоль/л	6,15 [5,62 – 6,57]	6,60 [5,53 – 7,56]	6,07 [5,91 – 6,64]
АСТ, Е/л	132,65 [130,17 – 133,97]	128,34 [117,39 – 149,97]	136,20 [115,24 – 143,12]
АЛТ, Е/л	31,00 [26,50 – 34,00]	31,50 [28,00 – 33,18]	17,30 *,# [16,00 – 25,00]
Щелочная фосфатаза, Е/л	175,50 [158,40 – 199,50]	146,05 [131,05 – 173,55]	166,90 [154,85 – 177,40]
ГГТ, Е/л	2,65 [2,52 – 2,84]	2,03 [1,87 – 2,26]	2,43 [2,23 – 2,70]
ЛДГ, Е/л	404,56 [383,39 – 461,42]	521,34 [456,84 – 624,32]	556,00 [328,13 – 595,01]
Холестерин, ммоль/л	1,57 [1,47 – 1,67]	1,79 [1,71 – 1,92]	1,85 [1,70 – 2.21]
Триглицериды, ммоль/л	1,20 [0,85 – 1,55]	1,25 [1,08 – 1,41]	1,40 [1,34 – 1,55]

Примечание: * – $p<0,05$ относительно группы 1;
– $p<0,05$ относительно группы 2.

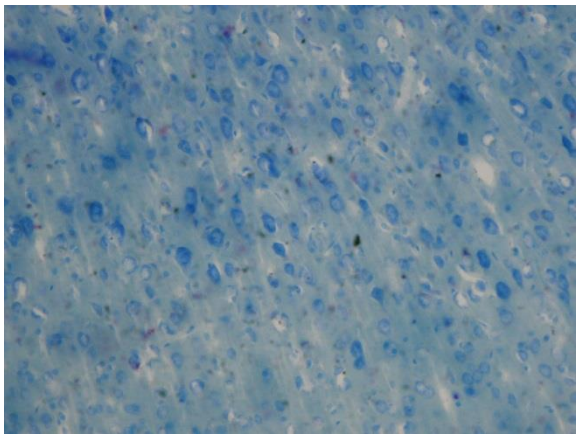
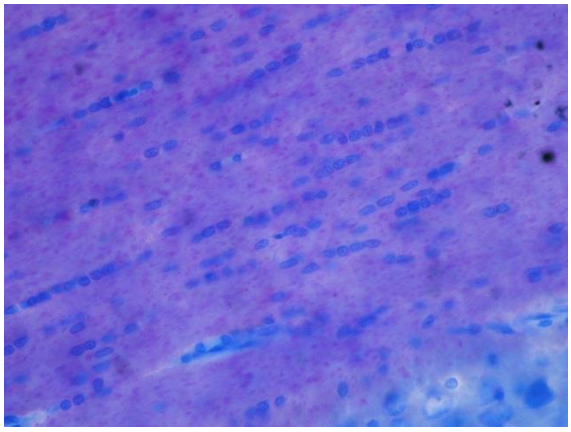
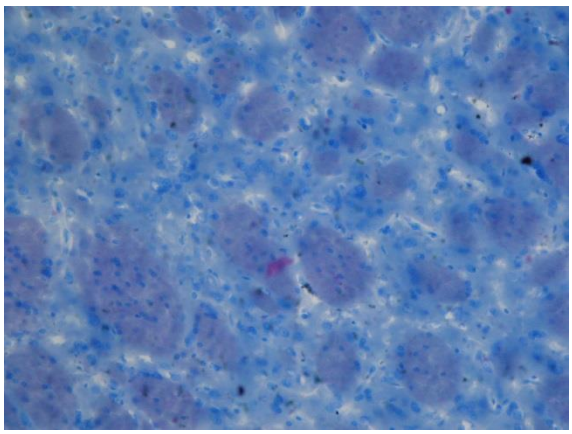
Результаты гистологического исследования цитоархитектоники неокортекса (*Sensorimotor cortex*), *Corpus callosum* и *Capsula interna* головного мозга крыс и патофизиологические изменения представлены в Таблице 24.

Таблица 24. Гистологическая структура головного мозга интактных крыс группы 1. Окраска по Нисслю и Ван-Гизону (Об. 20/40, ок. 10).

Sensorimotor cortex(200x)		Пирамидальные нейроны: форма не изменена, ядра крупные в центре клетки, преимущественно с одним ядрышком; тигроид равномерно расположен вокруг ядра; *редко встречались*: нейроны с диспертированным тигроидом в виде глыбок со слабым прокрашиванием тигроида и ядер; признаки периваскулярного отека вокруг кровеносных сосудов; гиперхромные нейроны со сморщенными перикарионами и слабо выраженным перицеллюлярным отеком. Глиоциты: ядра обычной формы, светлые.
Corpus callosum (100x)		Глиальные клетки: расположены группами вдоль основного направления нервных волокон, ядра нормальной формы без патологических изменений, в ядрах единичные ядрышки; *редко встречались:* отдельные кровеносные сосуды с проявлениями периваскулярного отека. Доминирующее количество нервных волокон базофильно окрашено.
Capsula interna (200x)		Глиальные клетки: диффузно расположены среди пучков нервных волокон; *редко встречались:* ацидофильно прокрашенные нервные волокна; локальные периваскулярные отеки.

Неокортекс головного мозга ложнооперированных крыс группы 2 харктеризовался незначительным увеличением периваскулярного пространства, спазмом отдельных сосудов, перицеллюлярным отеком вокруг глиоцитов. *Corpus callosum:* белое вещество окрашено ацидофильно; *Capsula interna:* отдельные волокна окрашены ацидофильно (Таблица 25).

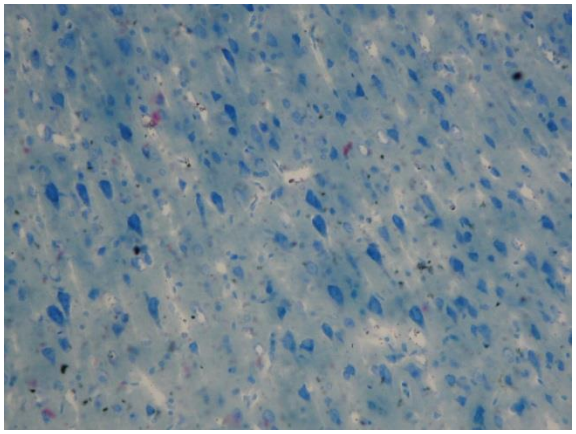
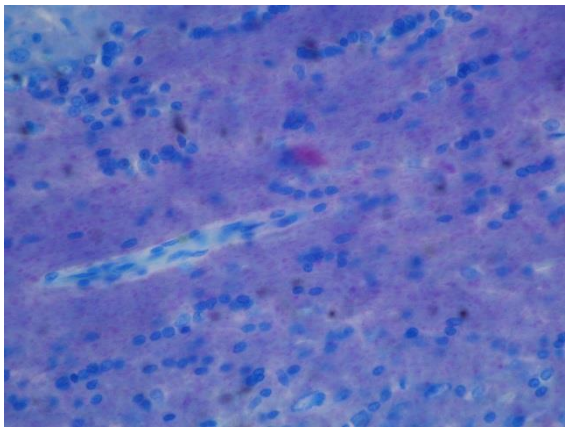
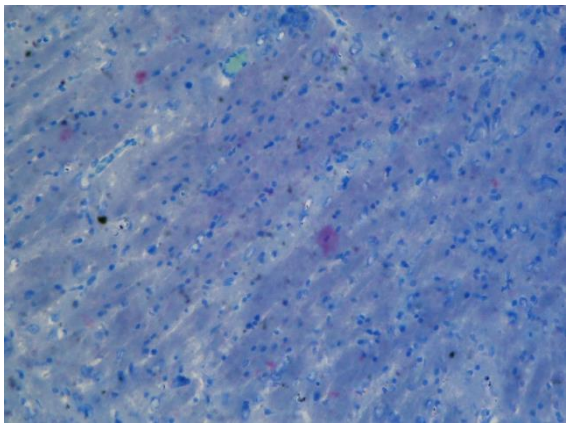
Таблица 25. Гистологическая структура головного мозга ложнооперированных крыс группы 2. Окраска по Нисслю (Об. 20/40, ок. 10).

Sensorimotor cortex(200x)		Пирамидальные нейроны: не изменены; *редко встречались*: нейроны с диспертированным тигроидом в виде глыбок, со слабым прокрашиванием тигроида и ядер; признаки периваскулярного отека вокруг отдельных кровеносных сосудов. Глиоциты: ядра обычной формы, светлые, вокруг глиальных клеток - перицеллюлярный отек. Незначительное увеличение периваскулярного пространства; спазм отдельных сосудов
Corpus callosum (400x)		Глиальные клетки: расположены строго ориентированными последовательностями вдоль групп нервных волокон, ядра нормальной формы без патологических изменений, в ядрах единичные ядрышки. Нервные волокна ацидофильно окрашены. Некоторые кровеносные сосуды с проявлениями периваскулярного отека.
Capsula interna (200x)		Глиальные клетки: расположены диффузно, ядра нормальной формы без патологических изменений, в ядрах единичные ядрышки. Большая часть нервных волокон окрашены базофильно, отдельные волокна – ацидофильно.

Анализ гистологического исследования срезов головного мозга крыс группы 3 выявил полиморфный характер структурных изменений в неокортексе, *Corpus callosum* и *Capsula interna* ипсилатерального полушария: большинство нейронов в состоянии острого отека и набухания тел и ядер; много погибших нейронов и глиоцитов с признаками аутолиза, острый перицеллюлярный и периваскулярный

отек; ядра глиальных клеток характеризовались пикнозом и гиперхроматозом (Таблица 26).

Таблица 26. Гистологическая структура головного мозга опытных крыс группы 3. Окраска по Нисслю (Об. 20/40, ок. 10).

Sensorimotor cortex(200x)		Пирамидальные нейроны: в состоянии острого отека и набухания тел и их ядер, ядра деформированы, с признаками деструкции; группы погибших нейронов с признаками аутолиза; острый перицеллюлярный отек, особенно в области апикальных дендритов; периваскулярные отеки. Глиоциты: множество погибших клеток, диффузно расположенных в коре; гиперхроматоз и пикноз ядер; перицеллюлярный отек вокруг отдельных клеток.
Corpus callosum (400x)		Глиальные клетки: расположены хаотично; часто – небольшими группами; ядра глиальных клеток имеют небольшие размеры с гиперхромным прокрашиванием; Нервные волокна ацидофильно окрашены. Некоторые кровеносные сосуды с проявлениями периваскулярного отека.
Capsula interna (200x)		Глиальные клетки: ориентированы небольшими группами, ядра нормальной формы, в ядрах единичные ядрышки; перицеллюлярный и периваскулярный отек. Большая часть нервных волокон окрашены базофильно, отдельные волокна – ацидофильно.

У животных группы 2 процентное соотношение живых/погибших нейронов увеличивалось как в ипсилатеральном, так и в контралатеральном полушарии в 27 раз относительно интакта. При этом соотношение живых/погибших глиоцитов увеличивалось в 2,45 раза в ипсилатеральном и в 2,12 раза в контралатеральном

полушариях (p<0,05). У крыс группы 3 отмечено более значительное увеличение оцениваемых показателей в ипсилатеральном и контралатеральном полушариях: соотношение живых/погибших нейронов увеличивалось в 43,2 раза и в 39,1 раз относительно интакта (p<0,05) и в 1,7 раза и в 1,5 раза относительно ложнооперированных животных (p<0,05); процентное соотношение живых/погибших глиальных клеток увеличивалось в 2,3 раза и в 2,8 раза относительно интакта (p<0,05) (Таблица 27).

Таблица 27. Количество нейронов и глиальных клеток V шара неокортекса фронтальной области полушарий (тест зона 270 × 250 мкм^2)

А. Количество нейронов			
Группа	**Живые клетки**	**Погибшие клетки**	**%**
1	25,00±1,41	0,25±0,05	1,04±0,54
Ипсилатеральное полушарие			
2	12,00±0,81	7,25±0,62	27,10±9,18 *
3	9,00±1,91	13,25±1,25	44,93±15,5 *#
Контралатеральное полушарие			
2	12,00±0,40	7,00±0,40	27,15±8,97 *
3	9,75±1,31	10,25±0,25	40,62±13,77 *#
Б. Количество глиальных клеток			
1	20,25±1,98	1,00±2,37	5,86±2,85
Ипсилатеральное полушарие			
2	14,50±0,90	5,12±0,58	14,35±5,8 *
3	27,25±1,63	9,37±0,59	13,44±5,19
Контралатеральное полушарие			
2	16,5±1,16	4,5±0,73	12,42±5,24 *
3	22,5±1,96	6,87±0,63	16,25±6,17 *

Примечание: * – p<0,05 по отношению к группе 1;
– p<0,05 по отношению к группе 2.

При анализе морфометрических показателей выявлено, что площадь пирамидных нейронов и их ядер у животных группы 2 увеличивалась относительно интакта в 2,1 раза и в 2,4 раза для ипсилатерального полушария и в 1,5 раза и в 1,9 раза для контралатерального полушария (p<0,05). У крыс группы 3 относительно группы 1 площадь пирамидных нейронов и их ядер увеличивалась относительно интакта в 3,1 раза и в 4,0 раза для ипсилатерального полушария и в 2,8 раз и в 2,9 раз для контралатерального полушария (p<0,05).

Относительно группы 2 также выявлено достоверное увеличение площади пирамидных нейронов и их ядер в 1,5 раза и 1,7 раза для ипсилатерального полушария и в 1,9 раза и в 1,5 раза для контралатерального полушария ($p<0,05$) (Таблица 28).

Таблица 28. Изменение морфометрических показателей нейронов V шара неокортекса фронтальной области полушарий.

Группа	**Ипсилатеральное полушарие**		**Контралатеральное полушарие**	
	Площадь клетки	**Площадь ядра**	**Площадь клетки**	**Площадь ядра**
1	146,60±11,79	58,72±2,73	146,60±11,79	58,72±2,73
2	301,31±16,57 *	139,39±6,33 *	217,45±15,62 *	111,53±6,23 *
3	447,46±34,36 *#	237,49±16,49 *#	418,85±29,16 *#	171,96±10,76 *#

Примечание: * – $p<0,05$ по отношению к группе 1.

Нейроглиальный индекс V слоя неокортекса у интактных и ложнооперированных животных в среднем составлял 0,82 ± 0,22 и 0,84 ± 0,06 ед., тогда как у животных группы 3 для ипсилатерального полушария составил 0,92 ± 0,05 ед., для контралатерального полушария – 0,96 ± 0,03 ед.

Таким образом, воспроизведенная модель посттравматической геморрагии головного мозга характеризуется средней летальностью (общая летальность модели достигла 43,7 %, критические сутки: 1, 5, 12 – 14); острым функциональным дефицитом, сохраняющимся не менее 14 сут и проявляющимся выраженным отеком, гибелью нейронов, резко выраженным глиозом и пролиферацией глиальных клеток вследствие развития локального воспалительного процесса. У выживших животных на протяжении всего периода эксперимента наблюдались разнообразные проявления неврологического дефицита. На 2 сут после операции коматозное состояние регистрировалось у 28 % животных. У остальных животных выявлены параличи и парезы контралатеральных конечностей, слабость и нечувствительность конечностей, манежные движения по часовой стрелке, одно- и двусторонний птоз и экзофтальм. Выраженные нарушения моторных функций, проявляющиеся в неспособности удержаться на горизонтальном стержне сохранялись вплоть до 13 сут у 30% крыс. На 2 и 3 сут после операции резко

снижалась горизонтальная и вертикальная активность. Исследовательское поведение отсутствовало вплоть до 7 сут. Важно отметить, что увеличение горизонтальной активности с 6 по 11 сут обусловлено манежными движениями крыс и является мнимым. При наблюдениях отмечены случаи проявления как сверхинтенсивного груминга (на 2 и 11 сут у 21 и 38% крыс соответственно), так и его отсутствие (у 50 и у 30% животных соответственно). Нарушения сохранялись вплоть до завершения исследования: 10 % крыс оставались в тяжелом состоянии, у 50 % животных отмечена средняя степень неврологического дефицита, а у 40 % животных – легкая симптоматика неврологических проявлений.

Воспалительные процессы в мозге приводили к смещению лейкоцитарной формулы в сторону увеличения относительного содержания гранулоцитов и смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток при уменьшении относительного содержания лимфоцитов. Помимо этого, отмечено увеличение среднего объема эритоцитов, что может быть отсроченным ответом на острую гематому при моделировании инсульта. Развитие отека в очаге повреждения приводило к уменьшению содержания альбумина в сыворотке крови. Снижение креатинина и активности АЛТ обусловлено гиподинамией животных. Увеличение содержания глюкозы и холестерина подтверждает валидность модели и связано с механизмом компенсации возросших метаболических потребностей организма в целом, особенно мозга. Постинсультная потеря массы тела крыс увеличивалась вплоть до 10 сут после моделирования и к концу эксперимента соответствовала массе интактных животных. Снижение массы тела связано с развитием острого нарушения мозгового кровообращения и отеком мозга, что влияет на пищевое поведение животных вследствие сдавливания переднего гипоталамуса. В связи с чем, масса тела является косвенным показателем геморрагического повреждения головного мозга, что также подтверждается другими исследованиями (Rogers D.C. et al, 1997).

Стоит отметить необходимость введения в эксперимент группы ложнооперированных животных, которым была сделана идентичная трепанация черепа без повреждения мозговых структур. Случаи гибели крыс не были

зафиксированы. Потеря массы в 1 сут после операции вызвана последствиями наркоза и трепанации черепа, которая также привела к появлению симптомов легкого неврологического дефицита на 2 и 3 сут. После трепанации вертикальная и горизонтальная активность, исследовательское поведение и груминг крыс, а также время удержания на горизонтальной перекладине были значительно снижены. На 14 сут у 12,5 % крыс отмечались вялость движений, тремор, слабость конечностей и полуптоз, а также снижение массы. У остальных животных все анализируемые показатели соответствовали значениям интактных животных. Гистологические исследования мозга ложнооперированных крыс показали отсутствие патологических изменений в сосудах, нейронах и глии. Однако выявленные при анализе крови незначительные изменения в лейкоцитарной формуле (снижение относительного содержания лимфоцитов, смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток на фоне увеличения относительного содержания гранулоцитов) и увеличение содержания глюкозы, креатинина и активности ГГТ свидетельствуют о развитии воспалительных процессов в месте повреждения.

Суммируя вышеперечисленное можно заключить, что данная модель посттравматической геморрагии головного мозга в достаточно полной мере отображает наблюдаемую в клинике ситуацию и воспроизводит основные диагностические критерии острых нарушений мозгового кровообращения. Следовательно, она может быть использована при изучении путей диетокоррекции острых нарушений мозгового кровообращения СМП и биоактивных веществ, с учетом следующих основных методик и показателей: WBC, %LIM, %GRA, MID, RBC, HGB, HCT, MCV, PLT, PCT; общий белок, альбумин, глюкоза, креатинин, АсАт, АлАт, ОХС; нейроглиальный индекс.

Экспериментальное воспроизведение травмы спинного мозга

Модель левосторонней гемисекции спинного мозга воспроизводили по Цымбалюк В. И. с соавт. (2010) хирургически путем гемисекции в нижнегрудных отделах спинного мозга (Т10-Т11) наркотизированных крыс стока Wister конвенциональной категории.

Для изучения развития нарушений после гемисекции спинного мозга крыс конвенциональной категории (n=24) распределяли на группы:

Группа 1 – интактные животные, содержащиеся при равных условиях (n=7);

Группа 2 – ложнооперированные животные (n=7);

Группа 3 – животные с травмой спинного мозга (далее ТСП) (n=10).

После подготовки животных (пищевая депривация, наркотизация, обработка операционного поля) производили рассечение кожи по линии, соединяющей остистые отростки позвонков Т8-L2 и скелетировали остистые отростки Т9-L1. После чего выполняли ламинэктомию на уровне Т10-Т11, сохраняя суставные отростки, а также осуществляли сквозной прокол ткани спинного мозга у левого края заднего срединного артериального сосуда офтальмологическим скальпелем. После завершения оперативной манипуляции животным выполняли сечение левой стороны спинного мозга: в участок сечения вводили одну браншу офтальмологических ножниц так, чтобы во время их раскрытия в промежуток между браншами попала ткань левой половины поперечника спинного мозга на уровне Т11 и делали полное пересечение левой стороны спинного мозга. По завершении операции разрез зашивали прерывистым швом трехгранными в сечении иглами и обрабатывали шов спиртовым раствором бриллиантовой зелени.

Функционально значимое восстановление спинного мозга оценивали по шкале BBB (Barros Filho T. E, Molina A. E., 2008) ежемесячно в течение 4 мес. В конце этого периода проводили гистологические, морфометрические, ультраструктурные исследования.

Анализ показателей шкалы функционального восстановления спинного мозга (BBB) выявил, что через 1 мес. после травмы функциональные показатели соответствовали 4,5 ± 0,4 баллам, через 2 мес. – 6,2 ± 0,4 баллам, через 3 мес. – 8,7

± 1,1 и через 4 мес. – 10,9 ± 0,8 (более чем в 2 раза относительно 1 мес., но менее физиологической нормы (21,0 балл) на 48,7 % ($p<0,05$). Эти данные свидетельствуют о частичном восстановлении функции спинного мозга в течение 4 мес. после травматического повреждения. Аналогичные результаты исследования были получены и другими авторами, изучающими восстановление после гемисекции и полного пересечения спинного мозга, согласно которым регенерация может достигать до 6 – 10 баллов (Miranda T. A. et al, 2012; Luo J. et al, 2009; Chen G. et al, 2013).

Общая картина патогистологических изменений в области травмы и смежных сегментов спинного мозга после повреждения представлена на Рисунке 30. Нервные волокна с ипсилатеральной стороны спинного мозга были расположены неупорядоченно, отмечены поперечно ориентированные и рекурентные волокна, активация глиальных клеток в виде пролиферации и заполнения зоны травмы глиальным рубцом. У 20 % животных отмечена дислокация серого и белого вещества спинного мозга. Зона повреждения у всех оперированных крыс имела четкие контуры и имела сформированный вид единого организованного очага. На контралатеральной стороне спинного мозга животных также выявлялись нарушения структурной упорядоченности и системной организации нервных волокон и нейронов. В зонах фиброза и глиального рубца вокруг места гемисекции наблюдалось увеличение плотности кровеносных сосудов и коллагеногенеза. В смежных к травме участках спинного мозга наблюдали гибель нейронов и уменьшение плотности нервных волокон, продукты распада нервных волокон (овоиды, т.е. дериваты дегенерированных нервных волокон).

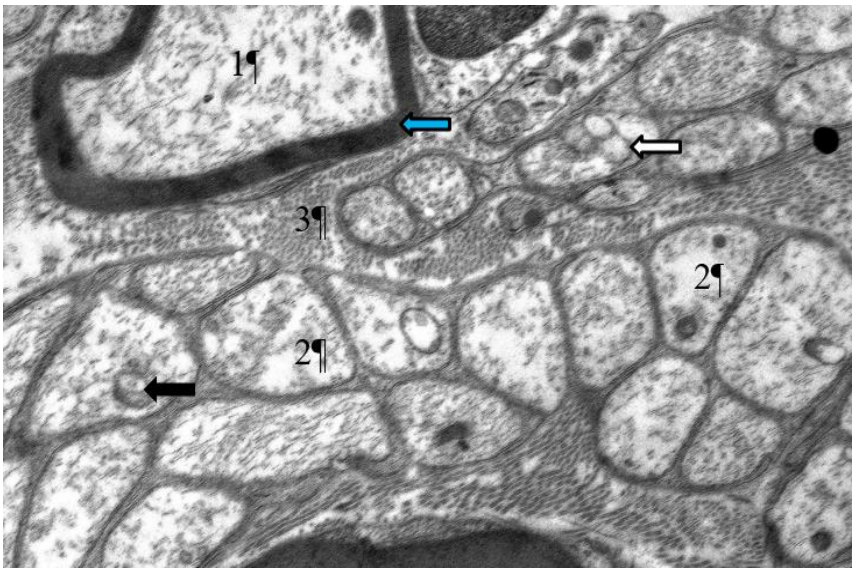
Рисунок 30 – Микрофотография спинного мозга крыс через 4 мес. после гемисекции (импрегнация серебром): А) зона травмы (об. 10, ок. 10): деструкция ткани мозга, глиальная организация; структурная организация ипсилатеральных (В) и контралатеральных (С) передних рогов спинного мозга (Т10-Т11) (об. 20, ок. 10); В) дезорганизация нервных волокон; С) неповрежденные нейроны и нейриты, уменьшение плотности нервных волокон

Плотность нервных волокон в ипсилатеральных поврежденных участках боковых трактов спинного мозга оперированных крыс составила 5909,3 ± 637,8 шт/мм^2, снижаясь против 13428,0 ± 1075,3 шт/мм^2 интакта на 56,2 % ($p<0,05$) и против 13151,0 ± 683,7 шт/мм^2 ложнооперированных на 54,8 % ($p<0,05$). В зоне травмы плотность нервных волокон составляла 2961,4 ± 452,6 шт/мм^2, т.е. снижалась на 78,0 % ($p<0,05$) относительно интакта. Одновременно установлены изменения пространственной и количественной организации мотонейронов нейронов передних рогов спинного мозга: выявлен некроз нейронов не только в зоне травмы, но и в смежных сегментах. Средняя площадь нейронов составляла в ипсилатеральных рогах 258,5 ± 20,9 мкм^2, а в контралатеральных – 318,9 ± 32,5 мкм^2, снижаясь против 461,2 ±2 8,3 мкм^2 интакта на 44,0 % и 30,9 % ($p<0,05$) и против 324,0±35,3 мкм^2 ложнооперированных на 20,2 % ($p<0,05$) и 1,5 % ($p>0,05$). Нейроны имели классическую морфологическую организацию: в ядре

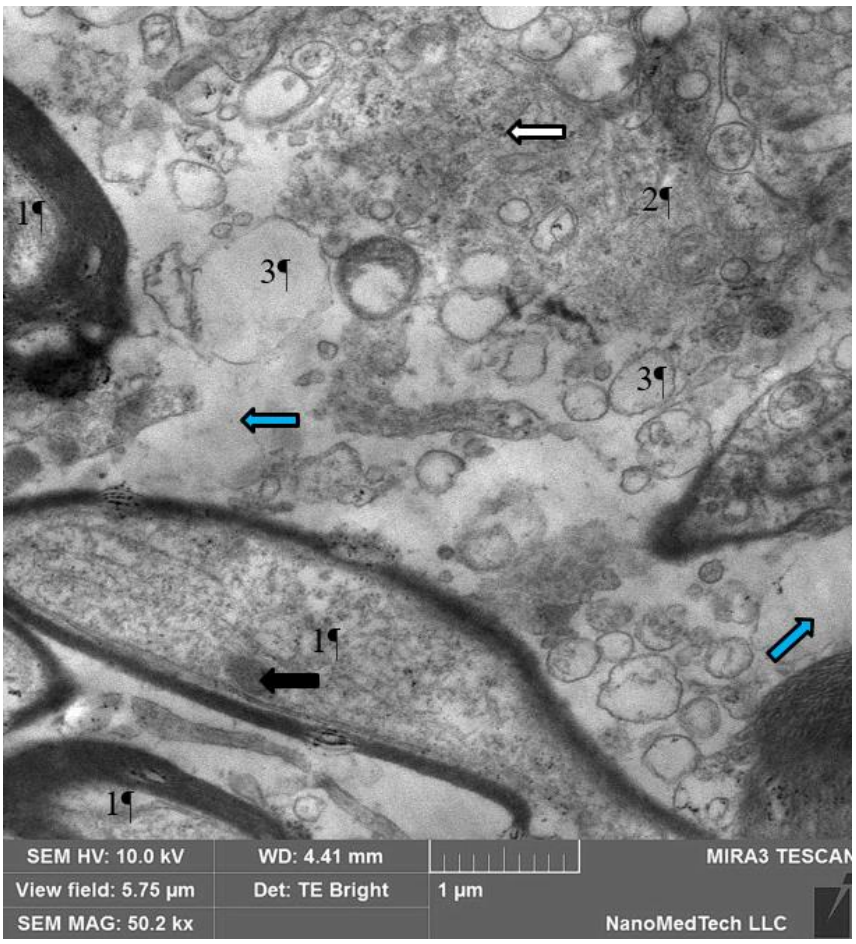
визуализировали ядрышки, нейроны имели аксоны и множественные дендриты, т.е. через 4 мес. после травмы прогрессирующих деструктивных процессов не выявлялось.

При изучении ультраструктуры белого вещества спинного мозга интактных животных наблюдалось следующее: белое вещество спинного мозга представлено канатиками кластеров миелиновых и безмиелиновых нервных волокон и стромальных элементов (системы микрососудов); миелиновые нервные волокна характеризовались интактной миелиновой оболочкой и осевым цилиндром, в котором регистрировались элементы цитоскелета, отдельные везикулы и митохондрии с кристами. Безмиелиновые нервные волокна организованы в виде отдельных кластеров, окруженные отростками глиальных клеток (рисунок 31, А); отека и отслоения отростков от осевых цилиндров не отмечено. Вокруг нервных волокон локализованы немногочисленные пучки коллагеновых волокон. Регистрируются нейроны со структурно выраженной системой эндоплазматической сети, преимущественно гранулярной. Описанные особенности ультраструктуры спинного мозга выбраны в качестве контрольных показателей для оценки дегенеративных изменений при травмировании и оценки эффективности явлений регенерации при применении мясного продукта.

Общими патоморфологическими особенностями травматического повреждения спинного мозга являлись: отек ткани мозга, деструкция нейроцитов, глиоцитов и нервных волокон. Большинство нервных волокон характеризовались отеком миелиновых оболочек, их отслоением от осевого цилиндра и полной деструкцией. В осевых цилиндрах отмечена деструкция элементов цитоскелета, атипичные везикулы и отек митохондрий (Рисунок 31, Б). Регистрировалось множество поврежденных безмиелиновых нервных волокон в состоянии острого отека аксоплазмы и деструкции микротрубочек. При этом встречалось незначительное количество неповрежденных митохондрий. Регистрировались лишь единичные нервные волокна с восстановленным осевым цилиндром, содержащие четко организованные элементы аксоскелета и неповрежденные митохондрии с кристами.



А. Плотная организация кластеров безмиелиновых нервных волокон и отдельных миелиновых осевых цилиндров: 1 – миелиновое волокно; 2 – безмиелиновое волокно; 3 – коллагеновые волокна; митохондрии; везикулы; миелин (электронограмма: ×22000)



Б. Интерстициальный отек ткани спинного мозга крыс после травмы. Деструкция нервных волокон, фрагментация клеточных элементов глиоцита: 1 – миелиновое волокно; 2 – глиоцит; 3 – атипичные везикулы; митохондрии; полисомы; отек цитоплазмы клетки и интерстиция (электронограмма: ×50200)

Рисунок 31 – Ультраструктура фрагмента спинного мозга. Условные обозначения: А) интактных крыс; Б) оперированных крыс

При этом отмечено отслоение их миелиновой оболочки. В интерстициальном пространстве локализовано значительное количество продуктов распада нервных волокон и нервных клеток. Одновременно отмечалось локальное отслоение

миелина от осевого цилиндра, отек миелиновой оболочки отдельных нервных волокон, что определяется степенью отека ткани мозга. В безмиелиновых волокнах отмечена редукция структурных элементов цитоскелета, локализованы лишь единичные микротрубочки и митохондрии. При этом структурной реорганизации контактов с глиальными клетками не наблюдается. Регенерационные процессы развивались на уровне единичных осевых цилиндров, их миелинизации. Отмечено восстановление структурной организации миелина отдельных нервных волокон. Среднее количество ламелл миелина составила 9,06 ± 0,9 ламелл/волокно, что достоверно меньше показателей интакта в 6 раз ($p < 0,01$).

Экспериментальное моделирование повреждений периферической нервной системы

Полиневропатии – симптом нарушений периферической нервной системы, могут быть вызваны множеством причин, в том числе хроническими токсикозами и аллергиями, что делает применение специальных пищевых добавок и продуктов весьма перспективным. Для изучения развития нарушений после полной невротомии седалищного нерва крыс стока Wister конвенциональной категории (n=24) распределяли на группы:

Группа 1 – интактные животные, содержащиеся при равных условиях (n=7);

Группа 2 – ложнооперированные животные (n=7);

Группа 3 – животные с невротомией седалищного нерва (n=10).

После подготовки животных (пищевая депривация, наркотизация, обработка операционного поля) проводили операцию следующим образом: производили рассечение кожи по линии сегментов L4-L5 с правой стороны, далее седалищный нерв мобилизировали и перерезали на уровне середины бедренной кости крысы. Проксимальный и дистальный концы нерва сшивали эпиневральным швом хирургической нитьюс использованием атравматической иглы, оставляя диастаз 1,7 – 2,0 мм. После чего раны орошали раствором бициллина-3, зашивали прерывистым швом трехгранными в сечении иглами и обрабатывали шов спиртовым раствором бриллиантовой зелени.

Функционально значимое восстановление седалищного нерва оценивали по шкале SFI (Johnston R. B. et al, 1991; Ria M., 2015) ежемесячно гистологическими, морфометрическими и ультраструктурными методами. Состояние тканей в области травмы оценивали через 4 мес.

Установлено, что у 3 животных (15 %) с травмированным нервом наблюдалась контрактура голеностопного сустава. Опорой для ходьбы использовалась медиальная поверхность стопы и голени. Трофические изменения стопы отмечены лишь у 2 животных (10 %), самоампутация пальцев и стопы не выявлена. Показатели шкалы SFI через 1 мес. после травмы седалищного нерва составлял – 80,1 ± 2,4, через 2 мес. – 74,7 ± 3,1, через 3 мес. – 45,1 ± 4,9, а через 4 мес. – 34,7 ± 5,8 (Uемп=0, Uкр=0, $p<0,01$), т.е. отмечено частичное функциональное восстановление во всех опытных животных с травмированным нервом (функционально значимое восстановление в пределах 55,6 %) (физиологическая норма для интакта составила – 5,2 ± 3,7). Полной потери функции седалищного нерва (SFI до 100 баллов) в динамике не установлено. Статистически значимое повышение функции нерва установлено на 3 мес. (45,1 ± 4,9 баллов) и в динамике увеличивалось. В литературе описано, что посттравматическая регенерация седалищного нерва также характеризуется функциональным восстановлением в первые 2 мес. до 30 – 10 баллов по шкале SFI (Barrette B. Et al, 2008; Kato N. et al, 2013). В проведенном исследовании даже после 4 мес. после травмы регистрировали выраженный функциональный дефицит, снижение которого не достигало даже половины нормальной функции.

При изучении структурной организации седалищного нерва интактных животных признаков патологического процесса не обнаружено (Рисунок 32). В нерве присутствовали миелинизированные и немиелинизированные нервные волокна. Нервные волокна плотно организованы в нерве, между кластерами волокон встречаются кровеносные сосуды. Нервные волокна имеют продольно ориентированное направление относительно оси нерва, встречаются отдельные рекуррентные волокна. В епиневрии присутствуют кровеносные сосуды, стаз форменных элементов не обнаружен. Процессов гипертрофии и фиброза эпиневрия

также не встречали. Плотность нервных волокон в 1 мм 2 нерва составила 10318,0 ± 760,0 шт/мм^2.

У ложнооперированных животных существенных отличий структурной организации седалищного нерва от интактных животных не установлено. Нервные волокна имели нормальное (классическое) строение, их количество существенно не отличалась от контрольной группы (10156,0 ± 667,6 шт/мм^2).

Через 4 мес. после полной невротомии и сшивания конец в конец эпиневральным швом (end-to-end) у животных отмечались некоторые процессы регенерации нервных волокон. Проксимальный отдел травмированного нерва характеризовался признаками нарушения морфологической организации, выражавшейся в изменениях количества и строения нервных волокон и строения эпиневрия. Эпиневрий характеризовался пролиферацией фибробластов. Отмечены увеличение количества элементов внеклеточного матрикса (коллагена) и инфильтрация нейтрофилов и макрофагов. В отдельных областях эпиневрия выявлена регенерация пучков нервных волокон. Нервные волокна часто гиперимпрегнированны. Большое количество волокон с тонкими миелиновыми оболочками. Встречаются спирали Перрончито, т.е. нарушается регенерация нервных волокон и развивается их дегенерация. Между нервными волокнами отмечается пролиферация шванновских клеток и фибробластов. Количество нервных волокон в проксимальном отделе было ниже на 42,5 % ($p<0,01$), чем у интакта и составило 4394,9 ± 454,7 шт/мм^2. В дистальном отделе этот показатель снижался на 27,1 % ($p<0,01$) и достигал 2799,2 ± 397,3 шт/мм^2.

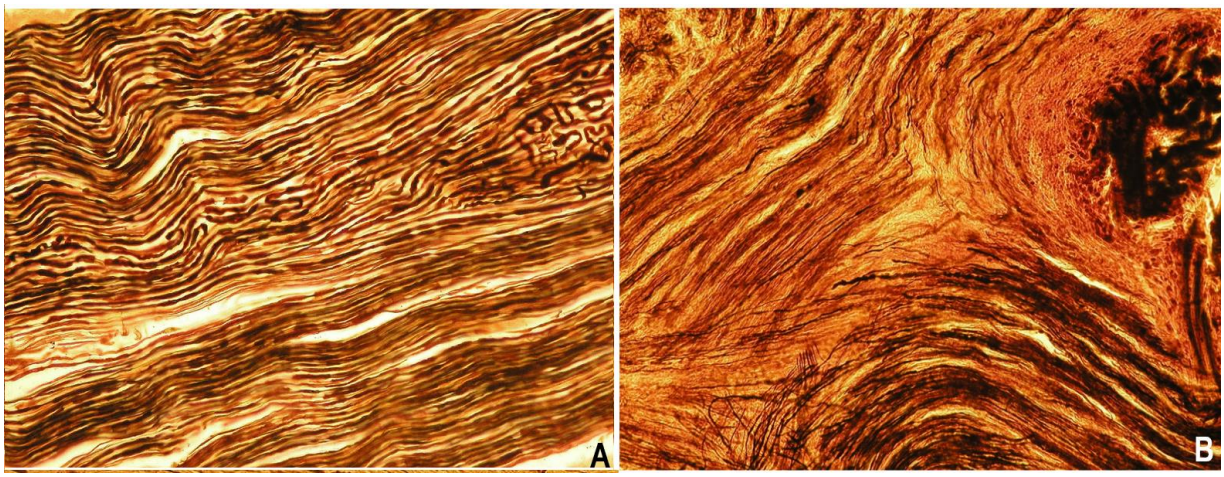


Рисунок 32 – Микрофотография фрагмента седалищного нерва. Условные обозначения: А) интактных крыс; В и С) оперированных крыс после невротомии и сшивание (end-to-end) (импрегнация серебром, об. 20, ок. 10): А – нервные волокна ориентированы вдоль оси нерва, большинство нервных волокон миелинизированы; В – регенерация в зоне шва, разнонаправленная регенерация, глиоз вокруг шва; С – регенерация нервных волокон в дистальном отделе седалищного нерва, глиоз и ангиогенез зоны шва.

Таким образом, для моделей травмы спинного и переферического нервов в качестве маркеров выбраны: функциональное восстановление спинного мозга по шкале BBB и периферического нерва по шкале SFI; изучение структурной организации участка травмированного спинного мозга и седалищного нерва с помощью гистологических и ультраструктурных методов.

Представленные данные свидетельствуют о том, что данные модели воспроизведения травмы спинного мозга и периферического нерва может быть как самостоятельным методом, так и использоваться в составе комплексной методики продтверждения регенерационной способности исследуемых продуктов и ингредиентов, обладающих нейропротекторными эффектами действия.

5.4.3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ ИММУНОСУПРЕССИВНЫХ СОСТОЯНИЙ

Нарушение иммунного статуса организма человека и животных, обусловленное воздействиями неблагоприятных факторов окружающей среды (физической, химической и биологической природы) на организм рассматривается как фактор риска для развития многих патологических процессов.

Иммуносупрессивные состояния воспроизводят в основном на грызунах. Мыши являются основой иммунологических экспериментов *in vivo* и во многих отношениях хорошо отражают биологию человека (Mestas J., Hughes C. C. W., 2004). Однако между мышами и людьми существуют значительные различия в развитии, активации и реакции врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы. Сегодня в иммунологических исследованиях используют трансгенных гуманизированных мышей линий NAT1hom и NAT2hom (Дуля М. С. с соавт., 2019), аутбредные линии мышей SCID и J:NU (Гайдай Е. А., Гайдай Д. С., 2019).

Модели крыс представляют собой интересную дополнительную альтернативу, обладающую такими преимуществами перед мышами, как >90 % сходство генома с геномом человека, более крупным размером и активной системой комплемента (Ménoret S. et al, 2020). Большинство испытаний по изучению новых средств иммунокорекции требует использование воспроизводимых моделей иммунодефицита. Известны различные модели дисфункции иммунной системы, например: «стафилококковая модель», заключающаяся в использовании культуры *S. aureus* для создания экспериментального сепсиса мышей, вызывающего выраженную депрессию функций системы нейтрофильных гранулоцитов; хирургическая модель удаления вилочковой железы (тимэктомм), обуславливающая торможение дифференцировки стволовой клетки в направлении гранулоцитопоэза (Колесникова Н. В., Нестерова И. В., 1998).

Однако наиболее часто используются химические модели иммунодефицита с помощью введения цитостатиков, вызывающие выраженное

иммуносупрессивное действие за счет угнетения Т-субпопуляции лимфоцитов (малые дозы) и В-субпопуляции лимфоцитов (высокие дозы) (Гайдай Д. С. с соавт., 2019). Цитостатик циклофосфан вводят преимущественно внутрибрюшинно однократно (в дозах 8 – 10 мг/100 г массы тела животного, исследование иммунологических показателей проводят через 5 – 6 сут) (Уразаева С. И., 2018); трехкратно (с интервалом 3 дня) в дозе 0,5 мг/100г массы тела (Василевская Е. Р., 2019). Для моделирования иммуносупрессии животным вводят цитостатик Азатиоприн в дозе 5 мг/100 г массы тела ежедневно в течение 5 сут перорально (Наполов Ю. К., Борисов К. Б., 1991). На основании выше изложенного в качестве моделей *in vivo* иммуносупрессии выбраны химические циклофосфамидные и азатиоприновые иммунодефицитные состояния, проведены их сравнительные исследования с целью выбора адекватной модели для изучения диетотерапевтических и диетопрофилактических эффектов пищевых продуктов.

Эксперименты были выполнены на половозрелых клинически здоровых крысах-самцах стока Wistar (n=60) средней массы (220,5 ± 5,5) г, которых распределяли по принципу парных аналогов на группы: группа 1 – («Циклофосфан», ОА «Верофарм»), группа 2 – («Азатиоприн», «Мосхимфармпрепараты им. Н. А.Семашко») и группа 3 – (Интакт).

Динамику развития иммуносупрессии оценивали спустя 12 сут (по окончании моделирования), стойкость модели на 19 сут после окончания моделирования.

Анализ динамики массы тела крыс показал, что у животных группы 1 масса снижалась с 7 до 13 сут в среднем на 1 – 3 г/сут, у животных группы 2 достоверного снижения массы тела не выявлено. Привесы у интактных животных группы 3 составили 21,4 %, у крыс группы 2 – 11,8 %, у крыс группы 1 – 0,9 % (Рисунок 33).

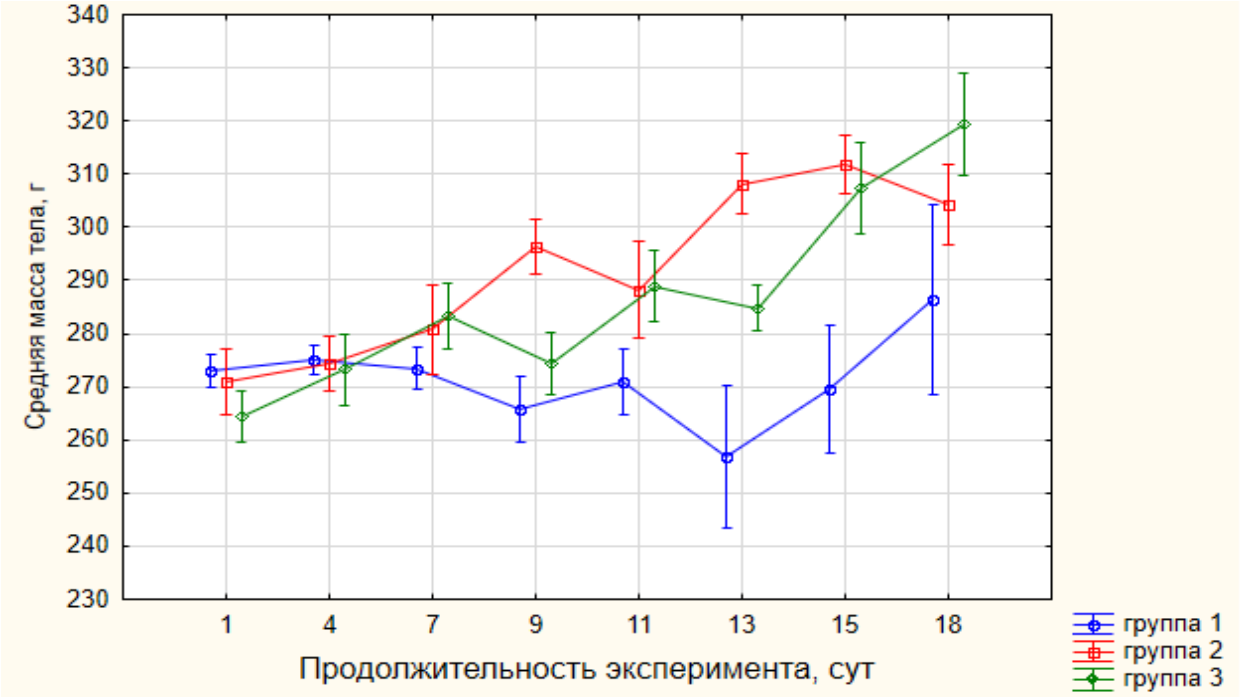


Рисунок 33 – Диаграмма изменения массы крыс с ИС в течение эксперимента

В результате гематологических исследований крови крыс группы 1 (Таблица 29) показано снижение количества WBC и LYM относительно группы 2 и 3 на 74,3 % и на 90,5 %, 75,9% и на 91,7 % ($p<0,001$) при снижении количества GRAN на 42,4 % ($p=0,0293$) относительно группы 3. %LIM снижалось относительно группы 2 и 3 на 62,3 % и 61,5% ($p<0,001$), тогда как %MON и %GRA увеличивалось на относительно группы 2 в 13,4 раза и в 2,9 раза и относительно группы 3 в 13,3 раза и 2,5 раза ($p<0,001$). Установлено снижение количества эритроцитов относительно группы 2 (на 11,7 % при $p= 0,0366$) и относительно группы 3 (на 14,0 % при $p= 0,0006$), а также относительно группы 3: гемоглобина на 12,6 % ($p=0,0031$), гематокрита на 16,2 % ($p<0,0001$), среднего объема эритроцита на 5,3 % ($p=0,0087$); увеличение средней концентрации гемоглобина в эритроците на 5,7 % ($p= 0,0004$).

В группе 2 отмечено снижение среднего объема эритроцита (на 5,3 %, $p=0,0074$ относительно группы 3), увеличение тромбоцитов и тромбокрита (на 55,1 % и на 40,5 %, $p<0,001$ относительно группы 1), снижение среднего объема тромбоцита и распределение тромбоцитов (на 8,7 % и на 5,1 %, $p<0,001$ относительно группы 1).

Таблица 29. Результаты гематологического анализа крови крыс с моделью ИДС (Me [P25–P75])

Показатель	Группа 1 («Циклофосфан»)	Группа 2 («Азатиоприн»)	Группа 3 (Интакт)
WBC, 10^9/l	**2,02*# [1,41 – 2,61]**	7,86 [5,43 – 9,44]	8,39 [5,79 – 10,32]
LYM, 10^9/l	**0,51*# [0,23 – 0,79]**	5,35 [4,23 – 7,53]	6,14 [3,5 – 8,28]
MID, 10^9/l	0,15 [0,07 – 0,26]	0,07 [0,05 – 0,14]	0,07 [0,06 – 0,24]
GRAN, 10^9/l	**1,17* [0,8 – 1,64]**	1,81 [1,28 – 2,41]	2,03 [1,88 – 2,32]
%LYM	**28,3*# [9,1 – 38,5]**	76,15 [73,2 – 77,98]	73,55 [64,9 – 79,48]
%MON	**8,7*# [6,6 – 11]**	0,7 [0,6 – 2,5]	0,65 [0,6 – 4,3]
%GRAN	**61,6*# [54,8 – 80,2]**	21,45 [20 – 25,88]	24,65 [19,93 – 28,1]
RBC, 10^{12}/l	**6,58*# [6,12 – 6,83]**	7,45 [6,72 – 7,65]	7,65 [6,99 – 8,3]
HGB, g/l	**121,0* [110,0 – 125,2]**	129,0 [123,1 – 133,3]	138,5 [128,2 – 151,5]
HCT, %	**35,55* [33,18 – 37,12]**	38,65 [37,43 – 39,84]	42,42 [40,15 – 46,16]
MCV, mkm^3	**54* [52 – 56]**	**54* [52 – 55]**	57 [56 – 57]
MCHC, g/l	**341* [334 – 344]**	332,5 [329 – 334,25]	322,5 [318 – 327,75]
PLT, 10^9/l	534,0 [453,0 – 575,2]	**828,5# [709,7 – 869,3]**	697,5 [684,5 – 790,2]
PCT, %	0,37 [0,32 – 0,4]	**0,52# [0,44 – 0,56]**	0,46 [0,44 – 0,51]
MPV, mkm3	6,9 [6,6 – -7,2]	**6,3# [6,2 – 6,6]**	6,5 [6,4 – 6,6]
PDWc, %	33,4 [32,6 – 34,2]	**31,7# [31,2 – 32,3]**	32,6 [32,08 – 32,78]

Примечание: * – при p<0,05 относительно группы 3;
– при p<0,05 между группами 1 и 2.

Результаты биохимических исследований сыворотки крови крыс представлены в Таблице 30.

Таблица 30. Биохимические показатели сыворотки крови крыс с моделью ИС (Me [P25–P75])

Показатель	Группа 1 («Циклофосфан»)	Группа 2 («Азатиоприн»)	Группа 3 (Интакт)
Общий белок, г/л	62,6 [62,4 – 64,7]	65,2 [64,3 – 66,1]	66,1 [64,3 – 66,7]
Альбумин, г/л	42,4 [40,8 – 43,3]	42,4 [41,9 – 42,8]	42,2 [41,0 – 43,8]
Креатинин, мкмоль/л	83,2 [81,0 – 88,2]	84,8 [84,1 – -86,4]	81,1 [75,3 – 85,5]
Мочевина, ммоль/л	6,3[5,9 – 6,8]	**9,1[8,7 – 9,9] *#**	7,8 [7,5 – 8,0]
Билирубин общ., мкмоль/л	1,7 [1,7 – 2,2]	1,5 [1,3 – 1,8]	1,9 [1,6 – 1,9]
Билирубин прямой, мкмоль/л	**1,9 [1,7 – 2,5] ***	2,5 [2,3 – 2,8]	2,9 [2,6 – 3,1]
АсАт, Е/л	86,92 [81,01 – 95,07]	**115,9 [104,4 – 126,8] #**	96,8 [91,8 – 101,7]
АлАт, Е/л	22,1 [20,3 – 29,4]	**45,2 [42,3 – 58,3] *#**	30,1 [21,5 – 36,3]
ЩФ, Е/л	156,9 [146,5 – 193,5]	**210,3 [198,3 – 220,6] #**	170,0 [165,2 – 192,5]
ЛДГ, Е/л	228,5 [189,8 – 272,2]	319,2 [227,3 – 720,1]	454,1 [285,5 – 578,6]
ГГТ, Е/л	**4,5 [3,5 – 5,6] #**	2,5 [2,2 – 3,5]	3,1 [1,7 – 4,3]
КК, Е/л	393,8 [329,2 – 443,3]	592,5 [361,4 – 698,8]	496,8 [435,4 – 571,9]
Амилаза Е/л	399,0 [339,0 – 484,2]	**687,5 [621,5 – 733,8]*#**	481,5 [416,3 – 529,8]
ОХС, ммоль/л	1,49 [1,21 – 1,55]	1,52 [1,53 – 1,61]	1,40 [1,20 – 1,52]
ТГ, ммоль/л	1,1 [1,0 – 1,5]	1,7 [1,2 – 2,2]	1,6 [1,1 – 1,7]
Глюкоза, ммоль/л	8,8 [7,2 – 9,7]	9,1 [8,2 – 11,1]	8,2 [7,5 – 9,1]
Хлор, ммоль/л	**97,1 [94,0 – 99,2] ***	**97,5 [96,0 – 100,1] ***	103,5 [103,1 – 104,5]
Кальций, ммоль/л	3,0 [2,9 – 3,1]	**3,1 [2,9 – 3,2] ***	2,8 [2,7 – 2,9]
Магний, ммоль/л	0,84 [0,82 – 0,92]	0,9 [0,8 – 1,1]	0,8 [0,8 – 0,9]
Фосфор, ммоль/л	3,4 [3,4 – 3,5]	3,6 [3,5– 3,7]	3,5 [3,4 – 3,7]
Калий, ммоль/л	6,3 [6,0 – 6,5]	**6,6 [6,4 – 6,8] ***	5,8 [5,4 – 5,9]
Железо, ммоль/л	31,73 [23,93 – 36,85]	**38,70 [35,7 – 42,6] ***	31,51 [22,2 – 33,3]
Мочевая кислота, ммоль/л	224,0 [127 – 256]	**168,1 [136,5 – 260,5]***	110,5 [83,5 – 156,8]

Примечание: *– при p<0,05 относительно группы 3;
– при p<0,05 между группами 1 и 2.

У крыс группы 1 выявлено снижение содержания общего билирубина относительно группы 3 на 34,48 % (p=0,0211), хлора на 6,18 % (p<0,0005); увеличение активности ГГТ относительно групп 2 и 3 на 80,0 % (p= 0,0425) и на 45,16 % (p= 0,1864). В группе 2 выявлено увеличение активности АсАт, амилазы, АлАт и ЩФ на 33,34 % (p=0,0082), на 42,78% (p=0,0140), в 1,5 раза (p=0,0003) и в 1,4 раза (p<0,0001) и относительно группы 1 и на 19,73 % (p=0,1947), на 70,05 % (p=0,0003), в 2 раза (p<0,005) и в 1,2 раза (p=0,0461) относительно группы 3; содержания железа на 22,82 % (p=0,0242) относительно группы 3, снижение содержания хлора относительно на 5,60 % (p=0,006) относительно группы 3; увеличение содержания кальция и фосфора на 10,71 % (p= 0,0294) относительно группы 3 и на 13,79 % (p=0,001) относительно группы 1.

Исследование внутренних органов показало (Таблица 31), что у животных группы 1 относительная масса тимуса снижалась на 50,0 % (p=0,0202) и на 38,9 % (p=0,0585) относительно групп 3 и 2; у животных группы 2 относительная масса печени превышала значения группы 3 на 30,4 % (p= 0,0317).

Таблица 31. Относительная масса внутренних органов крыс с моделью ИДС (Me [P25–P75])

Параметры	Сердце	Тимус	Печень	Почка	Селезенка
Группа 1 («Циклофосфан»)	0,42 [0,39 – 0,51]	**0,11* [0,09 – 0,13]**	3,55 [3,16 – 4,42]	0,37 [0,27 – 0,40]	0,28 [0,21 – 0,43]
Группа 2 («Азатиоприн»)	0,40 [0,38 – 0,46]	0,18 [0,14 – 0,22]	**4,12* [3,79 – 4,46]**	0,33 [0,30-0,37]	0,28 [0,27 – 0,30]
Группа 3 (Интакт)	0,39 [0,34 – 0,43]	0,22 [0,19 – 0,26]	3,16 [2,96 – 3,48]	0,32 [0,3-0,34]	0,22 [0,21 – 0,25]

Примечание: * – при p<0,05 относительно группы 3.

Анализ результатов исследования показал, что Азатиоприн не оказывает влияние на функциональные показатели лейкоцитов, но увеличивает тромбоцитарные индексы крови и выраженно влияет на печень (увеличивает активность печеночных ферментов и относительную массу печени). Циклофосфан вызывал все признаки острого медикаментозного иммунодефицитного состояния, в т.ч. атрофию тимуса. Сохранность модели наблюдалась до 19 сут. Полученные данные соотносятся с результатами (Гайдай Д. С. с соавт., 2019).

Таким образом показана возможность использования в качестве модели *in vivo* для изучения пищевых продуктов и ингредиентов, обладающих иммунотропной активностью, циклофосфамидной иммуносупрессии. Основными маркерами развития функциональных нарушений и оценки иммунного статуса выбраны: общее число лейкоцитов, гранулоцитов, моноцитов, их соотношения в лейкоцитарной формуле, число зрелых Т-лимфоцитов (CD3+) и их субпопуляций (CD4+, CD8+); IgA, IgM, IgG; IL-2, IL-4, IL-6.

5.4.4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ

При различных повреждениях тканей в организме запускается массивный каскад репаративных процессов, направленных на восстановление гомеостаза. Важную роль в регуляции данного процесса играют молекулярные факторы как внутритканевые, так и внутриклеточные, действие которых направлено, в случае повреждения ткани и убыли ее дифференцированных клеток, на активацию пролиферации и специализацию клеток. Модели повреждения кожных покровов в первую очередь направлены на изучение регенерионного потенциала различных соединений. В основном такие модели являются скрининговыми, позволяющими получить быстрый результат.

В качестве модельных объектов для моделирования повреждения кожных покровов преимущественно используют мышей. Однако стоит отметить, что кожа морских свинок имеет больше сходств с человеческой – имеет большую толщину и сходную архитектонику (Grada A., Mervis J., Falanga V., 2018). Это позволяет более отчетливо наблюдать изменения при повреждении эпидермальных слоев и, как следствие, более точно оценивать эффекты ранозаживления.

Моделирование плоскостных ран проводили на наркотизированных мышах (n=20), эксперимент завершали на 9 сут. Моделирование лоскутных ран осуществляли на морских свинках (n=12). Эффективность модели оценивали на

примере заражения раны синегнойной палочкой - P. Aeruginosa, которую в количестве 1×10^6 КОЕ дополнительно вносили во все раны животным группы 2. В ходе эксперимента оценивали скорость заживления раневой поверхности и тензиометрические показатели.

В эксперименте на мышах выявлено, что плоскостные раны характеризуются отсутствием выраженных воспалительных реакций. Визуально отмечено, что фаза эпителизации проявлялась на 4 сут, образование рубца – на 6 – 8 сут. Масса груза, необходимого для разрыва рубца, составила 220 [184 – 250] г. Достоверных изменений гематологических показателей не выявлено (Таблица 32).

Таблица 32. Результаты гематологического анализа крови мышей (M±m)

Показатель	**Группа 1 (интакт)**	**Группа 2 (рана)**
WBC, 10^9/l	8,89±1,14	8,95±1,34
LYM, 10^9/l	8,4±1,33	8,35±2,2
MID, 10^9/l	0,20±0,14	0,36±0,25
GRAN, 10^9/l	1,66±0,27	1,04±0,71
LYM, %	79,77±1,71	77,12±6,94
MON, %	1,57±0,88	1,92±0,94
GRAN, %	15,77±2	17,11±5,07
RBC, 10^{12}/l	10,99±0,54	10,19±0,34
HGB, g/l	153,9±7,58	145,93±3,32
HCT, %	47,99±2,37	44,28±0,9
MCV, mkm^3	44±0,67	43,57±1,45
MCHC, g/l	320,7±6,27	329,21±4,35
PLT, 10^9/l	655,75±83,81	630,92±58,32
PCT, %	0,3±0,14	0,44±0,09
MPV, mkm3	6,44±1,08	6,01±0,37
PDWc, %	34,65±2,98	32,16±1,21

Гистологические исследования показали сохраннось структуры эпидермиса у всех экспериментальныхживотных через 9 сут после моделирования травмы. Отмечено, что поверхность кожи и стержни волоса оплетены кератином, сальные железы образуют комплексы с волосяными фолликулами; дермальные сосочки немногочисленны, расположены в случайном порядке; клетки дермы локализуются в субэпидермальных участках; сосуды микроциркуляторного русла мелкие,

хорошо выражена подсосочковая сеть капилляров. По краям раны отмечено небольшое истончение эпидермиса с одновременным разрастанием соединительнотканной основы дермы и накопление клеточных элементов (макрофаги, фибробласты), незначительное восстановление волосяных фолликулов на месте раны (Рисунок 34).

По результатам визуальной оценки лоскутных ран выявлено, что зараженные раны затягивались медленнее и характеризовались незначительными воспалительными реакциями. На 3 сут отмечено подсыхание ран и выраженная гиперемия (значительное покраснение) вокруг раны. В 50 % случаях незараженные раневые поверхности значительно сокращались на 7 сут, во всех случаях образовывался плотный гипертрофический рубец. В ранах не выявлено гнойно-экссудативных процессов, гиперемия отмечалась в случае заражения ран *P. Aeruginosa*. Рубец образовывался на 14 сут, гистологически выявлена выраженная васкуляризация, накопление фибробластов и отсутствие волосяных фолликулов.

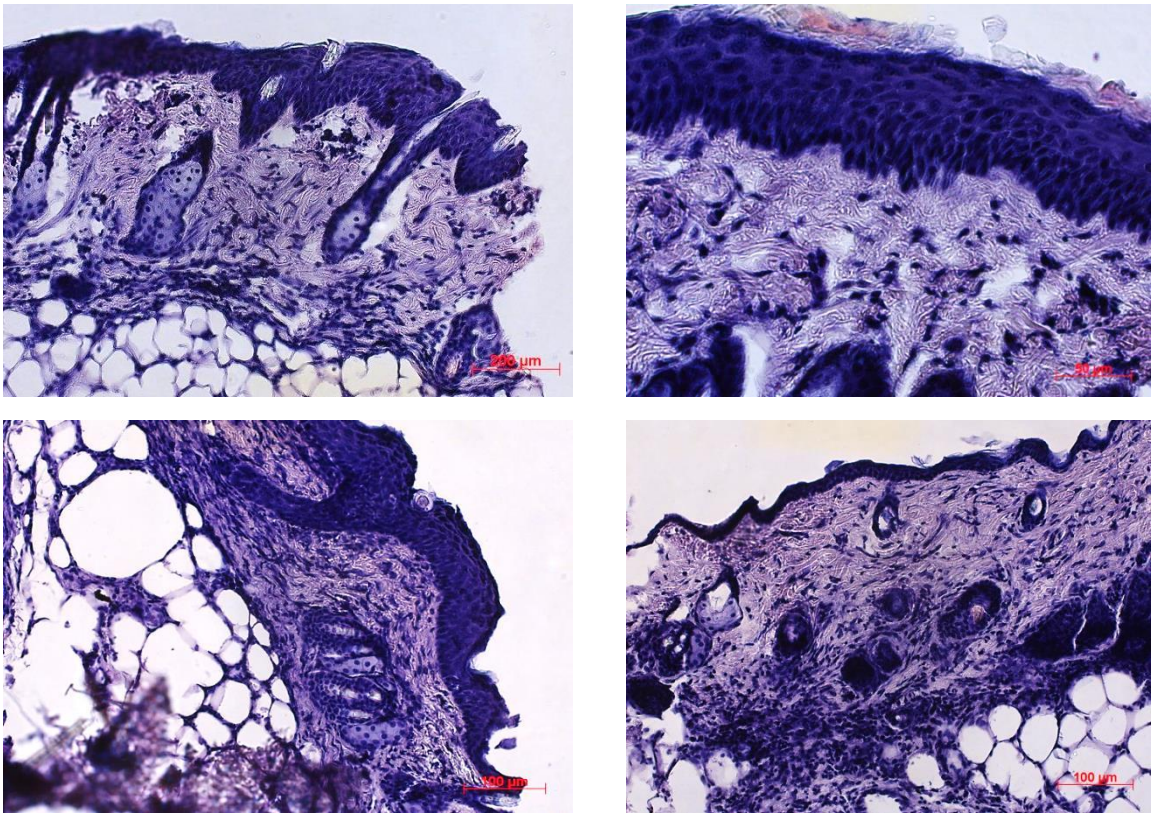


Рисунок 34 – Строение поврежденного участка кожи мышей (окраска Гематоксилин-Эозином. Об.20. Ок 10)

Измерение площади раневых поверхностей показало, что на 3 сут площади ран без внесения *P. Aeruginosa* практически не отличались между контролем и группами сравнения (Рисунок 35).

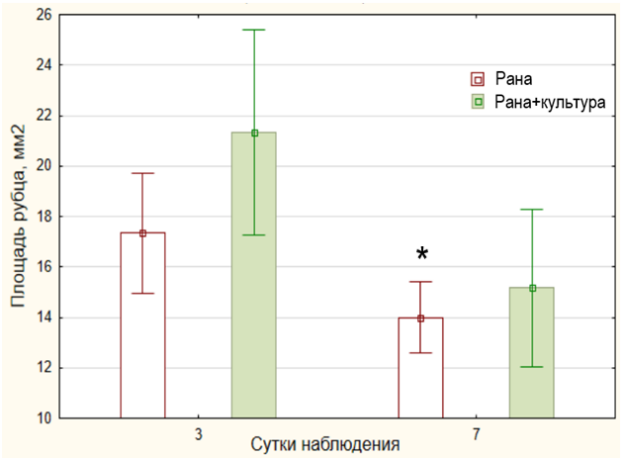


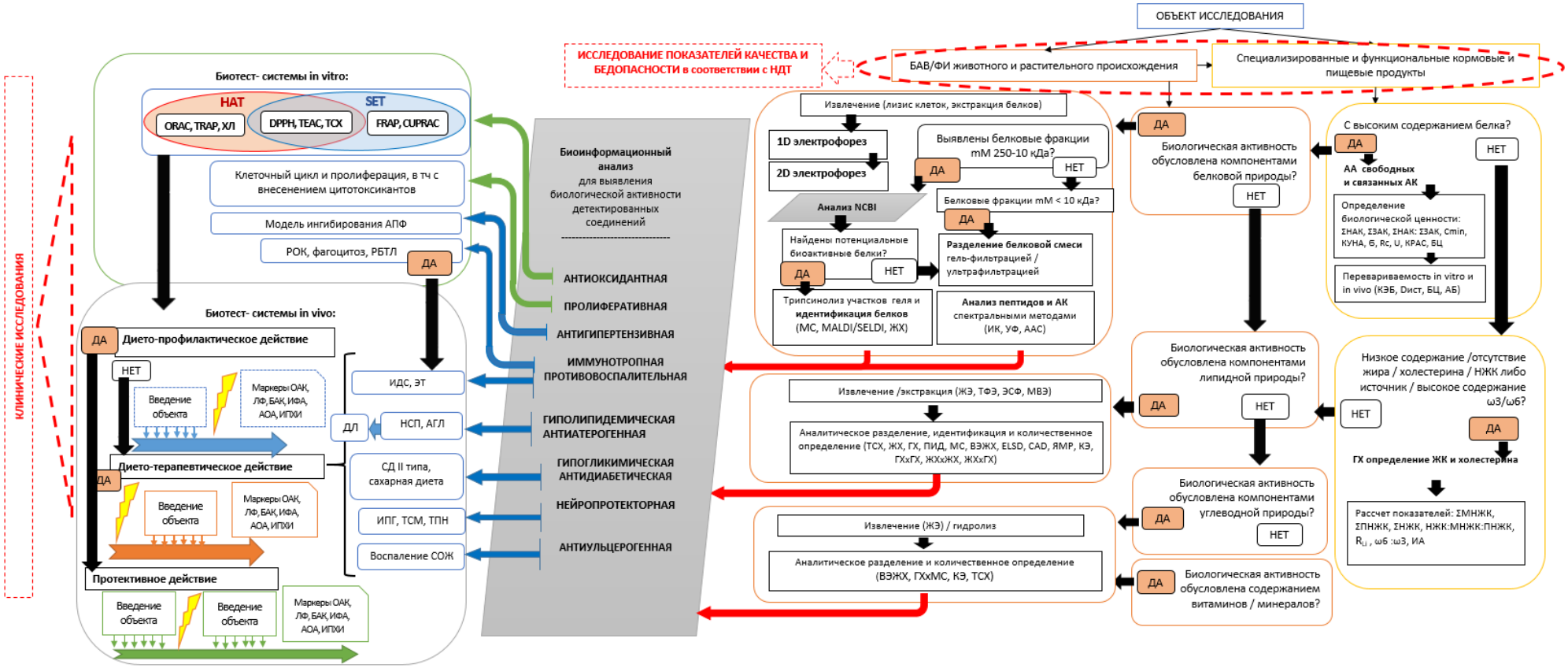
Рисунок 35 – Результаты измерения площади рубца при моделировании лоскутных ран на морских свинках

Таким образом, в качестве маркеров развития функциональных нарушений кожи и оценки регенеративнвых процессов выбраны: визуальная оценка процессов ранозаживления; тензиометрия, а гистологически: накопление клеточных элементов, фибробластов, состояние волосяных фолликулов.

5.4.5. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА КОМПЛЕКСНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

На основании проведенных теоретических и экспериментальных исследований разработан алгоритм, описывающий общие принципы процедуры исследования специфической активности БАВ, функциональных и специализированных пищевых продуктов на их основе, который может быть использован как комплексный подход с сочетанием различных методов и интегральных показателей (рисунок 36). Данный алгоритм, в зависимости от объекта – пищевого продукта или биоактивного компонента – позволяет выбрать основные пути, комплекс приемов, методов, объектов и показателей.

Согласно сформулированному алгоритму, первая часть исследований направлена на выявление потенциальных активных компонентов в зависимости от их природы – белковой, липидной, углеводной или пр. Данный процесс включает их извлечение и изучение с помощью различных физико-химических методов (представлены наиболее распространенные и широко используемые в лабораторной практике). Ключевым и завершающим моментом этого процесса является биоинформационный анализ полученных данных, в соответствии с которым можно определить направленность биологической активности. Следующим этапом является подтверждение биологической активности в экспериментах *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.



Примечание: АА - аминокислотный анализ; АК - аминокислоты; НАК - незаменимые аминокислоты; ЗАК - заменинмые аминокислоты; Cmin - минимальный скор; КУНА - коэффициент утилитарности j-й незаменимой аминокислоты; Б- коэффициент утилитарности белка; U - коэффициент сопоставимой избыточности; Rc - 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; МНЖК - мононенасыщенныежирные кислоты; RLi - 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 - жидностная экстракция; ТФЭ - твердофазная экстракция; ЭСФ- сверхкритическая флюидная экстракция; МВЭ- микроволновая экстракция; ТСХ - тонкослойная хроматография; ГХ - газовая хроматография; ПИД - пламенно-ионизационный детектор; ВЭЖХ - высокоэффективная 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; TRAP - общая способность к улавливанию радикалов; ХЛ - хемилюминисцентные методы; DPPH - изменения концентрации стабильного 2, 2-дифенил-1-пикрилгидразил радикала; TEAC – метод определения эквивалентов Тролокса; FRAP – железовосстанавливающая/антиоксидантная способность; CUPRAC - метод измерения комплексов с Cu(II); НАТ - передача атома водорода; SET - передача электрона; АПФ - ангиотензин-превращающий фермент; РОК - розеткообразующие клетки; РБТЛ- реакция бласт трансформации лимфоцитов; ИДС - иммунодепрессивные состояния; ЭТ- эндотоксикоз; ДЛ - дислипидемия; НСП - неалкогольный стеатоз печени; АГЛ - алиментарная гиперлипидемия; СД - сахарный диабет; ИПГ - интрацеребральная посттравматическая гематома; ТСП - травма спинного мозга; ТПН - трама переферического мозга; СОЖ - слизистая оболочка желудка; ОАК - общий анализ крови; ЛФ - лейкоцитарная формула; БАК - биохимический анализ крови; ИФА - иммуноферментный анализ; АОА - показатели антиоксидантной защиты; ИПХИ - интегральные показатели хронической интоксикации.

Рисунок 36 – Алгоритм и общие принципы процедуры исследования специфической активности биологически активных веществ, функциональных и специализированных пищевых продуктов на их основе

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 5

Представленные в главе результаты исследований по обоснованию выбора экспериментальных биотест-систем *in vitro, ex vivo* и *in vivo* свидетельствуют об их перспективности для оценки специфических свойств и эффективности биоактивных веществ различной природы, функциональных и специализированных пищевых продуктов на организменном, органном и клеточном уровнях. В качестве основных физико-химических методов анализа, позволяющих оценить биобезопасность, содержание биоактивных соединений и прогнозировать потенциальные эффекты, определены спектральные и протеомные технологии. В главе представлен анализ современных критериев для расчета нутриентной адекватности, позволяющих сопоставить разрабатываемые продукты с медико-биологическими требованиями и, в случае необходимости, внести коррективы в рецептуру и технологию. Рассмотренные основные статичные и динамические модели моделирования условий ЖКТ, позволили сформулировать модель как для изучения биодеградации капсулированных соединений, так и для изучения процесса переваривания нутриентов продуктов и сырья, в т.ч. функциональных белков. Для изучения гипотензивных свойств объектов экспериментально обоснован спектрофотометрический метод, позволяющий путем ферментной реакции определить остаточную активность АПФ с использованием в качестве эталона каптопроила. Определена стратегия определения антиоксидантной активности, в качестве основных выбраны фотометрический (FRAP), флуоресцентный (ORAC и TEAC) и хемилюминесцентный методы. Проанализирован и воспроизведен метод изучения иммунотропной активности: розеткообразования тимоцитов.

Для изучения биологических эффектов продуктов и ингредиентов экспериментально обоснованы методы изучения ex vivo пролиферативной активности – на эксплантатах тканей куриных эмбрионов и крыс с определением индекса площади периферической зоны роста клеток; цитопротективных свойств – на клетках НТ-29 при воздействии цитотоксических концентраций солей ртути и ионов кадмия, оптическим подсчетом количества жизнеспособных клеток;

мембранотропной активности – на свежеизолированных гепатоцитах морской свинки с подсчетом клеточных ядер. Теоретически и экспериментально обоснованы методы *in vivo*, предлагаемые для анализа иммуномодулирующих, гиполипидемических, гипогликемических, нейропротективных свойств.

Рассмотренные методические подходы *in vivo, in vitro* и *ex vivo,* предлагаемые к исследованию эффективности специализированных и функциональных пищевых продуктов и биоактивных веществ нашли логическое заключение в Алгоритме и общих принципах процедуры исследования специфической активности биологически активных веществ, функциональных и специализированных пищевых продуктов на их основе.

В заключение стоит отметить, что несмотря на направленность современных концепций научных исследований на внедрение в практику альтернативных методов биомоделирования (*in vitro* и *ex vivo)*, позволяющих прогнозировать и оценивать механизмы действия исследуемых веществ и рационализировать использование лабораторных животных, медико-биологические эксперименты с участием последних весьма распространены.

Это связано с тем, что исследования на лабораторных животных являются одним из наиболее приемлемых, адекватных, объективных и надежных методов научных исследований, позволяющих максимально объективно и всесторонне анализировать многие системные явления, в том числе положительные или негативные, происходящие в организме с нарушенными функциями при минимальных потерях и риске. Несмотря на некоторые опасения об экстраполяции данных *in vivo* на человека, прогресс, достигнутый благодаря лабораторным животным, не вызывает сомнений – почти 90 % всех Нобелевских премий в области физиологии и медицины получены по результатам экспериментов *in vivo* (Andersen M. L., Winter L. M. F. 2019).

При этом стоит отметить, что наиболее успешным является комплексный подход, сочетающий в себе высокую информативность исследований in vivo и детальное изучение механизмов методами *in vitro* и *ex viv*o.

ГЛАВА 6. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АЛГОРИТМА ДЛЯ ОЦЕНКИ СВОЙСТВ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ

В главе представлены результаты апробации на функциональных ингредиентах и пищевых продуктах специализированной и функциональной направленности разработанного Алгоритма и общих принципов процедуры исследования специфической активности биологически активных веществ, функциональных и специализированных пищевых продуктов на их основе.

Приведены данные физико-химических исследований и биологических экспериментов *in vitro, ex vivo* и *in vivo* по изучению специфической активности функциональных ингредиентов растительного и животного происхождения, а также специализированных пищевых продуктов.

6.1. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В СООТВЕТСТВИИ С АЛГОРИТМОМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Результаты изучения биологических эффектов ягод годжи различного географического происхождения

Анализ современных данных о ягодах годжи выявил, что фрукт содержит в значительных количествах биоактивные полисахариды и гетерогликозиды (около 46 % от сухого вещества) (Ma Z. F. et al, 2019), витамины-антиоксиданты и соединения фенольной группы (Kulczyński B., Gramza-Michałowska A., 2016; Skenderidis P., et al, 2019).

Согласно Алгоритму, для изучения функциональных соединений исследуемых ягод был проведен анализ моносахаридной композиции, витаминов Е и С, изомеров жирных кислот и общего количества фенольных соединений.

Установлено, что в ягодах в значительном количестве содержится глюкоза: 19,0 – 21,0 % для LC, 13,0 –14,5 % для LB; фруктоза и рибоза: 10,5 –11,0 % для LC,

6,0 – 6,7 % для LB; в незначительном количестве арабиноза: 0,06 % для LC, 0,05 % для LB; галактоза: 0,02 % для LC, 0,04 % для LB; манноза: 0,01% для LC, 0,005% для LB; ксилоза: 0,007 % для LC, 0,003 % для LB; лактоза и мальтоза не превышали 0,002 % и в среднем не различались в ягодах. Подобные различия в моносахаридной композиции согласуются с исследованием Potterat O. (2010).

В ягодах LB относительно ягод LC отмечено более высокое содержание аскорбиновой кислоты (672,5 ± 33,6 мг/100 г против 438,3 ± 21,2 мг/100 г) и альфа-токоферола (8,1 ± 0,03 мг/100 г против 7,2 ± 0,01 мг/100 г).

Установлено, что суммарное содержание фенольных соединений в ягодах LC составляло 0,139 ± 0,003 % и превышало данный показатель для ягод LB (0,112 ± 0,002 %). Подобные различия могут быть обусловлены как технологическими аспектами заготовки ягод (например, режимами сушки и длительностью хранения), так и климатическими условиями зоны произрастания исследуемых ягод (Mocan A. et al, 2014; Liu Y. et al, 2014).

ГХ-анализ исследуемых ягод и идентификация полученных 212 масс-спектров с использованием базы данных NIST’08 позволили выявить предположительно наличие 11 соединений: гексадекановая кислота (CAS#000057-10-3), кампестерол (CAS#000474-62-4), эйкозановая кислота (CAS#000506-30-9), цис-5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая кислота (CAS#002734-47-6), 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4H-пиран (CAS#028564-83-2), этил-линолеат (CAS#000544-35-4), 9,12-октадеценовая кислота (CAS#000060-33-3), гептадекановая кислота (CAS#000506-12-7), 5-метил-2-(1-метилэтил)-циклогексанон (CAS#007786-67-6), додекановая кислота (CAS#000143-07-7) и пентадекановая кислота (CAS#005129-60-2).

Одновременно с этим в профилях исследуемых ягод обнаружены дополнительные спектры: в LB – стигмастерол (CAS#000083-48-7) и бета-ситостерин (CAS#000083-46-5), в LC – триметилглицин (CAS#000107-43-7) и гамма-ситостерин (CAS#000083-47-6). Биоинформационный анализ выявил, что данные вещества стероидной природы регулируют широкий спектр функций организма, в частности обмен липидов (Feng S. et al, 2018).

Анализ антиоксидантного потенциала ягод методами *in vitro* выявил высокую общую антиоксидантную и дисмутазную активность ягод LC и высокую каталазную активность ягод LB (Таблица 33).

Таблица 33. Показатели антиоксидантно-энергетического потенциала ягод годжи *in vitro* (n=6), (Me [P25-75])

Показатель	**Образец ягод годжи**	
	LB	LC
КАТ, Е/г	23,09 [20,31 – 29,49]*	13,10 [10,59 – 17,90]
СОД, Е/мг	140,05 [136,05 – 147,10]	157,84 [152,24 – 166,79]
АОЕ, Ки*мин$^{-1}$*10^{-3}	7,01 [6,02 – 7,44]*	10,85 [10,24 – 11,30]

Примечание: * – статистически значимые различия ($p<0,05$) между исследуемыми образцами.

Таким образом, компонентный состав ягод обусловливает значительную вариабельность антиоксидантной емкости. Так, ягоды LC, содержащие в значительном количестве фенольных соединений, обладают высоким антиоксидантным потенциалом, ягоды LB, характеризующиеся повышенным содержанием аскорбиновой кислоты, альфа-токоферола и селена, который путем взаимодействия с моносахаридами может увеличивать растворимость олиго- и полимерных фенолов растительного сырья, могут обладать липидоснижающей активностью (Benstoem C. et al, 2015; Sun L. et al, 2017). Наличие в ягодах спектра фитостеролов способствует проявлению как антиоксидантной, так и гиполипидемической активности.

Далее, в соответствии с Алгоритмом, был проведен эксперимент *in vivo* для сравнительного изучения биологических свойств ягод китайского и казахского происхождения на модели АГЛ, описанной в главе 5.4.1.

После завершения этапа моделирования АГЛ, крысы (n=48) были распределены на следующие группы:

Группа 1 – животные с АГЛ, потреблявшие стандартный рацион;

Группа 2 – животные с АГЛ, которым на протяжении 86 сут в рацион добавляли ягоды LB;

Группа 3 – животные с АГЛ, которым на протяжении 86 сут в рацион добавляли ягоды LC.

Группа интактных животных (интакт), состояла из 10 крыс, потреблявших на всех этапах эксперимента стандартный рацион вивария.

Ягоды вводили в общевиварный рацион путем 20%-ой замены углеводной составляющей (ягоды предварительно запаривали дистиллированной водой в соотношении 1:3 при температуре (50 – 55) °С, настаивали 3 ч при (22 ±2)°С). В ходе эксперимента анализировали динамику массы тела крыс. На 128 (Т1) и 186 (Т2) сут эксперимента у крыс отбирали кровь и анализировали в соответствии с выявленными маркерами модели: WBC, %LIM, %GRA, %MON, ОХС, ТГ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ХС не-ЛПНП и не-ЛПНП, ИА сыворотки крови, АОА, МДА.

При моделировании АГЛ у крыс отмечены все признаки, детально описанные в главе 5.4.1. С 100 по 186 сут наблюдения отмечена относительная стабильность массы тела крыс группы 1. У крыс групп 2 и 3 на протяжении 86 сут введение в рацион ягод не приводило к статистически значимым изменениям массы тела как относительно группы 1, так и между группами.

У крыс группы 1 после отмены проатерогенной диеты по сравнению с интактом наблюдалось на 28 сут увеличение содержания смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток в 2,2 раза и гранулоцитов на 68,5 % ($p<0,05$); на 86 сут – увеличение концентрации лейкоцитов на 25,8 % ($p>0,05$), смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток в 3,1 раза ($p>0,05$) и гранулоцитов в 2,3 раза ($p<0,05$). У крыс группы 3 на 186 сут по сравнению с интактом выявлено снижение количества гранулоцитов на 47,1 % ($p<0,05$). У крыс группы 4 на 128 сут относительно группы 1 отмечено снижение концентрация моноцитов на 18,2 % и отношения гранулоцитов к лимфоцитам на 43,2 % ($p<0,05$) (Таблица 34).

Таблица 34. Лейкоцитарная формула крови крыс (M±SD)

Показатель	Группа животных			
	4 (Интакт)	**1 (контроль)**	**2 (LB)**	**3 (LC)**
T1 (128 сут)				
WBC, 10^9/l	13,54±0,23	16,68±1,27	14,53±4,34	14,9±4,52
LYM, 10^9/l	11,08±0,26	12,27±1,83	10,7±3,91	11,78±3,35
MID, 10^9/l	0,19±0,02	**0,42±0,07***	0,27±0,07	0,25±0,11
GRAN, 10^9/l	2,48±0,17	**4,08±0,65***	3,56±0,56	2,86±1,1
%LYM	81,20±0,94	**71,33±6,34***	72,8±6,92	78,78±1,93
%MON	1,34±0,08	**2,14±0,21***	1,83±0,53	**1,75±0,32#**
%GRAN	17,46±0,92	**26,72±6,38***	24,91±6,24	19,47±1,83
GRAN/LYM	0,22±0,04	0,44±0,37	0,35±0,12	**0,25±0,03#**
T2 (186 сут)				
WBC, 10^9/l	14,36±1,48	19,30±2,04	19,34±4,99	17,05±8,09
LYM, 10^9/l	11,35±1,17	10,36±0,83	14,95±6,54	12,91±7,95
MID, 10^9/l	0,17±0,03	0,53±0,23	0,34±0,19	0,29±0,26
GRAN, 10^9/l	2,85±0,32	**7,65±0,71***	**4,05±1,76***	3,86±1,7
%LYM	79,20±1,07	63,34±7,42	73,71±17,13	72,64±11,65
%MON	0,98±0,13	2,22±0,32	1,64±0,66	1,46±0,73
%GRAN	19,80±1,02	**45,20±1,38***	24,64±17,75	25,9±12,22
GRAN/LYM	0,25±0,14	0,85±0,12	0,41±0,39	0,39±0,23

Примечание: статистически значимое отличие ($p<0,05$):

* – относительно интакта;

\# – относительно группы 1.

Биохимические исследования липидного спектра сыворотки крови (Таблица 35) позволила выявить выраженную гиперлипидемию у крыс группы 1 на 128 сут, сохраняющуюся вплоть до 186 сут. Относительно интакта на 128 и 186 сут отмечено увеличение концентрации ОХС на 60,4 % и на 46,6 % ($p<0,05$), ХС ЛПНП – на 50,8 % ($p<0,05$) и на 21,7 % ($p>0,05$), ХС не-ЛПНП и не-ЛПВП – в 2,8 и 2,5 раза ($p<0,05$). Одновременно с этим на 186 сут выявлено снижение уровня ХС ЛПВП на 16,9 % ($p<0,05$). ИА сыворотки крови крыс группы 1 достигал к 186 сут патологически значимого значения и превышал показатели интакта более чем в 2 раза. У животных с АГ выявлено статистически значимое снижение антиоксидантной емкости крови практически в 2 раза относительно интакта и повышение уровня МДА (на 128 сут на 81,3%, на 186 сут на 56,0 %), что указывает на выраженный окислительный стресс и накопление продуктов ПОЛ.

У крыс группы 2 на 128 сут отмечалась схожая с животными группы 1 динамика: увеличение уровня ОХС на 68,3 % ($p<0,05$), ХС ЛПНП на 61,9 %

($p<0,05$) и ТГ на 18,9 % ($p<0,05$) относительно интакта. При этом выявлено увеличение содержания ХС ЛПВП по сравнению с показателями интакта на 62,3 % ($p<0,05$), а у группы 1 – на 73,7 % ($p<0,05$). На 186 сут установлена положительная динамика для крыс группы 2, характеризующаяся снижением концентрации ОХС на 19,8 % ($p<0,05$) и ХС ЛПНП на 16,4 % ($p>0,05$), ХС не-ЛПНП и не-ЛПВП на 45,3 % ($p<0,05$) при повышении уровня ХС ЛПВП на 48,1 % относительно показателей животных группы 1. Такое соотношение ХС ЛПНП и ХС ЛПВП приводило к статистически значимому снижению ИА сыворотки крови крыс группы 2 относительно значения животных группы 1 до 60 % ($p<0,05$).

Таблица 35. Биохимические показатели сыворотки крови экспериментальных крыс, характеризующие липидный обмен и ПОЛ (M±m)

Показатели	Группа животных			
	4 (Интакт)	**1 (контроль)**	**2 (LB)**	**3 (LC)**
Т1 (128 сут)				
ОХС, ммоль/л	1,64±0,20	2,63±0,11*	2,76±0,11*$^{+}$	1,47±0,06$^{\#+}$
ТГ, ммоль/л	1,75±0,32	2,18±0,47	2,08±0,18	1,79±0,28
ХС ЛПНП, ммоль/л	0,63±0,03	0,95±0,04*	1,02±0,15*$^{+}$	0,61±0,07$^{\#+}$
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,61±0,05	0,57±0,09	0,99±0,07*$^{\#+}$	0,56±0,08
ХС не-ЛПНП и не-ЛПВП, ммоль/л	0,40±0,13	1,10±0,03*	0,76±0,09*$^{+}$	0,32±0,09$^{\#,+}$
ИА	1,68±0,15	3,01±0,03*	2,03±0,17$^{\#}$	1,72±0,30$^{\#}$
МДА, мкмоль/л	0,512±0,037	0,928±0,085*	0,686±0,041$^{\#}$	0,514±0,012*$^{,\#}$
ОАЕ, Ки*мин$^{-1}$*10^{-3}	1,390±0,031	0,657±0,028*	0,945±0,036*$^{\#}$	0,951±0,054*$^{\#}$
Т2 (186 сут)				
ОХС, ммоль/л	1,76±0,11	2,58±0,17*	2,07±0,29	2,06±0,21
ТГ, ммоль/л	1,38±0,11	1,06±0,32	1,42±0,30	1,40±0,12
ХС ЛПНП, ммоль/л	0,60±0,04	0,73±0,05	0,61±0,09	0,90±0,17*$^{+}$
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,65±0,05	0,54±0,03*	0,80±0,06$^{\#}$	0,97±0,08*$^{\#}$
ХС не-ЛПНП и не-ЛПВП, ммоль/л	0,51±0,04	1,28±0,14*	0,70±0,17$^{\#}$	0,23±0,09$^{\#}$
ИА	1,57±0,07	3,34±0,28*	2,07±0,13$^{\#}$	1,58±0,49$^{\#}$
МДА, мкмоль/л	0,473±0,025	0,738±0,041*	0,598±0,039*$^{\#}$	0,495±0,027$^{\#}$
ОАЕ, Ки*мин$^{-1}$*10^{-3}	1,501±0,037	0,836±0,021*	0,969±0,034*	0,907±0,037*

Примечание: статистически значимое отличие ($p<0,05$):

* – относительно интакта;

\# – относительно группы 1.

У крыс группы 2 по сравнению с группой 1 на 128 и 186 сут отмечено статистически значимое снижение концентрации МДА на 26,1 % и 19,0 % при увеличении АОА на 43,8 % и на 15,9 %. Относительно интакта у крыс этой группы

на 128 сут наблюдали статистически значимое снижение АОА на 32,0 %, на 186 сут – увеличение содержания МДА на 26,4 % при снижении АОА на 35,4 %.

У крыс группы 3 по сравнению с группой 1 на 128 сут выявлено статистически значимое снижение уровня ОХС на 44,1 %, ХС ЛПНП на 35,8 %, ХС не-ЛПНП и не-ЛПВП – до интактных значений (Таблица 35). Интересно отметить, что у крыс группы 3 на 186 сут концентрация ОХС была соотносима со значениями крыс группы 2, при этом относительно интакта и контроля статистически значимо повышался уровень ХС ЛПВП – до 50 %. ИА сыворотки крови крыс группы 3 на 128 и 186 сут был наименьшим среди всех групп сравнения. Этот показатель снижался более чем на 50 % относительно группы 1 и достигал значений интакта. У животных группы 3 на 128 сут относительно группы 1 отмечено снижение содержания МДА на 44,6 % ($p<0,05$) и повышение АОА на 44,8 % (относительно интакта АОА была снижена на 31,6 %, $p<0,05$). На 186 сут концентрация МДА крови крыс группы 3 снижалась на 32,9 % относительно группы 1, АОА снижалась относительно интакта на 40%.

Таким образом, в результате проведенного эксперимента можно сделать следующие выводы. Ягоды годжи (как LB, так и LC) нивелируют последствия гиперлипидемии. При этом ягоды LB за счет высокого содержания витаминов С и Е, фитостеролов и фитостанолов (в т.ч. додекановой кислоты), способствуют снижению выраженности окислительного стресса и выраженному увеличению отношения липопротеинов высокой плотности к общему холестерину (выше чем у интактных крыс более чем на 60 %), подобные эффекты также показаны в исследованиях Cheng Y. et al (2011), Хучиева М. А. с соавт. (2011), Wojcieszek J., Kwiatkowski P., Ruzik L. (2017). Ягоды LC характеризуются выраженным гиполипидемическим действием. Уже через 28 суток после начала скармливания ягоды LC способствовали снижению концентрацию общего холестерина (на 44%) за счет уменьшения содержания атерогенных фракций липопротеинов. Данный эффект может быть обусловлен значительным содержанием фенольных соединений, ингибирующих образование окисленных форм атерогенных классов липопротеинов (Pai P. G. et al, 2013; Basu A., Rhone M., Lyons T. J, 2010), катаболизм

которых существенно затруднен при липидных сбоях. Результаты эксперимента опубликованы в статье Чернухи И.М. с соавт. (2020).

Результаты изучения биологических эффектов биомассы клеток диоскореи дельтовидной

Штаммы суспензионной культуры клеток диоскореи дельтовидной (ИФР-ДМ-05-03) содержат порядка 10 % от сухой массы клеток фуростаноловых гликозидов, что на порядок выше их среднего содержания в интактных растениях. Суммарное содержание протодиосцина и дельтозида у диоскореи дельтовидной в среднем варьирует в пределах 3 – 5 % от сухой массы клеток, а соотношение протодиосцин/дельтозид составляет в основном 60/40. Одними из главных биологических эффектов данного класса гликозидов являются липидоснижающая и антиоксидантная активности (Da-yun S. et al., 2004; Cho W.C.S. et al., 2006; Ханды М. Т. с соавт., 2016).

В соответствии с Алгоритмом проводили исследования *in vitro* DDW, для чего готовили CO_2-экстракт, содержащий 10 % высушенной клеточной биомассы. Установлено, что AOE исследуемого образца составила 718,4 мкмоль-экв дигидрокверцетина/л по методу FRAP и 664,2 мкмоль-экв Trolox/л по методу ORAC (Таблица 36). Полученные данные соотносятся с результатами, полученными Ojimelukwe P. с соавт. (2014) и свидетельствуют о значительной антиоксидантной емкости DDW. Сделано предположение, что как пищевой ингредиент DDW будет способствовать снижению окислительного стресса и усилению эффектов эндогенных антиоксидантов.

Таблица 36. Значения AOE биомассы DDW

Разведение	**AOE, с учетом разведения**	
	ORAC, мкмоль экв-Trolox/л	**FRAP,** мкмоль экв-дигидрокверцетина/л
1:1	–	718,4
1:99	664,2	–

В эксперименте *in vivo* для изучения биологических свойств DDW использована модель ДЛ, детально описанная в главе 5.4.1. Крыс предварительно распределяли на группы:

Группа 1 – интакт (n=10);

Группа 2 – контроль (n=10);

Группа 3 – животные (n=10), которым на протяжении 13 сут *per os* вводили DDW в виде 10%-ной суспензии 1 мл/кг массы тела.

На 14 сут крысам групп 2 и 3 вводили Тритон X100. На протяжении эксперимента измеряли массу тела крыс. На 15 сут в крови крыс, в соответствии с выявленными для ДС маркерами, определяли WBC, %LIM, %GRA, ОХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ИА сыворотки крови. Кроме того, с целью оценки антиоксидантного потенциала DDW исследовали кровь (АОА, МДА, восстановленный глутатион) и печень (АОА, МДА) крыс.

Установлено, что введение крысам DDW не влияло на их поведение, состояние кожи и шерстного покрова, видимых слизистых оболочек, различий в потреблении корма и воды отмечено не было, общее состояние крыс соответствовало физиологической норме. Динамика массы тела животных представлена Рисунке 37.

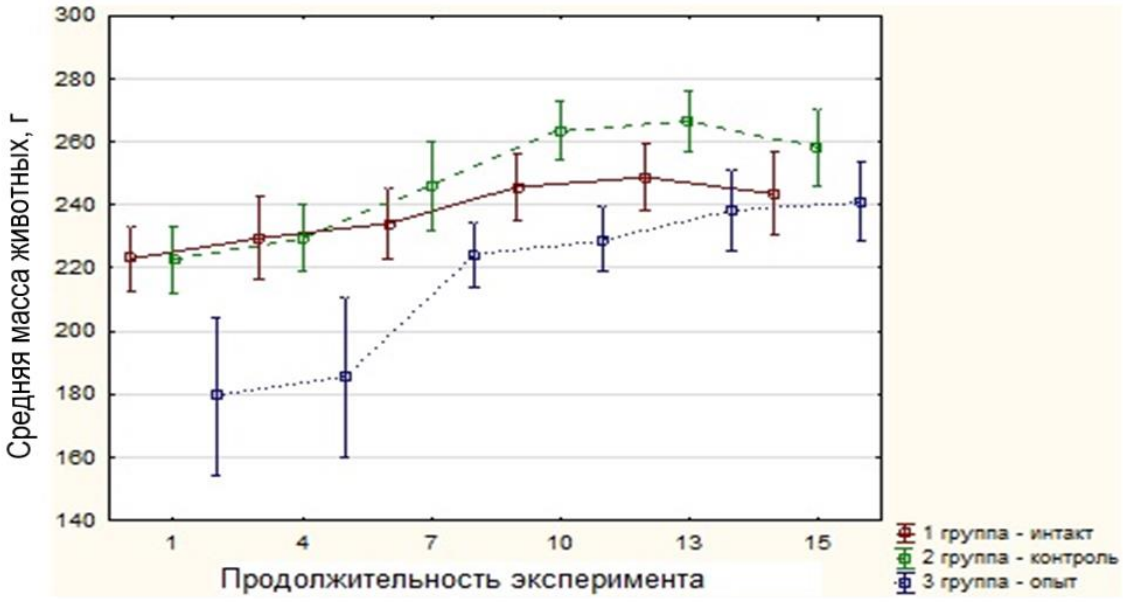


Рисунок 37 – Динамика изменения массы крыс в процессе проведения эксперимента

На протяжении всего эксперимента отмечено увеличение массы животных всех групп. Отмечено, что наиболее интенсивно увеличивали массу тела крысы группы 3. В период с 13 по 15 сут у крыс групп 1 и 2 наблюдалась тенденция к

снижению массы тела (рисунок 30). Привесы в конце эксперимента относительно 0 сут у крыс группы 3 составили 34,4 %, у крыс группы 2 – 16,0 %, у интактных животных – 11,3 %.

У крыс группы 1 через 24 ч после введения детергента относительно интакта выявлено увеличение содержания лейкоцитов на 33,2% (p=0,031), смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток в 2,2 раза (p=0,016), гранулоцитов в 2,3 раза (p=0,001) и относительного содержания моноцитов на в 1,4 раза (p=0,020). У крыс группы 3, получавших DDW, относительно интакта отмечено увеличение смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток на 41,6 % (p=0,003); относительно группы 2 – снижение абсолютного и относительного содержания гранулоцитов на 44,6 % (p=0,012) и 27,5 % (p=0,038) при увеличении относительного содержания лимфоцитов на 11,3 % (p=0,031). Соотношение гранулоцитов к лимфоцитам в крови крыс группы 3 снижался на 38,0 % (p=0,040) относительно группы 1, соответствуя значениям интакта (Таблица 37).

Таблица 37. Лейкоцитарная формула крови крыс через 24 ч после введения индуктора (M±SD)

Показатель	**Группа животных**		
	1 (интакт)	**2 (контроль)**	**3 (DDW)**
WBC, 10^9/l	6,41±0,83	**9,59±0,85***	7,32±0,86
LYM, 10^9/l	4,83±0,69	6,11±0,75	5,51±0,7
MID, 10^9/l	0,06±0,01	**0,13±0,02***	0,11±0,03
GRAN, 10^9/l	1,34±0,17	**3,09±0,33***	**1,68±0,18#**
LYM, %	75,87±2,38	66,72±2,85	**75,20±1,22#**
MON, %	0,94±0,07	**1,33±0,12**	**1,61±0,15***
GRAN, %	23,36±2,35	31,91±2,90	**23,13±1,28#**
GRAN /LYM	0,32±0,12	0,50±0,18	**0,31±0,07#**

Примечание: статистически значимое отличие (p<0,05):

* – относительно интакта;

\# – относительно группы 1.

Эти данные свидетельствуют о нивелировании DDW воспалительной реакции, возникающей в ответ на введение детергента, за счет вмешательства в рецепторно-медиаторную передачу (Miguel M., 2011).

Результаты анализа липидов сыворотки крови крыс (Таблица 38) выявили, что у животных группы 2 относительно группы 1 увеличивалось содержание ОХС на 8,2 %

(p=0,190), ХС не-ЛПНП и не-ЛПВП на 26,7 % (p=0,730), ХС ЛПНП на 17,1 % (p=0,063), индекса атерогенности сыворотки крови на 13,3 % (p=0,100). У крыс группы 3 отмечено низкое содержание ТГ относительно группы 1 на 31,2 % (p=0,008), относительно группы 2 – на 32,6 % (p=0,016), ХС не-ЛПНП и не-ЛПВП относительно группы 2 – на 29,3 % (p=0,016). Индекс атерогенности сыворотки крови животных группы 3 был ниже показателя группы 2 на 18,4 % (p=0,111).

Таблица 38. Липидный спектр сыворотки крови крыс с ДЛ

Показатель	**Группа животных**		
	1 (интакт)	**2 (контроль)**	**3 (DDW)**
ОХС, ммоль/л	2,01±0,24	2,19±0,06	1,97±0,06
ТГ, ммоль/л	1,89±0,35	1,93±0,47	**1,30±0,02*** #
ХС ЛПНП, ммоль/л	0,68±0,08	0,82±0,09	0,57±0,01
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,87±0,12	0,82±0,04	0,88±0,05
ХС не-ЛПНП и не-ЛПВП, ммоль/л	0,55±0,23	0,75±0,05	**0,53±0,03**#
ИА	1,37±0,21	1,58±0,17	1,29±0,09

Примечание: статистически значимое отличие (p<0,05):
* – относительно интакта;
# – относительно группы 1.

Анализ показателей антиоксидантного статуса (Таблица 39) животных группы 2 позволил выявить увеличение концентрации МДА в крови относительно показателя группы 1 (на 31,4 %, p=0,027).

Таблица 39. Показатели антиоксидантной системы крыс

Показатель	**Группа животных**		
	1 (интакт)	**2 (контроль)**	**3 (DDW)**
АОА крови, Ки ×мин(-1)*10^(-3)	2,379±0,136	2,182±0,219	**1,959±0,23***
МДА крови, мкмоль/л	0,671±0,176	**0,978±0,233***	**1,398±0,335*** #
Восстановленный глутатион крови, ммоль/л	0,728±0,058	0,722±0,078	**1,856±0,23*** #
АОА печени, Ки ×мин(-1)*10^(-3)	1,332±0,174	1,059±0,055	**0,501±0,216***
МДА печени, мкмоль/л	0,505±0,01	0,519±0,02	0,910±0,110

Примечание: статистически значимое отличие (p<0,05):
* – относительно интакта;
# – относительно группы 1.

В крови крыс группы 3 отмечено снижение общей антиоксидантной активности (на 17,5 %, p<0,001) при увеличении концентрации МДА и восстановленного глутатиона относительно группы 1 (на 52,0 %, p<0,001 и на 60,8%, p<0,001) и группы 2 (на 29,4 % p=0,044 и на 61,1%, p<0,001).

Антиоксидантная активность печени крыс группы 3 снижалась относительно группы 1 в 1,5 раза (p=0,024) (таблица 37). Полученные данные свидетельствуют о том, что количество вносимой биомассы DDW не приводило к значимым антиоксидантным эффектам, т.к. известно, что снижение общей антиоксидантной активности и повышение уровня малонового диальдегида обусловлено значительным увеличением генерации активных форм кислорода и активацией процессов липопероксидации.

Таким образом, в результате проведенного эксперимента *in vivo* установили, что введение в рацион крыс модели ДС и 10%-ной суспензии DDW (1 мл/кг массы тела) на протяжении 14 сут оказывало 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 %) эффекты.

6.2. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АЛГОРИТМА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Результаты изучения биологических эффектов БАВ_1

В соответствии с Алгоритмом для изучения очищенного гидролизата куриного белка (БАВ_1) были использованы спектрофотометрические и спектрофлуорометрические методы.

Первым этапом исследования являлась традиционная гель-фильтрация на колонке с Sephadex G-10. Полученные результаты (рисунок 38), свидетельствуют о присутствии двух УФ-поглощающих компонентов: первый компонент, элюировавшийся с колонки «внешним объемом», очевидно, содержит фрагменты белков (полипептиды молекулярной массой 5–10 кДа); второй элюировавшийся компонент в виде широкого пологого пика, вероятно, представлен рядом низкомолекулярных соединений.

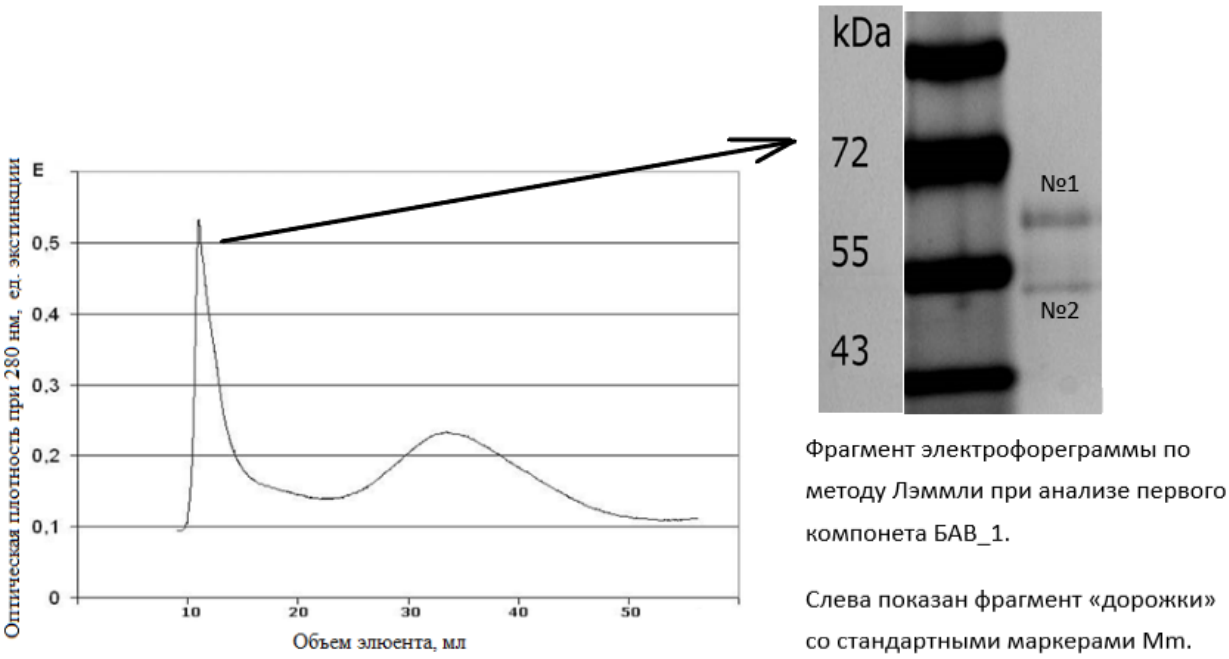


Рисунок 38 - Результаты фракционирования БАВ_1

Электрофоретический анализ материала первого компонента позволил выявить в нем присутствие, как минимум, двух белковых фракций с молекулярной массой 55 кДа (рисунок 36). В рамках протеомного изучения БАВ_2 была поведена масс-спектрометрическая идентификация выявленных белковых фракций. Установлено, что обе фракции являются изоформами кератинов.

Сравнительный анализ с помощью хроматографии высокого разрешения трех фракций второго компонента, собранных при гель-фильтрации показал присутствие в составе второго компонента БАВ_1 низкомолекулярных соединений, различающихся по свойствам. Фракция № 1 соответствовала 31 мл элюента, фракция № 2 – 34 мл, а фракция № 3 – 38 мл, т.е. они располагались на восходящем плече, на вершине и на нисходящем плече пика оптической плотности, образованного вторым компонентом.

Из сравнения эти данных видно, что во фракциях № 2 и № 3 в качестве доминирующего присутствовал общий материал, элюировавшийся на 10,2 мин, который отсутствовал во фракции № 1. При этом минорные соединения, элюировавшиеся в диапазоне 8,7 – 9,6 мин, у всех трех фракций были разные.

Далее был проведен сравнительный УФ-спектрометрический анализ раствора БАВ_1, двух его компонентов и раствора сывороточного альбумина (как пример типичного белка). Анализ результатов выявил отсутствие типичного для белков (на примере альбумина) максимума поглощения при длине волны 280 нм, что свидетельствует о пониженном содержании циклических аминокислот в составе БАВ_1 и его компонентах. При этом спектр флуоресценции раствора БАВ_1 (Рисунок 39) свидетельствует о присутствии в образце тирозина (мах. – 303 нм) и триптофана (мах. 338 нм).

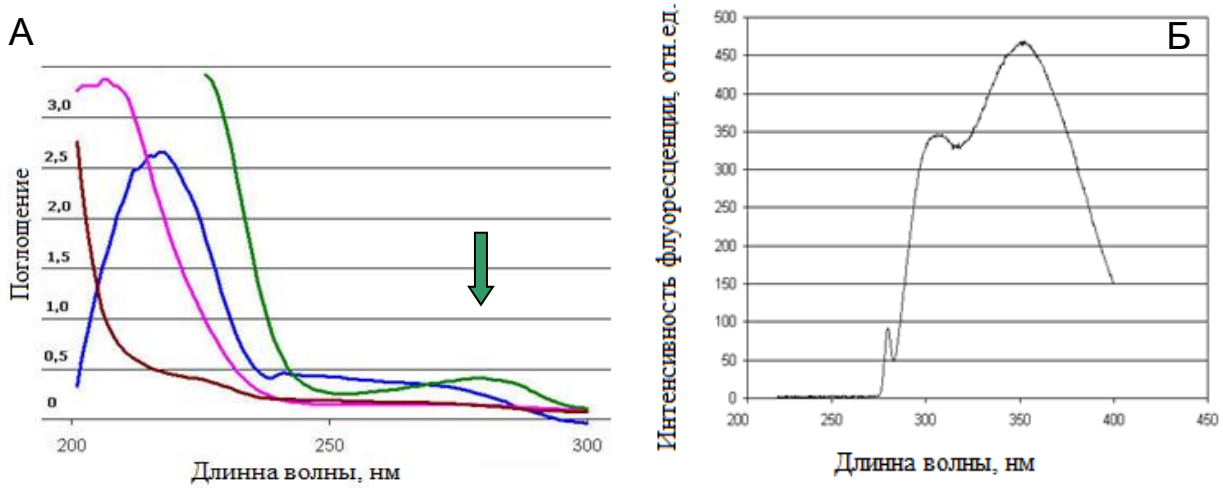


Рисунок 39 – Результаты УФ-спектрометрического анализа (А) и спектра флуоресценции раствора БАВ_1 (Б): синий спектр – раствор БАВ_1, фиолетовый спектр – первый компонент, коричневый спектр – второй компонент, зеленый спектр – раствор сывороточного альбумина. Стрелкой показан максимум при 280 нм

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить в продукте БАВ_1 остаточные количества изоформ кератинов при значительном содержании полипептидов с Mm 5 – 10 кДа и менее 2,5 кДа, коротких пептидов и свободных аминокислот, потенциально обладающих биологической активностью.

Для изучения биологических эффектов БАВ_2 *ex vivo* были использованы экспериментально обоснованные методы определения пролиферативных, цитопротективных и гипотензивных свойств.

Показан достоверный цитопротективный эффект БАВ_1 при концентрациях 0,25 – 2,0 мг/мл и 0,5 – 2,0 мг/мл на модели цитотоксичности, индуцируемой ионами кадмия и ионами ртути; в диапазоне концентраций 0,25 – 2,0 мг/мл на модели ААРН-индуцированной цитотоксичности (Рисунок 40 А, Б, В). Стоит отметить, что цитопротективный эффект превышает пролиферативный при соответствующих концентрациях гидролизата (Рисунок 40, Г).

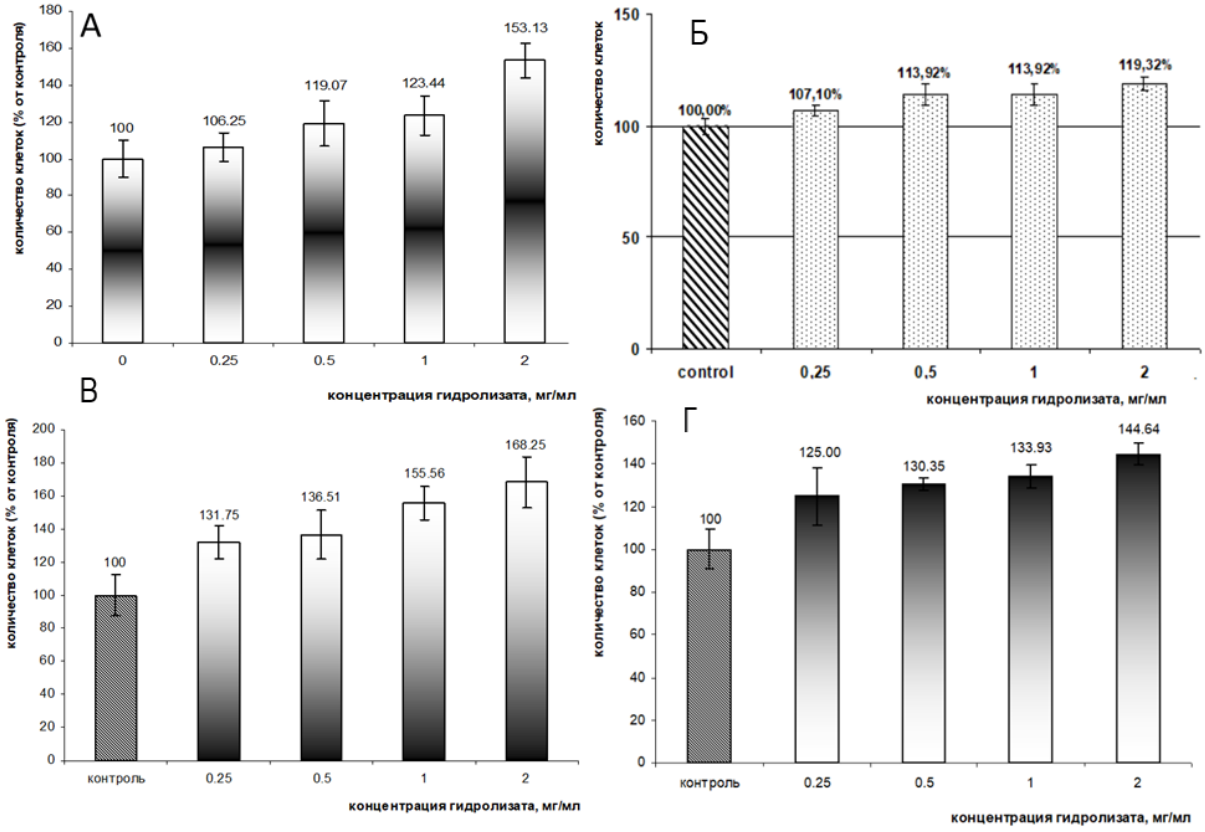


Рисунок 40 – Результаты *ex vivo* исследования БАВ_1: пролиферативный эффект на клетки НТ-29. Условные обозначения:(А) и цитопротективное действие на клетки НТ-29 при ААРН-индуцированной цитотоксичности (Б), при содержании в среде ионов кадмия (10 мкМоль/л) (В) и ионов ртути (2,5 мкМоль/л) (Г) после 18 ч инкубации.

Подобным образом на модели цитотоксичности были изучены 3 выделенные фракции БАВ_1. Выявлено, что фракции № 1 и № 2 обладали достоверным цитопротективным действием при всех исследованных

концентрациях (0,25 – 1,0 мг/мл). Наиболее выраженное цитопротективное действие в отношении ионов ртути было выявлено для самой высокой концентрации компонентов в питательной среде – 2,0 мг/мл. При этом количество жизнеспособных клеток было достоверно выше контрольных значений и составило 129,8 ± 3,97 % и 131,7 ± 1,85 % для фракций № 1 и № 2 по сравнению с контрольными значениями (100 ± 5,83 % при внесении 1 мкМоль/л ионов ртути). При внесении 2,5 мкМоль/л ионов ртути цитопротективный эффект для фракции № 1 составил 2132,8 ± 3,97 % и для фракции № 2 – 134,0 ± 5,85 %. Фракция № 3 не оказывала значимых эффектов на цитотоксичность, индуцированную ионами ртути.

В отношении цитотоксичности, индуцируемой ААРН, достоверно значимыми цитопротективными свойствами обладала фракция № 1. Наиболее выраженное цитопротективное действие в отношении ААРН было выявлено для концентрации компонентов в питательной среде 1,0 мг/мл, составившее 112,6 ± 1,45 % по сравнению с контролем (100 ± 1,26 %). Фракция № 2 также показала цитопротективный эффект в отношении азосоединения, который составил 111,1 ± 1,22 % по сравнению с контролем. Фракция № 3 не оказывала цитопротективного эффекта при всех исследованных концентрациях.

Также для определения гипотензивных свойств БАВ_1 *in vitro* использована экспериментально обоснованная в главе 5.1.2 модель ингибирования АПФ.

Результаты, представленные в виде зависимости процента ингибирования АПФ от десятичного логарифма фактора разбавления гидролизата (Рисунок 41), были использованы для определения методом линейной интерполяции концентрации БАВ_1 (мг/мл), при которой наблюдается 50%-ое ингибирование активности АПФ (IC50).

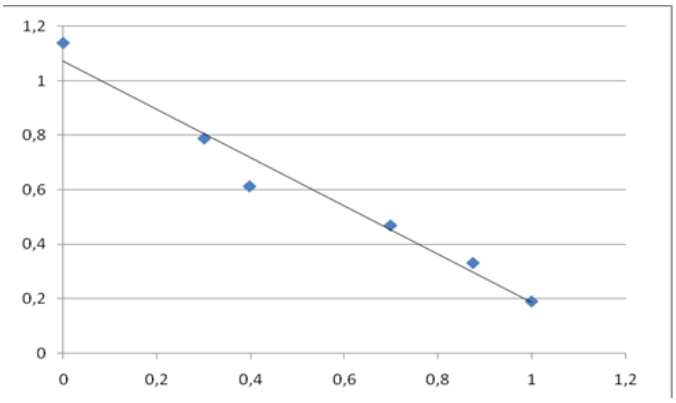


Рисунок 41 – Зависимость остаточной активности АПФ и логарифма концентрации гидролизата куриного белка при 30 мин инкубации. По оси абсцисс – логарифм разведения гидролизата; по оси ординат – остаточная активность фермента, %

В результате было установлено, что БАВ_1 обладает гипотензивным действием при концентрации 1,1 мг/мл в реакционной среде.

Для качественного определения гипотензивной активности проводили пересчет в единицы нг экв. каптоприла/г сухого веса продукта, предварительно определяя влажность и сухой вес гидролизата. Экспериментальное значение гипотензивной активности гидролизата составило 4,30 нг экв. каптоприла/г сухого веса продукта.

Таким образом, на примере БАВ_1 установлена эффективность применения разработанного Алгоритма для определения оптимальной методологии исследований и подтверждена адекватность использования БАВ_1 в качестве дополнительного функционального ингредиента для разработки специализированного мясного продукта для коррекции патологий центральной и периферической нервной системы.

Результаты изучения биологических эффектов БАВ_2

Ввиду того, что биологическую активность веществ белковой природы в клеточной среде определяет их структура, для выявления биоактивных компонентов БАВ_2 применен количественный протеомный анализ с помощью iTRAQ.

В ходе протеомного анализа для тимуса, лимфатических узлов, селезенки и БАВ_2 было идентифицировано 1025, 1248, 970 и 746 белков соответственно. Количественно определено 720 (96 %) белков. Сопоставление идентифицированных соединений БАВ_2 с 1005 соединениями экстракта тимуса, 948 соединениями экстракта селезенки и 1230 соединениями экстракта лимфатических узлов выявило, что порядка 580 белков присущи иммунным органам, из которых 102, 121 и 211 белков были уникальными для селезенки, тимуса и лимфатических узлов (рисунок 42).

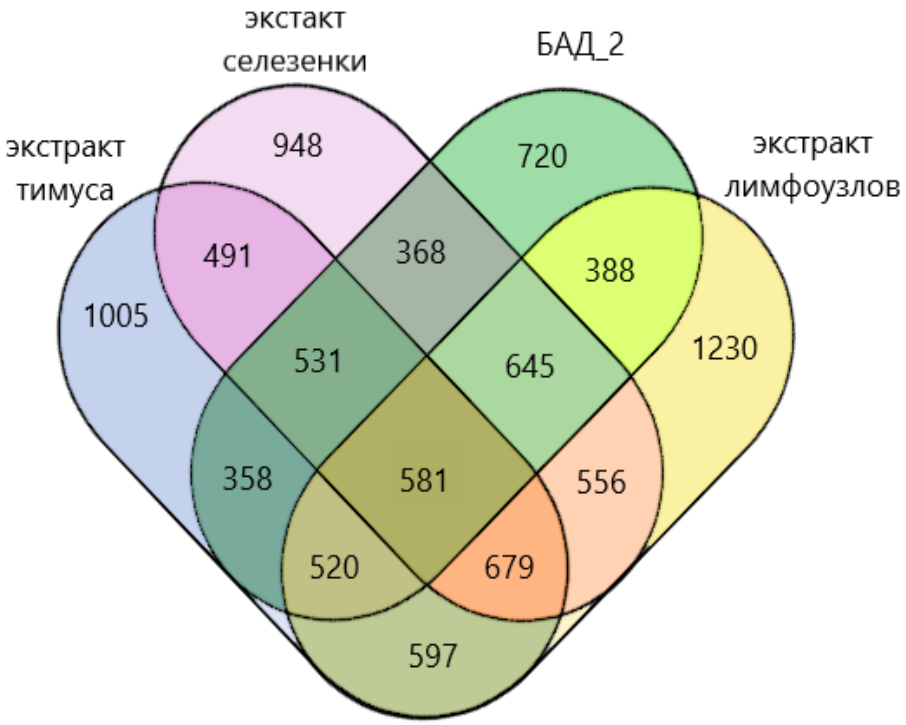


Рисунок 42 – Диаграммы Венна пептидов, идентифицированных для БАВ_2 и экстрактов иммунных органов свиньи

Выявлено 128 (17 %) не охарактеризованных белков, 112 (15 %) структурных белков (рибосомальных, протеасомальных, ядерных пор и пр.), 60 (8 %) различных ферментов и порядка 400 функциональных белков (>50 %), включенных в механизм иммунного ответа, стимулирующих метаболические процессы в организме и проявляющих антиоксидантные и противовоспалительные свойства. Среди идентифицированных белков 222 (30 %), 116 (16 %), 74 (10 %), 70 (1 %), 49 (7 %) и 40 (5 %) белков состояли из 1, 2, 3, 4, 5 и не более 6 уникальных пептидов соответственно.

В Приложении В представлены некоторые функционально значимые белки, идентифицированные в результате биоинформационного анализа (оценено 370 соединений БАВ_2).

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 согласуется с ранее полученными нами данными (Fedulova L.,2018; Ахремко А. Г., 2019). Важно отметить, что нами выявлены пептид α-тимозина (C3VVV8_PIG), rho GDP-dissociation inhibitor 1 (ARHGDIA)+ Acetyl (Protein N-term), которые совместно способны активировать фагоцитарную функцию нейтрофильных гранулоцитов, ингибировать цитотоксические Т-лимфоциты и ускорять позднюю дифференцировку лимфоцитов.

В соответствии с Алгоритмом проведены исследования биокоррегирующих свойств БАВ_2 – тимической активности – методом *in vitro*; мембранотропной – методом *ex vivo*, иммуномодулирующей – методом *in vivo*.

В результате проведения эксперимента *in vitro* показано, что при воздействии трипсина на тимоциты (контроль) количество РОК (розеткообразующих клеток) снижалось в среднем более чем на 75 % относительно интактных тимоцитов (норма).

При добавлении БАВ_2 и фракции <30 кДа в концентрации 20 нг/мл во всех анализируемых пробах (суспензии тимоцитов) наблюдалось восстановление количества РОК по отношению к контролю: у животного № 1 количество РОК в первой и третьей пробах увеличивалось более чем на 40%, во второй – на 62,5 %; у животного № 2 в первой и второй пробах – более чем в 2 раза (на 114 % и 125 %), в третьей пробе – более чем в 3 раза (на 280 %); у животного № 3 количество РОК восстанавливалось на 83,3 %, 71,4 % и 117 % в первой, второй и третьей пробах соответственно; у животного № 4 количество РОК восстанавливалось в первой и второй пробах более чем на 62,5 % и 91,7 %, в третьей пробе значение составило

150,0 %; у животного № 5 в первой и второй пробе – в среднем на 138,5 % и 125 %, в третьей пробе – на 64,3 %.

Изучение специфической активности препарата экстракта тимуса показало, что восстановление количества РОК у животного № 1 по отношению к контролю составило в первой пробе 36 %, во второй и третьей пробе – более 45 %; у животного № 2 в первой, второй и третьей пробах – на 67 %, 80,0 % и на 97,8 %; у животного № 3 в первой пробе – более чем на 40 %, во второй и третьей пробах – до 60 %; у животного № 4 в первой, второй и третьей пробах – на 40,7 %, 49,1 % и 45,7 % соответственно; у животного № 5 в первой пробе – на 66,1 %, во второй – на 80,6 % и в третьей – на 62,1 %.

Таким образом, установлено, что БАВ_2 и фракция ≤30кДа обладает выраженными функциональными эффектами на иммунные клетки: в реакции РОК тимическая активность была соотносима с фармацевтической субстанцией – экстрактом вилочковой железы. Так, при снижении среднеарифметического числа РОК на фоне повреждения их мембран трипсином при более чем 50% случаев количество РОК восстанавливалось не менее чем на 40 %.

В результате анализа *ex vivo* показано достоверное увеличение стабильности мембран гепатоцитов при внесении в клеточную культуру образцов БАВ_2 и фракции <30 кДа: мембранотропная активность достигала значений 158,3 % и 151,7 % соответственно.

Исследование биологических свойств БАВ_2 и фракции *in vivo* проведено на экспериментально обоснованной модели ИДС с участием крыс spf-категории – самцов и самок (n=80), разделенных на 8 групп:

Группа 1 – интакт (самцы);

Группа 2 – модель ИДС (самцы);

Группа 3 – БАВ_2 (самцы);

Группа 4 – фракция <30 кДа (самцы);

Группа 5 – интакт (самки);

Группа 6 – модель ИДС (самки);

Группа 7 – БАВ_2 (самки);

Группа 8 – фракция <30 кДа (самки).

На 25 сут проводили исследование крови на следующие показатели: WBC, LIM, GRA, MON, их соотношения, CD4+, CD8+); IgA, IgM, IgG; IL-2, IL-4, IL-6. Дополнительно определяли компоненты комплемента C5, C3, C4, C1q.

В результате проведенного эксперимента у животных группы 2 по сравнению с группой 1 выявлено снижение WBC на 98,1 %, LIM – на 99,7 %, %MON на 22,6 %, при повышении GRAN на 98,5 %, понижение кластеров дифференцировки CD4+ на 26,6 %, повышении CD8+ на 107,9 %. У крыс группы 6 по сравнению с группой 5 отмечено снижение количества WBC на 96,4 %), LIM на 99,8 %, %MON на 25,9 % при повышении GRAN на 80,6 %, снижении кластеров дифференцировки CD4+ на 53,8 %. Все это подтверждает развитие ИДС у крыс групп 2 и 6.

Также у этих групп выраженность иммунных нарушений наблюдалась у самцов в большей степени, чем у самок (таблица 40).

Таблица 40. Результаты гематологического и цитометрического анализа крови крыс с ИДС (M±SD)

Показатели	**Группа животных**							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
WBC, 10^9/л	7,30±0,36	0,14±0,01*	0,59±0,05*	0,65±0,05*	4,39±0,13	0,14±0,01#	1,32±0,12#	0,58±0,03#
LYM, 10^9/л	5,74±0,29	0,02±0,01*	0,36±0,04*	0,44±0,04*	3,95±0,13	0,01±0,01#	0,81±0,08#	0,39±0,04#
MID, 10^9/л	0,37±0,06	0,01±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,36±0,01	0,01±0,01	0,06±0,01	0,01±0,01
GRAN, 10^9/л	1,19±0,05	0,01±0,01	0,12±0,01	0,12±0,02	0,61±0,01	0,01±0,01	0,41±0,04	0,07±0,01
%LYM	84,59±3,88	86,34±7,91	81,70±3,50	75,79±5,60	89,00±2,45	90,52±3,09	77,19±3,72#	82,17±7,83
%GRAN	1,41±0,34	2,80±0,29 *	5,91±1,22 *	0,48±0,19 *	1,23±0,41	2,24±0,79 #	2,85±0,63 #	0,39±0,17#
%MON	14,02±1,98	10,86±0,73 *	12,39±1,84	23,73±5,70	9,77±0,63	7,24±0,52 #	19,97±4,86#	17,44±3,80#
CD4, %	39,23±2,39	28,78±6,71 *	25,90±4,42 *	28,70±7,14 *	41,02±4,31	18,95±4,05#	27,68±7,29#	27,08±4,52#
CD8, %	12,61±1,41	26,20±3,52 *	22,35±4,67 *	20,31±3,94 *	12,65±3,32	15,40±5,21	18,94±4,47	23,89±4,83 #

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно группы 1;
– $p < 0,05$ относительно группы 5.

У животных группы 3 по сравнению с животными группы 2 выявлено менее выраженное развитие нарушений в показателях иммунной системы. Отмечено достоверное ($p<0,05$) повышение WBC в 4,2 раза, LIM в 18,0 раз при повышении %GRAN на 110,0 % при отсутствии достоверных изменений относительного содержания моноцитов, CD4+ и CD8+ (таблица 41). Еще более существенные позитивные изменения гематологических показателей были отмечены у животных

группы 4 по сравнению с животными группы 2. Выявлено достоверное ($p<0,05$) повышение WBC в 4,6 раза, LIM в 22,0 раза, низкое содержание %GRAN (на 82,9 % относительно группы 2), увеличение %MON (на 118,0 %) при отсутствии изменений в отношении кластеров дифференцировки CD4+ и CD8+. В группах 3 и 4 по сравнению с группой 2 отмечено достоверное ($p<0,05$): увеличение количества эритроцитов (на 8,5 % и 13,4 %) и тромбоцитов (в 6,2 раза и 18,1 раза). Повышение гемоглобина (на 17,6 %, $p<0,05$) и гематокрита (на 21,5 %, $p<0,05$) выявлено только в группе 4 по сравнению с группой 2 (Таблица 40).

При сравнении показателей крыс-самок групп 7 и 8 с показателями животных группы 6 выявлено менее выраженное развитие нарушений в показателях иммунной системы. Установлено достоверное ($p<0,05$) повышение WBC в 8,3 раз и 3,6 раза, LIM в 81,0 раза и 39,0 раза. В группе 7 по сравнению с животными группы 6 отмечено более низкое содержание %LIM (на 14,7 %, $p<0,05$) с одновременно более высоким содержанием %MON (на 175,8 %, $p<0,05$) при отсутствии достоверных изменений содержания %GRAN, CD4+ и CD8+. В то же время у животных группы 8 по сравнению с группой 6 выявлено более низкое содержание %GRAN (на 82,6 %, $p<0,05$), увеличение содержания %MON (на 140,9 %, $p<0,05$) и CD8+ (на 55,1 %, $p<0,05$) при отсутствии достоверных изменений в отношении содержания %LIM и кластеров дифференцировки CD4+ (Таблица 40).

У крыс-самок групп 7 и 8 по сравнению с группой 6 отмечено увеличение количества тромбоцитов в 66,9 раз и 45,4 раз соответственно ($p<0,05$). При этом у групп 7 и 8 по сравнению с группой 6 возрос как средний объем тромбоцита (на 68,7 % и 41,7 %, $p<0,05$), так и распределение тромбоцитов (на 55,8 % и 39,5 %, $p<0,05$) (Таблица 41).

У крыс-самцов группы 2 по сравнению с животными группы 1 выявлено существенное уменьшение IL-2 на 84,9 %, IgG на 54,3 %; IgM на 83,5 %; C1q на 25,8 %; C3 на 14,1 %; C4 на 45,8 % и C5 на 89,9 %, при одновременном увеличением IL-4 на 46,9 % и IL-6 на 80,0 %. У крыс-самцов группы 3 по сравнению с группой 2 установлено достоверное ($p<0,05$) увеличение IL-2 (в 2,2 раза) при уменьшении содержания C3 (на 14,6 %). При этом у крыс-самцов группы 4 по сравнению с

группой 2 выявлено более существенное увеличение, чем у крыс группы 3, IL-2 в 3,0 раза, IgM в 2,9 раз, C1q в 1,14 раза, C5 в 2,6 раза, тогда как у крыс группы 4 по сравнению с группой 2 наблюдалось уменьшение содержания IL-4 (на 35,7 %), IL-6 (на 68,7 %) и C3 (на 15,2 %) (Таблица 41)

Таблица 41. Результаты иммуноферментного анализа крови крыс с ИДС

Показатель	**M±m**	**Группа животных**							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
IL-2, пг/мл	M	324,60	48,73	104,80	146,79	262,13	36,49	107,52	91,75
	±m	±44,51	±7,45 *	±9,56 *	±27,90 *	±20,35	±1,82 #	±29,84 #	±14,73 #
IL-4, пг/мл	M	32,97	48,46	44,71	31,16	37,12	34,45	26,71	17,24
	±m	±11,56	±14,78 *	±8,12 *	±10,64	±8,15	±9,86	±6,43	±3,14 #
IL-6, пг/мл	M	15,21	27,38	16,95	8,57	10,48	19,60	11,36	8,89
	±m	±1,24	±1,93 *	±8,17	±2,51 *	±2,42	±1,7 #	±2,32	±2,35
IgG, нг/мл	M	3,83	1,75	1,77	1,48	5,26	2,21	2,64	1,58
	±m	±0,68	±0,32 *	±0,39 *	±0,46 *	±1,47	±0,35 #	±0,72 #	±0,41 #
IgM, нг/мл	M	0,85	0,14	0,23	0,41	0,73	0,19	0,18	0,21
	±m	±0,04	±0,03 *	±0,15 *	±0,22 *	±0,18	±0,02 #	±0,03 #	±0,09 #
C1q, нг/мл	M	7,36	5,46	6,32	6,54	7,75	5,89	6,74	7,50
	±m	±0,51	±0,82 *	±1,01	±1,07	±1,38	±1,32	±0,85	±1,24
C3, нг/мл	M	50,64	43,49	37,14	36,89	45,01	40,73	32,51	41,45
	±m	±1,32	±1,81 *	±1,65 *	±1,97 *	±2,07	±2,78	±2,59 #	±2,79
C4, нг/мл	M	405,07	219,42	244,29	268,60	262,43	198,90	221,02	203,30
	±m	±29,46	±48,61 *	±32,97 *	±42,61*	±50,57	±48,06 #	±35,79	±39,85
C5, нг/мл	M	52,98	5,30	5,78	13,86	42,64	8,01	24,65	33,28
	±m	±10,94	±1,47 *	±1,26 *	±1,74 *	±2,52	±0,19 #	±1,53 #	±1,21#

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно группы 1;

– $p < 0,05$ относительно группы 5.

У крыс-самок группы 6 по сравнению с группой 5 отмечено достоверное ($p<0,05$), значительное снижение IL-2 на 86,1 %, IgG на 58,0 %, IgM на 73,9 %, C5 на 81,2 % при увеличении IL-6 на 87,0 %. У крыс-самок группы 7 по сравнению с группой 6 выявлено увеличение IL-2 в 2,9 раза, C5 в 3,1 раза с одновременным

уменьшением IL-6 на 42,0 % и C3 на 20,2 %. Аналогичные по направленности изменения тмечены у крыс-самок группы 8 по отношению к группе 6: увеличение IL-2 в 2,5 раза и C5 в 4,2 раза при уменьшении IL-6 на 54,6 % (таблица 41). В качестве отличий показателей группы 7 от группы 8 отмечено снижение в группе 6 IL-4 на 49,9 % ($p<0,05$) (таблица 42). Необходимо отметить, что описанные у групп 3, 4, 7 и 8 изменения содержания лейкоцитов, лимфоцитов, относительного количества гранулоцитов и моноцитов, а также кластеров дифференцировки CD4 и CD8 свидетельствуют о большей эффективности фракции <30 кДа для всех звеньев иммунной системы крыс-самцов. В то же время у крыс-самок БАВ_2 был более эффективен в отношении фагоцитарного звена лейкоцитов, а фракция <30 кДа увеличивала функциональную активность Т-клеточного звена (CD8). Поэтому использование фракции <30 кДа целесообразно при вирусной инфекции и клеточной дисплазии у самок, а также у самцов в качестве универсального иммунорегулятора и при бактериальной инфекции. При этом применение БАВ_2 возможно лишь у крыс-самок при проведении комбинированной терапии оппортунистических инфекций. Активация C5 компонента системы комплемента в большей мере при введении крысам фракции <30 кДа может свидетельствовать о способности полученных тканеспецифичных биомолекул увеличивать скорость хемоаттракции и эффективность фагоцитоза иммунокомпетентных клеток в очаге воспаления, а также ускорять цитолиз патогенных микроорганизмов.

Наиболее существенный цитокиновый дисбаланс (IL-2 и IL-6/IL-4) отмечен у группы 2. Тогда как у крыс-самцов группы 3, получавших БАВ_2 выявленанормализация соотношения интерлейкинов и более выраженный дисбаланс в продукции провоспалительных цитокинов по отношению к противовоспалительным по сравнению с группой 4. Данный факт указывает на более высокую эффективность фракции <30 кДа при хронических заболеваниях инфекционного генеза, обусловленных недостаточной активностью регуляторного звена иммунной системы (например, при сниженной активности активаторов воспаления (Denes A., Miyan J. A., 2015). Также необходимо отметить более высокую эффективность фракции <30 кДа у крыс-самцов по сравнению с БАВ_2

для стимуляции эффекторного звена иммунной системы (IgM), что может иметь значение для коррекции нарушений дифференцировки В-лимфоцитов, например, первичных иммунодефицитов с преобладанием нарушений Ig-генеза.

У крыс-самок, получавших БАВ_2, отмечено большее возрастание интенсивности продукции интерлейкинов и, как следствие, стимуляция В-лимфоцитов с образованием IgG. Тогда как у крыс-самок, получавших фракцию <30 кДа, менее выраженное повышение (по сравнению с группой 7) продукции IL-2, IL-4, IL-6 сопровождалось уменьшением синтеза IgG и компенсаторным возрастанием активности системы комплимента, прежде всего С3 и С5 компонентов.

Результаты данного эксперимента опубликованы в работах Fedulova L. V. (2019) и Басова А. А., с соавт. (2019)

Необходимо отметить, что в отличие от БАВ_2 применение фракции <30 кДа при гиперчувствительности III типа (т.е. при болезнях, сопровождающихся накоплением CIC, например, васкулите, гломерулонефрите, ревматоидном артрите), особенно у самцов, противопоказано в связи с риском усиления воспалительной реакции в очаге поражения и усугубления степени тяжести аутоиммунного заболевания.

Таким образом, установлен позитивный эффект БАВ_2 и фракции <30 кДа: 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. При этом фракция <30 кДа эффективна для коррекции регуляторных нарушений иммунной системы в одинаковой степени вне гендерной принадлежности, что позволяет рекомендовать ее в качестве универсального средства.

6.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ В СООТВЕТСТВИИ С РАЗРАБОТАННЫМ АЛГОРИТМОМ

6.3.1 РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ СМП_1

Применение Алгоритма для определения основных этапов исследования СМП_1 выявило целесообразность анализа его нутритивной адекватности.

Установлено, что СМП_1 при низкой калорийности (высокое содержание белка при достаточно низком содержании жира, доля углеводов незначительна (менее 3 %), характеризовался высокими значениями КРАС и коэффициентом утилитарности аминокислотного состава (таблица 42).

Таблица 42. Результаты изучения нутриентной сбалансированности СМП_1

Показатель	**Заданные требования**	**СМП-1**
Показатели химического состава		
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	0,4
Показатели аминокислотной сбалансированности		
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})	$\rightarrow 1$	0,6
Коэффициент утилитарности белка, дол. ед. (Б)	$\rightarrow 100$	62,1
Коэффициент сопоставимой избыточности, г/100 г белка (U)	$\rightarrow 0$	0,6
КРАС, %	$\rightarrow 0$	90,3
БЦ, %	$\rightarrow 100$	9,7
Показатели жирнокислотной сбалансированности		
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$\rightarrow$1:1:1	4,6:3,2:1

продолжение Таблицы 42

Соотношение ω6 :ω3	5 – 10:1	7:1
Соотношение С18:2ω6 : С18:2ω3	>20	16,3
С20:5ω3+С22:5ω3	–	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 гипер-холестеринемическим ЖК	-	1,4
Индекс здоровья	0,2 -1,8	1,3

Анализ аминокислотного состава СМП_1 выявил достаточно высокое содержание валина, цистина, метионина. Анализ жирнокислотного состава СМП_1 показал достаточно высокое количество насыщенных и недостаток мононенасыщенных жирных кислот – количественное отношение НЖК превышает показатели, рекомендованные ФАО/ВОЗ для лиц, страдающих ССЗ. Высокое содержание ω-6 линолевой ЖК в СМП_1 является благоприятным показателем, т.к. данная кислота – предшественник более физиологически активной арахидоновой ЖК. Соотношение ω-6 к ω-3 жирных кислот в продукте приближено к рекомендованным для больных ССЗ оптимальным значениям (Драпкина О. М., 2012) (Таблица 42).

При низких показателях БЦ и аминокислотной сбалансированности СМП_1 отличается низкими индексом атерогенности и тромбогенности (0,6 и 1,2) и высокими значениями гиполипидемических жирных кислот – 1,4. Индекс здоровья, рассчитанный как отношение суммы всех ненасыщенных ЖК к суммарному содержанию лауриновой, пальметиновой и четырехкратному содержанию миристиновой кислот, был высоким и составил 1,3.

В соответствии с полученными данными в эксперименте на лабораторных животных продукт вносили как дополнение к диете.

В соответствии с Алгоритмом биокоррегирующий эффект СМП_1 в эксперименте *in vivo* проверяли на конвенциональных мышах, потребляющих WDa, разделенных на группы: А – интакт (KD); В – животные, потребляющие Wda; С и D – животные, потребляющие Wda, которым в рацион вводили СМП_1. В рамках эксперимента оценивали диетопротекторные (группа С: потребление

СМП_1 параллельно с WDa на протяжении 24 сут) и диетотерапевтические (группа D: потребление WDa на протяжении 24сут, последующее введение в рацион СМП_1 14 сут) свойства в соответствии с определенными ранее маркерами (глава 5.4.1). А именно, маркеры: ПГТГ (на 23 и 49 сут), поведенческие тесты (на 19 – 21 сут и 47 – 48 сут), лейкоцитарная формула в образцах цельной крови мышей на 37 и 51 сут, липидный профиль сыворотки крови: ОХС, ТГ, ХС ЛПВП и ХС ЛПНП и печеночным ферментам (АСТ и АЛТ) (на 37 и 51 сут), относительная масса печени, сердца, висцерального жира (на 37 и 51 сут), степень инфильтрации печени липидами (окрашиванием Oil red O) (Рисунке 43).

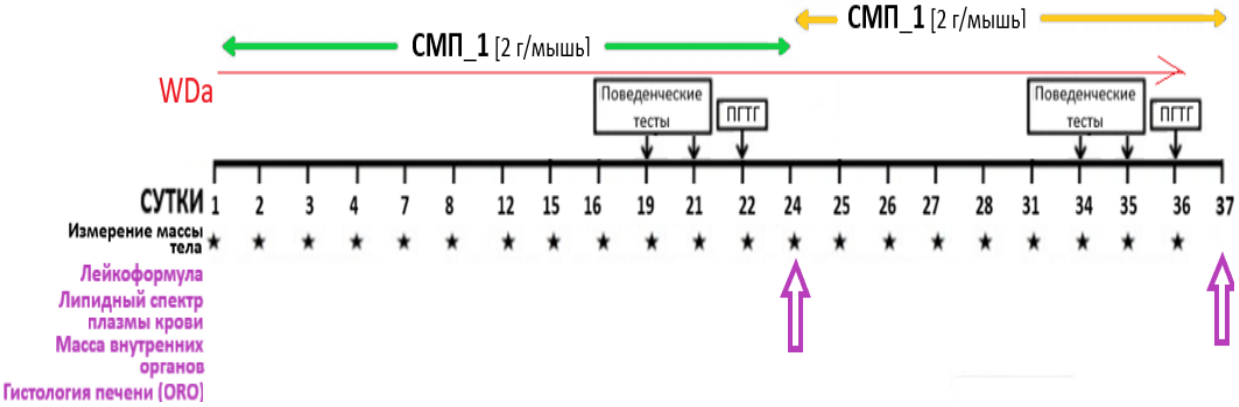


Рисунок 43 – Дизайн эксперимента по изучению диетопротекторных и диетотерапевтических эффектов СМП_1 на мышах, потребляющих WDa

Анализ динамики массы тела показал, что у интактных мышей группы А масса тела в течение эксперимента значительно не изменялась. Привесы относительно 1 сут в группе А составили 1,32 % (p=1,0) на 23 сут и 4,72 % (p=0,864) на 34 сут, в группе 1 – 5,39 % (p=0,217) на 23 сут, 3,08 % (p=0,734) на 33 сут и 1,07 % (p=0,425) на 48 сут. У животных группы В, потребляющих WDa, масса тела относительно 1 сут увеличивалась на 23 сут на 8,03 % (p=0,007), на 34 сут на 12,9 % (p<0,001). Масса тела мышей группы С на 14 и 23 сут увеличивалась относительно 1 сут на 7,53 % (p=0,019) и на 7,80 % (p=0,021); для группы D выявлено увеличение массы на 31 и 34 сут (до 13 % (p<0,001) (рисунок 44).

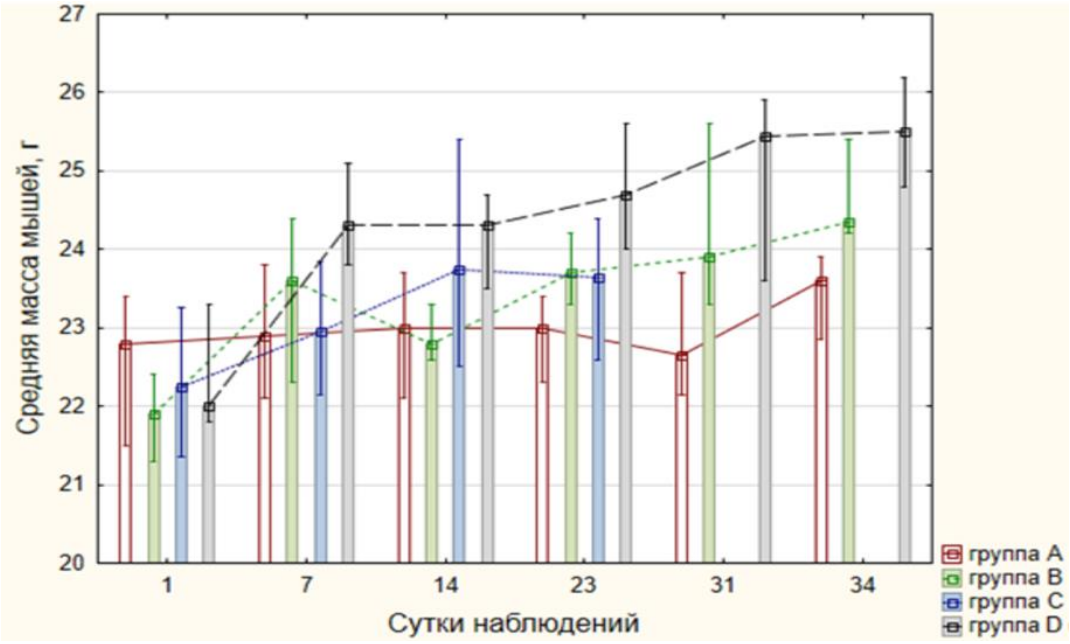


Рисунок 44 – Динамика массы тела мышей при изучении протекторных и терапевтических свойств СМП_1

Результаты теста на глюкозотолерантность представлены на Рисунке 45. У мышей группы В после введения глюкозы восходящее колено гликемической кривой свидетельствовало о быстром всасывании глюкозы: через 10 мин после введения отмечена высокая концентрация глюкозы в крови, значительно превышавшая величину физиологической нормы для крыс, и сохранявшаяся вплоть до 15 мин. Уровень гликемии через 30 мин после введения глюкозы снижался, но не достигал исходного значения, что свидетельствует о нарушении утилизации глюкозы. Средняя площадь под кривой у мышей групп В, С и D превышала таковую в группе А на 24 сут на 19,0 % ($p=0,004$) и на 21,8 % ($p=0,025$) для групп В и С, на 38 сут на 42,8 % ($p<0,001$) в группе В и на 42,7 % ($p<0,001$) в группе С.

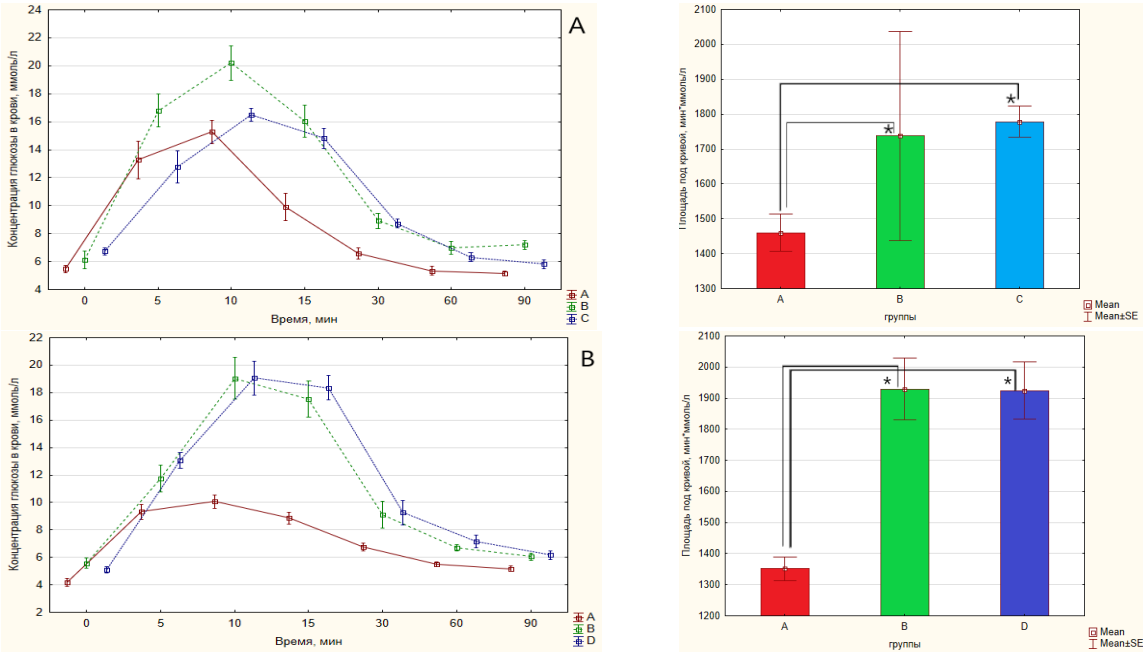


Рисунок 45 – Результаты теста на глюкозотолерантность в эксперименте по изучению протекторных (A) и терапевтических (B) свойств СМП_1

Результаты теста «Вынужденное плавание» представлены на Рисунке 46. Мыши группы B в отличие от мышей группы A проявляли более отчетливые признаки депрессивно-подобного поведения: большую часть времени проводили в состоянии пассивного плавания (дрейф и полная неподвижность в воде). При этом введение в рацион СМП_1 приводило к увеличению общего времени плавания у мышей группы C на 46,88 % (p=0,048) относительно мышей группы B, потреблявших WDa.

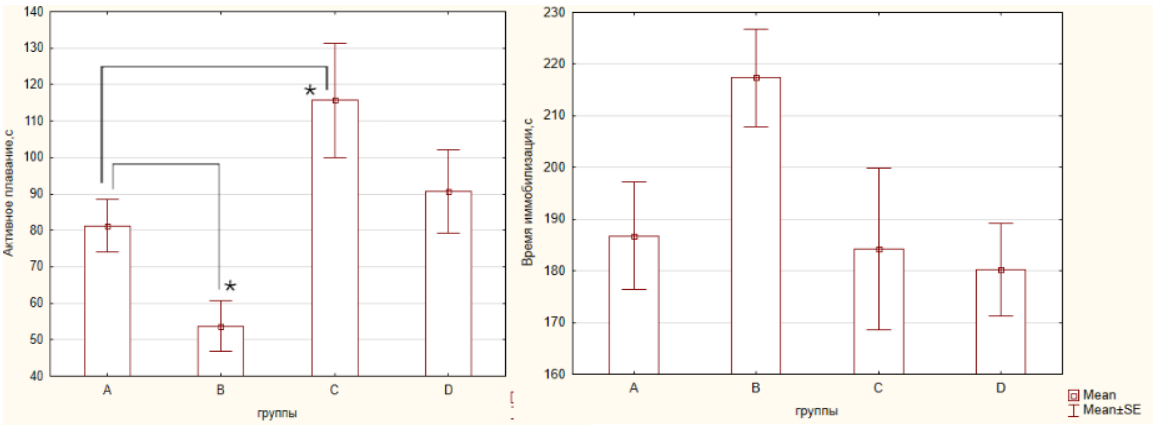


Рисунок 46 – Результаты изучения протекторных и терапевтических свойств СМП_1 в тесте Порсолт

Показно отсутствие статистически значимых изменений в исследовательском поведении мышей, которым в рационы вводили исследуемые продукты, подтвержденных результатами тестов «Открытое поле» «Новая клетка»

Не выявлены изменения лейкоцитарной формулы при изучении морфологического состава крови мышей групп A, B, C и B.

Анализ результатов биохимического исследования плазмы крови мышей (Рисунок 47) групп C и D свидетельствовал о протекторном и терапевтическом действии мясного модуля на основе сердец и аорт.

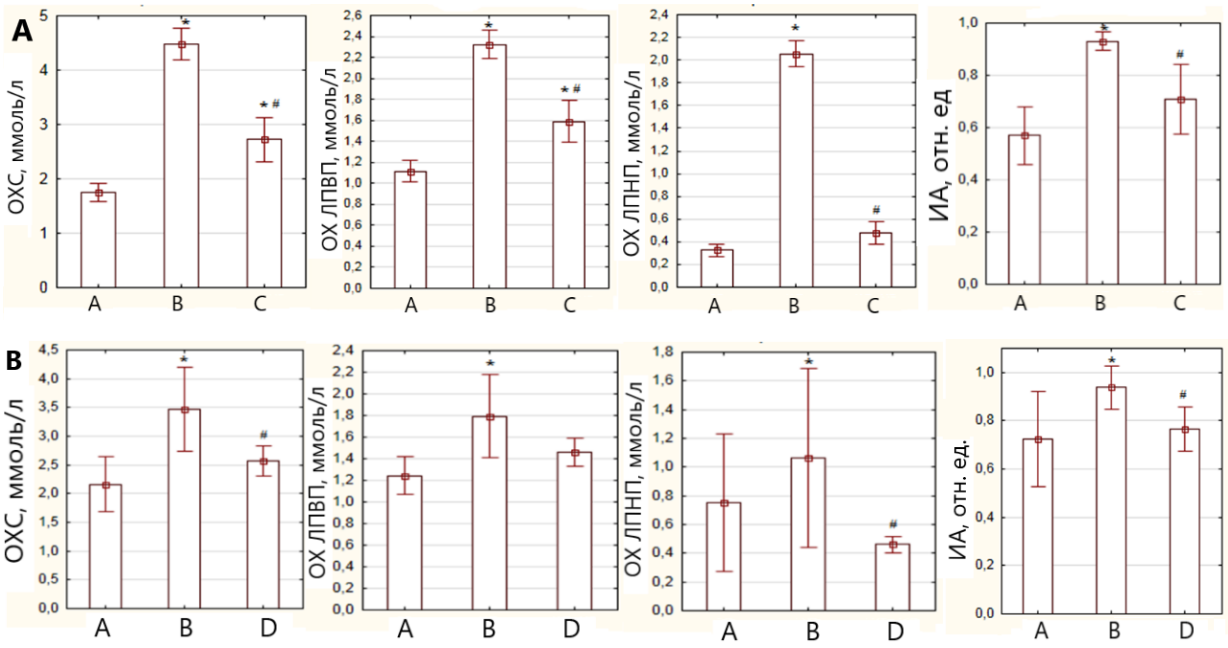


Рисунок 47 – Результаты биохимических исследований плазмы крови мышей в эксперименте по изучению протекторных (**A**, 24 сут) и терапевтических (**B**, 37 сут) свойств СМП_1

При введении в рацион на протяжении 24 сут параллельно с WDa продукт способствовал достоверному снижению ОХС, ХС ЛПНП и ИА плазмы крови на 44,17 %, 74,81 % и 22,58 % соответственно ($p<0,05$) и повышению ХС ЛПВП на 33,24 % ($p=0,038$). Также отмечено повышение активности печеночных ферментов (АсАт, АлАт более чем на 10 %). При введении в рацион после развития метаболических нарушений на протяжении 14 сут выявлено снижение ОХС, ХС ЛПНП и ИА сыворотки крови на 22,30 %, 22,63 % и на 17,9% ($p<0,05$) и повышение ХС ЛПВП (на 16,6 %, $p=0,143$).

Относительная масса висцерального жира мышей, потреблявших WDa, статистически значимо не отличались от контроля. При оценке относительной массы внутренних органов мышей группы С, потреблявших СМП_1, выявлено увеличение почек более чем в 2 раза ($p<0,1$). Интересно отметить, что в группе D, потреблявших СМП_1 более продолжительное время, наоборот выявлено снижение данных показателей в 1,5 раза ($p<0,1$) (Рисунок 48). Возможно, это связано с развитием отечного синдрома почек на ранних стадиях развития стеатоза. Снижение массы к 37 сут может свидетельствовать о нивелировании патологии у животных при потреблении продукта.

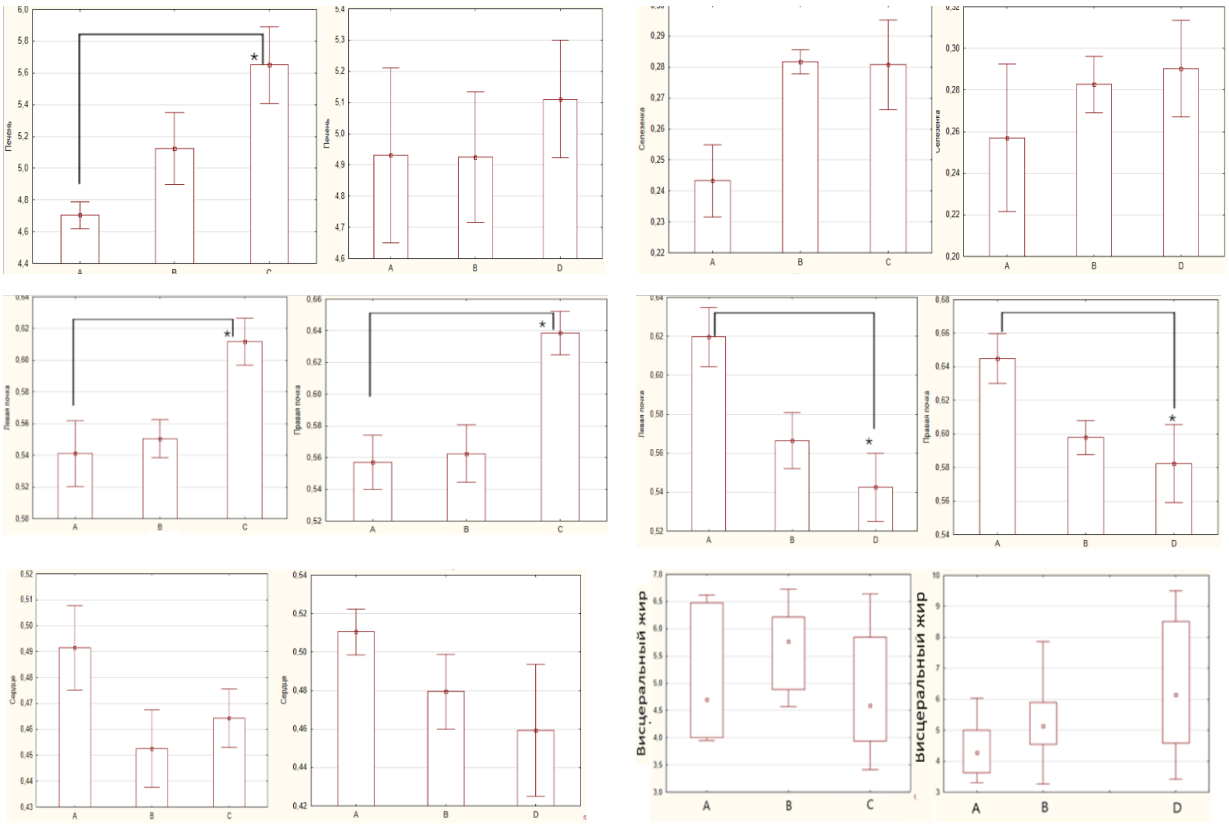


Рисунок 48 – Относительная масса внутренних органов мышей при изучении протекторных (24 сут) и терапевтических (37 сут) свойств СМП_1

Результаты гистологического исследования показали, что потребление исследуемых образцов приводило к выраженному снижению степени стеатоза печени: в образцах печени мышей группы C и D выявлено снижение степени инфильтрации ткани липидами более чем 30 % относительно группы B (рисунок 49).

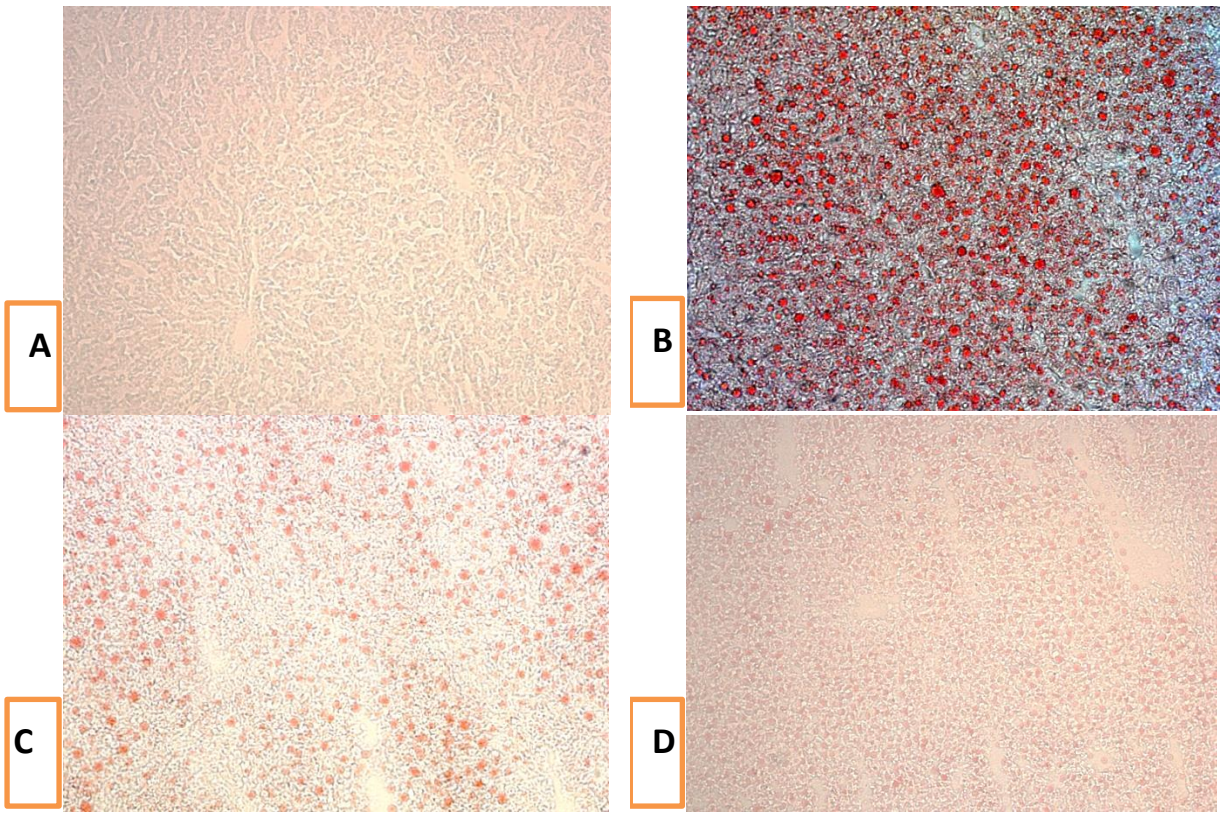


Рисунок 49 – Гистологическая картина срезов печени мышей (ув 20х, окраска Oil red O.): A) группа A (KD/интакт); B) группа B (WDa, метаболические нарушения); C) группа C (СМП_1 совместно с моделированием метаболических нарушений, 24 сут); D) группа D (СМП_1 после моделирования метаболических нарушений, 14 сут)

Таким образом, в результате эксперимента *in vivo* показано, что на фоне развивающейся гиперлипидемии и стеатоза печени при потреблении «западной» диеты исследуемый продукт обладал разнонаправленными протекторными и терапевтическими свойствами. При введении в рацион на протяжении 24 сут параллельно с WDa продукт, 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 % (p=0,038), снижал длительность латентного периода в тесте Порсолта и степень стеатоза печени (на 22,3 %), повышал активность печеночных ферментов (АсАт, АлАт более чем на 10 %). При введении в рацион после развития метаболических нарушений на протяжении 14 сут, не влияя на динамику массы тела и лейкоцитарный профиль, исследуемый продукт способствовал достоверному снижению ОХС (на 22,3 %), ХС ЛПНП (на 22,6 %), ИА сыворотки крови (на 17,9 %), повышению ХС ЛПВП (на 16,6 % (p=0,143). Продукт также частично нормализовывал толерантность к глюкозе, способствовал уменьшению массы висцерального жира и снижал степень стеатоза печени (на 36,7 % относительно WDa).

Результаты исследований свидетельствуют о целесообразности комплексного подхода при оценке продуктов специализированногоназначения, напрвленных на коррекцию и профилактику сердечно-сосудистых заболеваний, за счет разносторонней оценки как физико-химических, в том числе нутритивных, так и биологических свойств, продукта.

6.3.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ СМП_2

В соответствии с Алгоритмом на первом этапе оценивали нутриентную адекватность экспериментальных партий СМП_2: 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 %). Установлено, что обогащение мясного продукта БАВ_1 не приводило к значимым изменениям состава и показателей нутриентной адекватности (Таблица 43).

Далее проводили исследование гипотензивной активности экспериментальных партий СМП_2, содержащих прижизненно-модифицированную свинину/гидролизат, на ранее экспериментально обоснованной тест-системе *in vitro*.

Таблица 43. Показатели нутриентной адекватности экспериментальных партий СМП_2

Показатель	Наименование экспериментальных партий			
	КМП	КМПф	СМП	СМП_2ф
Химический состав				
Белок, %	11,4±0,1	13,1±0,1	12,9±0,1	14,1±0,1
Жир, %	9,6±0,1	9,4±0,1	7,5±0,1	7,3±0,1
Влага, %	75,6±0,5	74,7±0,3	76,5±0,2	75,8±0,1
Сухое вещество, %	24,3±0,2	25,4±0,3	23,6±0,1	24,1±0,1
Соотношение белок:жир	0,9:1	1:0,9	1:0,5	1:0,6
Поваренная соль, г/100 г	0,3			
Переваримость по пепсину, мг/г тирозина	7,9	8,1	8,4	8,6
Переваримость по трипсину, мг/г тирозина	9,1	9,3	9,3	9,5
Аминокислотная сбалансированность				
ΣНАК:ΣЗАК	0,7:1	1:1	1,1:1	1,3:1
Коэффициент сопоставимой избыточности, г/100 г белка (U)	0,60	0,51	0,65	0,47
КРАС, %	19,7	24,0	17,3	23,8
БЦ, %	80,3	76,0	82,7	76,2
Жирнокислотная сбалансированность				
ΣНЖК, г/100г жира	43,2	42,7	41,3	41,5
ΣМНЖК, г/100г жира	35,1	35,5	33,2	33,0
ΣПНЖК, г/100г жира	6,0	5,3	5,7	6,0
Соотношение ω6:ω3	0,2:1	0,3:1	0,3:1	0,3:1

Для проведения эксперимента *in vitro* на наличие гипотензивной активности предварительно определяли влажность экспериментальных образцов СМП_2 гравиметрическим методом и проводили пробоподготовку путем экстрактации в соляной кислоте, отделением и высушиванием фильтрата, его разведением деионизованной водой с целью приготовления серии последовательных разведений (фактор разбавления 2-32). Значения влажности и сухого веса продуктов использовались для пересчета гипотензивной активности в нг эквивалентов каптоприла в расчете на 1 г сухого веса продукта. Результаты определения гипотензивной активности исследованных образцов представлены на Рисунке 50. Как видно из рисунка, величина гипотензивной активности продуктов варьирует в пределах от 0,26 до 0,31 нг экв. каптоприла /г сухого веса, при этом

наиболее выраженным гипотензивным эффектом обладала партия СМП_2ф (Рисунок 50).

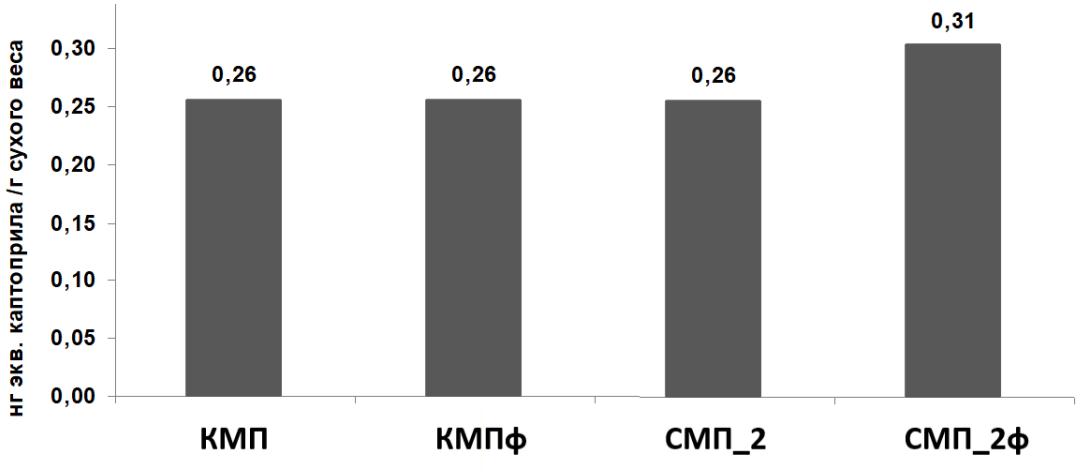


Рисунок 50 – Гипотензивная активность экспериментальных партий СМП_2

Рассчитанные ранее (глава 6.2) значения IC50 белкового гидролизата БАВ_2, пересчитанные на нг эквивалента каптоприла на 1 г сухого веса, составляли 4,30 нг экв. каптоприла/г сухого веса, что свидетельствует о его выраженном гипотензивным действием.

Далее в соответствии с Алгоритмом были проведены исследования *in vivo* экспериментальных образцов СМП_2 из прижизненно модифицированной свинины (СМП_2), а также образцов, обогащенных белковым гидролизатом БАВ_1 (КМПф и СМП_ф), на ранее экспериментально обоснованных моделях повреждения центральной и периферической нервных систем с учетом выявленных маркеров для оценки нейрореабилитационных свойств СМП_2. После моделирования заболевания (на следующие сутки) животных распределяли на группы:

Группа 1 – интактные крысы, содержащиеся на протяжении всего эксперимента на стандартном рационе вивария (n=8);

Группа 2 – ложнооперированные крысы (ЛОЖ), содержащиеся на протяжении всего эксперимента на стандартном рационе вивария (n=12);

Группа 3 – животные с ИПГ, содержащиеся на протяжении всего эксперимента на стандартном рационе вивария (n=12);

Группа 4 – животные с ИПГ, получавшие КМПф (n=12);

Группа 5 – животные с ИПГ, получавшие СМП_2 (n=12);

Группа 6 – животные с ИПГ, получавшие СМП_2ф (n=12) (Рисунок 51). Кормление животных групп 3 – 6 испытуемыми продуктами по схеме в первые 4 сут происходило индивидуально. Контролем служили интактные и ложнооперированные животные. Продолжительность эксперимента составила 14 сут. Сохранность животных на протяжении эксперимента была полной.

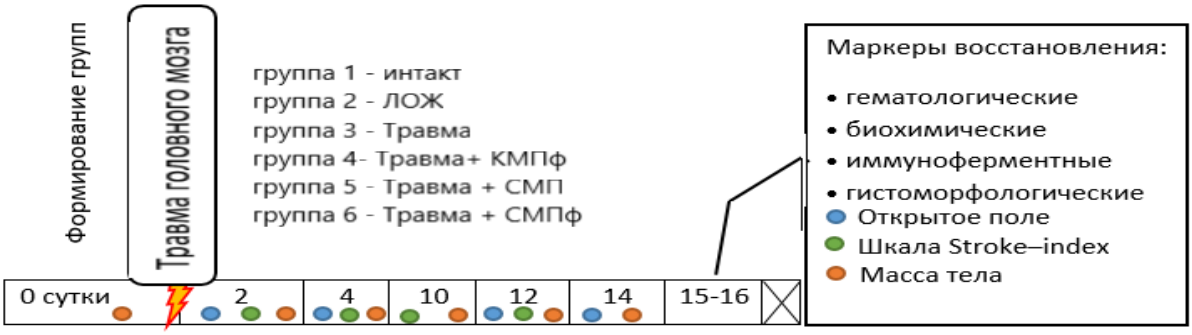


Рисунок 51 – Дизайн эксперимента по изучению диетотерапевтических эффектов экспериментальных партий СМП_2 на крысах с ИПГ (травма)

После выхода из наркоза и на протяжении последующих 4 – 5 ч после операции у животных групп 2 – 6 наблюдалось угнетенное состояние, вялость, замедленность движений, манежные движения, слабость конечностей. Более чем у 80 % крыс отмечалось резкое снижение двигательной активности. В первые 2 сут наблюдались признаки парезов и параличей левой половины тела, нарушение глотательного рефлекса, сохранявшиеся у животных групп 3 и 4 вплоть до 10 – 14 сут после моделирования.

У крыс групп 3 и 4 на 2 сут улучшился аппетит, на 3 сут аппетит восстановился полностью. Отчетливый глотательный рефлекс наблюдался более чем у 70 % крыс, которые стали более активными. Также была отмечена частичная нормализация горизонтальной двигательной активности. Результаты наблюдения за динамикой изменения массы тела лабораторных животных представлены на рисунке 50. У интактных крыс группы 3 привесы в конце эксперимента составили 4,7 %, у ложнооперированных животных группы 2 – 15,2 %, у животных группы 3

и 4 – 20,1 %, у крыс группы 5, которым в рацион вводили СМП_2 – 12,3 %, у животных группы 6, которым в рацион вводили СМП_2ф – 16,7 %.

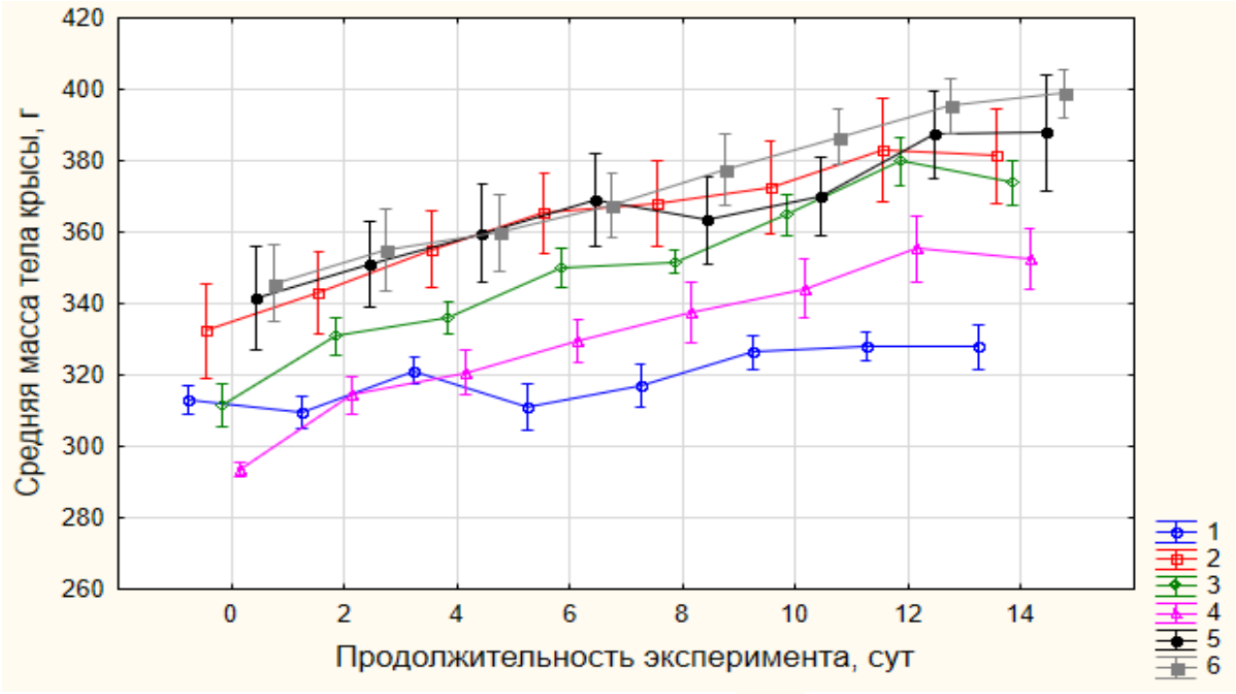


Рисунок 52 – Динамика массы тела крыс в эксперименте по изучению диетотерапевтических свойств экспериментальных партий СМП_2

При анализе неврологического статуса были получены следующие результаты. У ложнооперированных животных группы 2 на протяжении всего тестирования не было отмечено тяжелых неврологических нарушений.

Максимальное количество животных с тяжелыми проявлениями неврологических нарушений наблюдалось на 2 сут после операции у групп 3 и 4. Животные этих групп (60 % от общего числа) набирали от 9 – 15 баллов по 1, 2, 3, 9 и 10 пунктам исследования, что согласуется с результатами проведенных ранее наблюдений и указывает на парезы и параличи лап. 20% животных из этих же групп набирали баллы по 4 и 6 пунктам исследования, что указывает на общий левосторонний паралич тела. При дальнейшем тестировании было выявлено, что на 10 и 11 сут у групп 3 и 4 отмечались животные с тяжелой симптоматикой (до 40 % от общего числа), 70 % из них набирали 9 – 11 баллов, 30 % набирали 7 – 9 баллов – у животных наблюдалась вялость, нарушения движения на одной стороне тела, ярко выраженный экзофтальм.

У животных, потреблявших образцы СМП_2 и СМП_2ф (группы 5 и 6), уже на 7 сут не выявлялись проявления тяжелых неврологических нарушений. 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 (Таблица 44).

Таблица 44. Процентное соотношение животных с легкой симптоматикой неврологических нарушений

Группа животных	**Время после операции, сут**					
	2	**3**	**4**	**7**	**10**	**11**
1 (ИНТАКТНЫЕ)	100	100	100	100	100	100
2 (ЛОЖ)	100	100	66,7	66,7	80	100
3 (ИПГ)	0	40	20	0	20	20
4 (ИПГ+ КМПф)	0	40	20	20	20	20
5 (ИПГ+СМП_2)	50	66,7	66,7	66,7	83,3	83,3
6 (ИПГ+СМП_2ф)	20	20	66,7	66,7	66,7	83,3

У животных, потреблявших СМП_2, была выявлена тенденция к уменьшению количества крыс с неврологической симптоматикой, начиная со 2 по 11 сут в различной степени, максимальный эффект отмечен у группы 5 – на 10 и 11 сут количество крыс с легкими проявлениями неврологических нарушений составило 83,3 %, остальные животные полностью восстановились (таблица 46). Таким образом, можно утверждать, что введение в рацион крыс мясного продукта, полученного из прижизненно модифицированного мясного сырья, а также обогащенного БАВ_1 способствует ослаблению неврологических нарушений.

Анализ результатов теста «Горизонтальная перекладина» показал, что введение в рацион образцов СМП_2 и СМП_2ф, более активно восстанавливает мышечный тонус у оперированных животных на 4 сут – 80 % животных активно подтягивались на перекладине, тогда как у групп 3 и 4 всего 30 % крыс смогли выполнить эту функцию.

Изучение ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «Открытое поле» выявил, что у интактных животных группы 1 суммарные показатели двигательной активности и «Норкового рефлекса» были примерно одинаковы, составляя 50±15 – для горизонтальной двигательной активности; 15±5 для

вертикальной активности; 13±5 для «Норкового рефлекса». У ложнооперированных животных группы 2 рассматриваемые показатели среди других групп сравнения, практически не изменялась, однако на 4 сут наблюдалось снижение количества обследования отверстий у 80 % животных, на 11 сут отмечалось снижение двигательной активности и «Норкового рефлекса» у 40% крыс (Таблица 45).

Таблица 45. Результаты тестирования животных в тесте «Открытое поле»

Группа животных	Число пересеченных квадратов	Число вертикальных стоек	«Норковый рефлекс»
4 сут после моделирования ИПГ			
1 (ИНТАКТНЫЕ)	51,0±12,5	14,3±6,2	15,4±3,6
2 (ЛОЖ)	36,3±10,1	13,6±5,7	5,3±3,9
3 (ИПГ)	19,9±12,5	6,0±3,3	4,9±3,8
4 (ИПГ+ КМПф)	21,0±14,1	8,2±4,1	5,3±3,0
5 (ИПГ+СМП_2)	46,7±18,2*#	12,3±5,2	5,4±2,6
6 (ИПГ+СМП_2ф)	41,2±26,1	12,7±6,6	9,6±4,5
11 сут после моделирования ИПГ			
1 (ИНТАКТНЫЕ)	51,3±13,9	14,3±4,15	13,1±3,9
2 (ЛОЖ)	54,5±24,9	8,5±2,2	9,2±4,2
3 (ИПГ)	32,6±22,3	6,4±3,6	5,8±3,0
4 (ИПГ+ КМПф)	21,0±10,3	8,9±5,0	3,4±1,6
5 (ИПГ+СМП_2)	53,8±14,5	12,9±4,09	17,8±3,1
6 (ИПГ+СМП_2ф)	49,5±10,9	16,7±5,2	12,8±4,9
13 сут после моделирования ИПГ			
1 (ИНТАКТНЫЕ)	36,3±12,5	15,0±6,9	13,1±4,0
2 (ЛОЖ)	37,0±4,7	9,4±3,2	12,4±2,7
3 (ИПГ)	79,2±17,1	15,3±4,0	5,3±4,0
4 (ИПГ+ КМПф)	58,4±12,7	20,0±7,3	6,1±3,5
5 (ИПГ+СМП_2)	51,7±17,9	9,0±2,4	8±4
6 (ИПГ+СМП_2ф)	57,6±22,4	12,4±5,2	9,2±3,4

Примечание: * – при $p<0,01$ относительно группы 3;
– при $p<0,01$ относительно группы 4.

Показатели двигательной активности и «Норкового рефлекса» у животных групп 3 и 4 были снижены вплоть до 11 сут в среднем на 20 % и 40 % соответственно. Значительная часть крыс, потреблявших на протяжении всего эксперимента экспериментальные образцы СМП_2 и СМП_2ф, практически не проявляла снижение горизонтальной и вертикальной двигательных активностей. На 4 сут у групп 5 и 6 отмечалось увеличение показателей двигательной активности до 20 % у 40 % крыс, у

20 % животных – снижение до 65 %; на 11 сут суммарные показатели двигательной активности и «Норкового рефлекса» были соотносимы с интактом.

На 11 сут суммарные показатели двигательной активности и «Норкового рефлекса» восстановились у всех животных, потреблявших СМП_2 и СМП_2ф (группы 5 и 6). Их значения были приближены к показателям интактных животных. На 13 сут отмечено снижение ориентировочно-исследовательского поведения животных групп 1, 2, 5 и 6, что вызвано привыканием крыс к экспериментальной установке и переходу их к поведению «Патрулирование знакомой территории». У крыс с ИПГ, напротив, отмечено увеличение горизонтальной и вертикальной активности, что, возможно, указывает на усугубление патологической симптоматики (Таблица 45).

В результате исследования установлено, что реакция тревоги и фобический компонент эмоционального статуса менее выражен у крыс группы 5, в рацион которым вводили экспериментальные образцы СМП_2, по сравнению с животными группы 3 и 4 (Таблица 46).

Таблица 46. Поведение крыс в условиях теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» на 14 сут после воспроизведения ИПГ

Группа животных	**Время нахождения на центральной площадке (с)**	**Время нахождения в открытых рукавах (с)**	**Число заходов в закрытые рукава**	**Суммарный показатель заходов**
1 (ИНТАКТНЫЕ)	10,00±2,25	23,55±8,72	4,00±2,00	5,00±4,00
2 (ЛОЖ)	8,6±5,88	11,0±8,72	3,00±1,00	3,80±2,33
3 (ИПГ)	2,43±1,62	5,71±4,52	3,71±1,46	2,71±1,19
4 (ИПГ+ КМПф)	3,00±1,80	5,90±2,20	3,98±1,02	5,30±1,06
5 (ИПГ+СМП_2)	6,60±1,66	39,98±17,94	4,0±0,19	3,6±1,47
6 (ИПГ+СМП_2ф)	5,43±2,92	50,13±11,80	2,71±1,19	7,0±3,45

Изучение распределения лейкоцитов в крови крыс (Рисунок 53) не выявило статистически значимых изменений в количественном содержании лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов. При этом у крыс групп 5 и 6 отмечено снижение относительного содержания лимфоцитов до 15% ($p<0,05$) при

повышении относительного содержания гранулоцитов: на 36,4% и 31,8% у группы 5 и на 25,8% и 20,5% у группы 6 относительно группы 3.

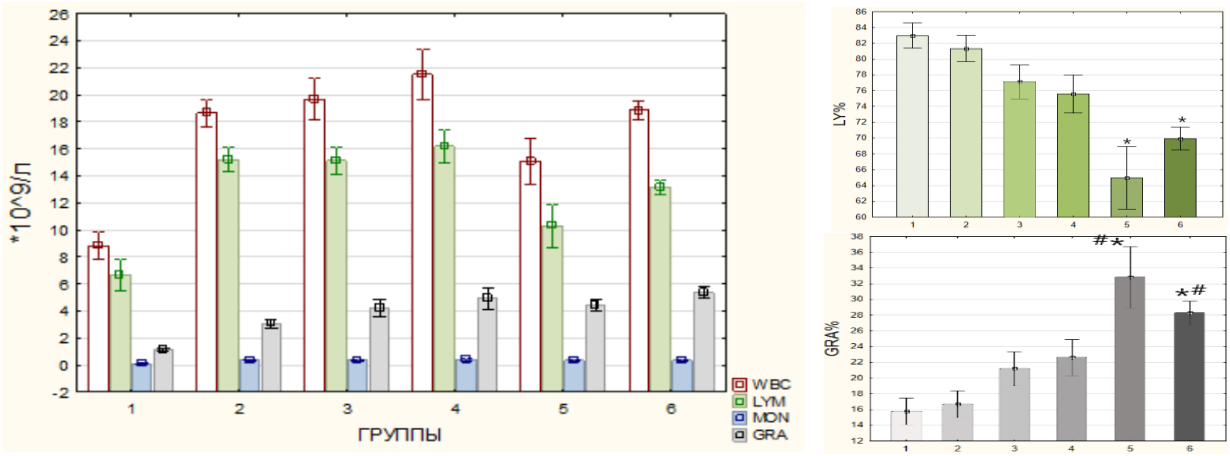


Рисунок 53 – Морфологический анализ распределения лейкоцитов крови крыс с ИПГ при изучении диетотерапевтического эффекта экспериментальных партий СМП_2

Анализ результатов гематологических показателей крови крыс не выявил статистически значимых изменений, но у крыс группы 6 отмечено увеличение количества эритроцитов (на 7 % относительно группы 2 и на 9,6 % относительно группы 5 ($p<0,05$). У крыс группы 5 наблюдалось снижение гематокрита на 10 % относительно группы 3 и на 15 % относительно группы 4 (Рисунок 54).

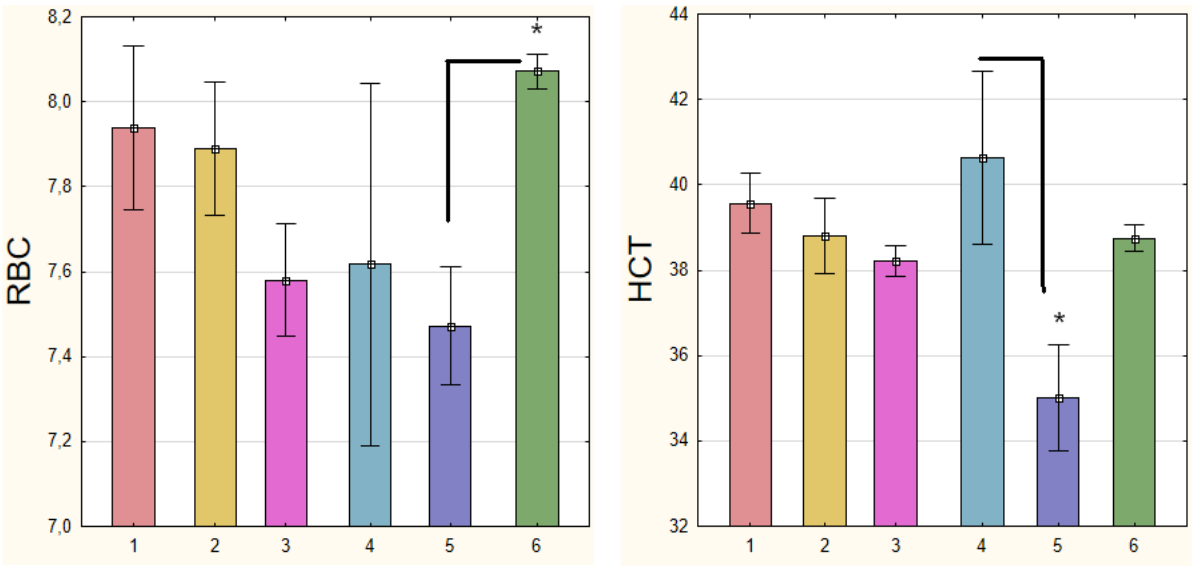


Рисунок 54 – Концентрация эритроцитов и гемоглобина в крови крыс с ИПГ при изучении диетотерапевтического эффекта экспериментальных партий СМП_2

Анализ биохимических показателей сыворотки крыс позволил выявить, что у крыс групп 2, 3, 5 и 6 при статистически недостоверных изменениях концентрации общего белка, альбумина и мочевины увеличивалась концентрация креатинина относительно интактных крыс группы 1 (на 22,8 %, 23,4 %, 20,6 % и 23,5 %, соответственно). Отмечено достоверное снижение глюкозы в сыворотке крови крыс группы 2 (на 44,1 % относительно группы 1 и на 35,9 % относительно группы 3) и группы 4 (на 41,4 % относительно группы 1); активности АлАт в сыворотке крови крыс группы 3 и 5 (свыше 45 % относительно группы 1); содержания фосфора в сыворотке крови крыс группы 5 (до 15 % относительно группы 2) (Рисунок 55). Активность АсАт и содержание общего холестерина статистически значимо не изменялось.

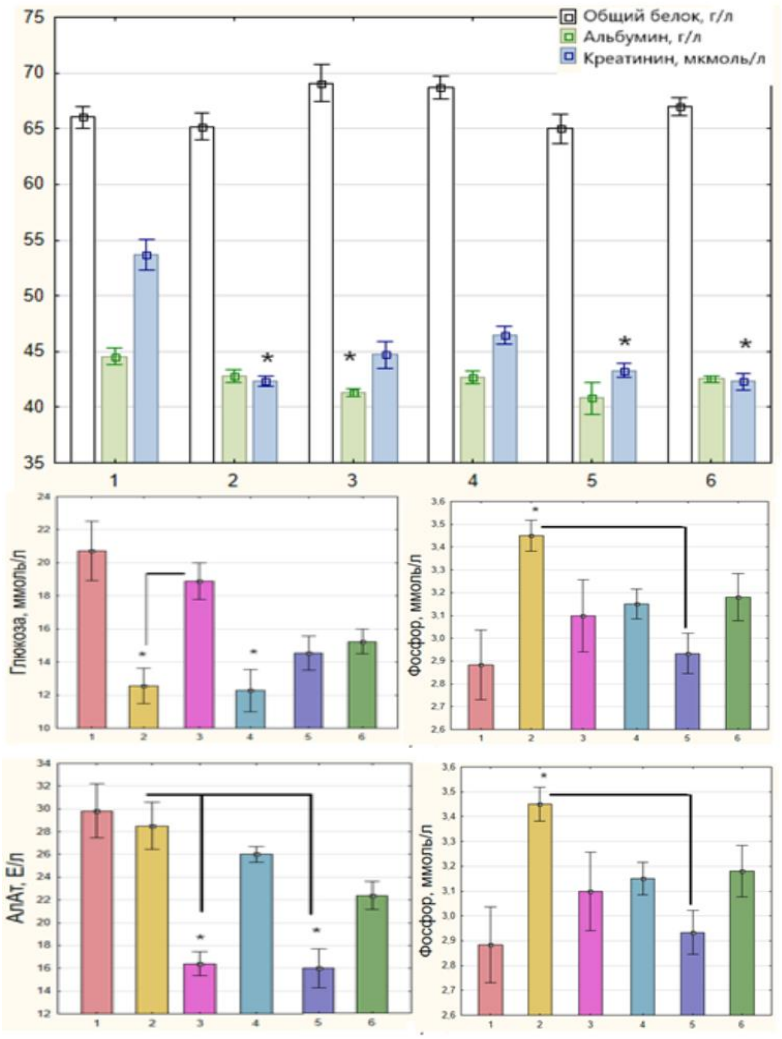


Рисунок 55 – Некоторые биохимические показатели крови крыс с ИПГ при изучении диетотерапевтического эффекта экспериментального СМП_2

В гистологическом исследовании для количественной оценки эффективности диетотерапии ИПГ образцами СМП_2 в соответствии с обоснованными в главе 5.4.2 маркерами в качестве основного был использован показатель нейроглиального индекса. У животных группы 3 выявлено значительное количество погибших глиоцитов, снижение плотности нейронов коры головного мозга в среднем на 15 %. При этом отмечено увеличение площади перикариона нейронов за счет развития внутриклеточного отека, нейроглиальный индекс составлял 1,2 ± 0,1, снижаясь относительно интакта и ЛОЖ в 2 раза. У животных группы 4 отмечена похожая тенденция – нейроглиальный индекс снижался относительно интакта и ЛОЖ в 1,8 раз. У крыс групп 5 и 6 отмечено уменьшение отека нейронов и незначительное количество клеток с признаками пикноза. Нейроглиальный индекс составлял 1,4 ± 0,1 и 1,7 ± 0,2 соответственно (Рисунок 56).

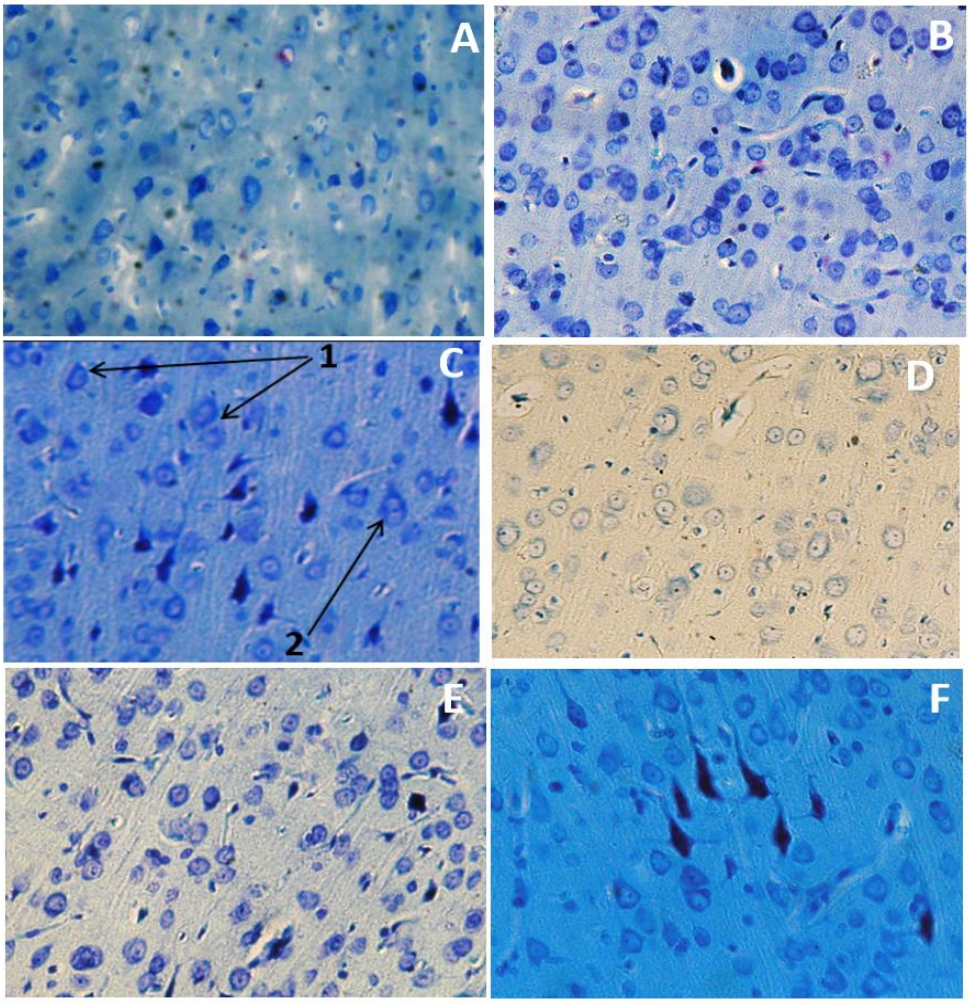


Рисунок 56 – Микроскопические исследования головного мозга крыс.
Условные обозначения: A – группа 1 (интакт); B – группа 2 (ЛОЖ); C – группа 3 (ИПГ); D – группа 4 (ИПГ+КМПф); E – группа 5 (ИПГ+СМП_2); F – группа 6 (ИПГ+ СМП_2ф); 1 – отек нейронов; 2 – пикнотические изменения клеток (Толуидиновый синий. Об. 20, ок. 10)

У группы 6 выявлено выраженное увеличение тинкториальных свойств (окрашивания) базофильного вещества нейронов, что может свидетельствовать о процессах активного синтеза белка и при выявленном увеличении площади нейронов может быть обусловлено функциональной активацией нейронов вследствие потребления СМП_2ф, обогащенного белковым гидролизатом БАВ_2.

Таким образом, в результате проведенных исследований на лабораторных крысах с моделью ИПГ экспериментальных партий СМП_2ф из прижизненно-модифицированной свинины с добавлением белкового гидролизата БАВ_1, показана перспективность его использования в качестве нейрореабилитационного диетотерапевтического продукта. Поэтому далее были проведены исследования его эффектов при травме спинного мозга и периферического нерва в соответствии с экспериментально обоснованными моделями ТСМ и ТПН.

Установлено, что курсовое (14 сут) применение СМП_2ф оказывало положительное влияние на динамику восстановления поврежденных нервов. Через 1 мес после травмы седалищного нерва показатели индекса SFI достоверно не отличались от контрольной группы. Статистически значимое восстановление установлено на 3 мес (–35,1 ± 4,1, Uемп=0, Uкр=0, $p<0,05$). Оно было больше показателей контрольной группы на 22,1%, через 4 мес – на 36,3 % (–22,1 ± 2,8, Uемп=0, Uкр=1, $p<0,01$, Uкр=4, $p<0,05$) (Рисунок 57, Таблица 47).

Рисунок 57 – Рисунок стопы опытных крыс для индекса SFI

Таблица 47. Показатели шкалы функционального восстановления седалищного нерва (SFI) крыс

Группа	**Период, мес**			
	1	**2**	**3**	**4**
Норма (n=8)	–5,2±3,7			
ТПН (n=10)	–80,1 ± 2,4	–74,7 ±3,1	–45,1 ± 4,9	–34,7 ± 5,8
ТПН + СМП_2ф (n=10)	–74,5 ± 5,7	–64,9 ± 2,7	–35,1 ± 4,1*	–22,1 ± 2,8*

Примечание: * – достоверно к контролю (p<0,05).

Анализ полученных данных по шкале BBB также показал частичное восстановление спинного мозга после гемисекции: через 1 мес после травмы функциональные показатели соответствовали 4,5 ± 0,4 баллам, а через 4 месяца – 10,9 ± 0,8 (превышали в 2,3 раза контроль, но были снижены на 48,7 % относительно нормы). Употребление СМП_2ф приводило к статистически значимому увеличению функционально значимого восстановления на 4 мес: превышал контроль на 19,5 % и составлял 13,1 ± 1,1 (Uемп=0, Uкр=1, p<0,01, Uкр=3, p <0,05) (Таблица 48).

Таблица 48. Показатели шкалы функционального восстановления спинного мозга (BBB) крыс

Группа	**Период, месяц**			
	1	**2**	**3**	**4**
Норма (n=8)	21,0 ± 0,0			
Травма–контроль (n=10)	4,5 ± 0,4	6,2 ± 0,4	8,7 ± 1,1	10,9 ± 0,8
Травма + ЛП (n=10)	4,9 ± 0,7	8,1 ± 0,9	10,1 ± 1,2	13,1 ± 1,1*

Примечание: * – достоверно к контролю (p<0,05).

Далее оценку выявленного функционального эффекта СМП_2ф проводили с помощью гистологического и ультраструктурного анализа поврежденных тканей.

При сравнительном анализе структурной организации участков травмированного спинного мозга у контрольной животных и после употребления СМП_2ф существенной разницы не было обнаружено. У животных обеих экспериментальных групп регенерация нервных волокон происходила

преимущественно в поверхностной зоне боковых трактов. Нервные волокна были расположены неупорядоченно, хаотично, встречались многочисленные поперечно направленные волокна (Рисунок 58). Плотность нервных волокон в ипсилатеральных боковых трактах у крыс, в рацион которым вводили СМП_2ф, составила 6490,8 ± 707,6 шт/мм2, снижаясь относительно нормы до 48 % ($p<0,05$), и не отличалась контрольной группы животных. В зоне травмы регенерация нервных волокон через глиальный рубец также не вышла за пределы 22 % (2961,4 ± 452,6 шт/мм^2, $p<0,05$).

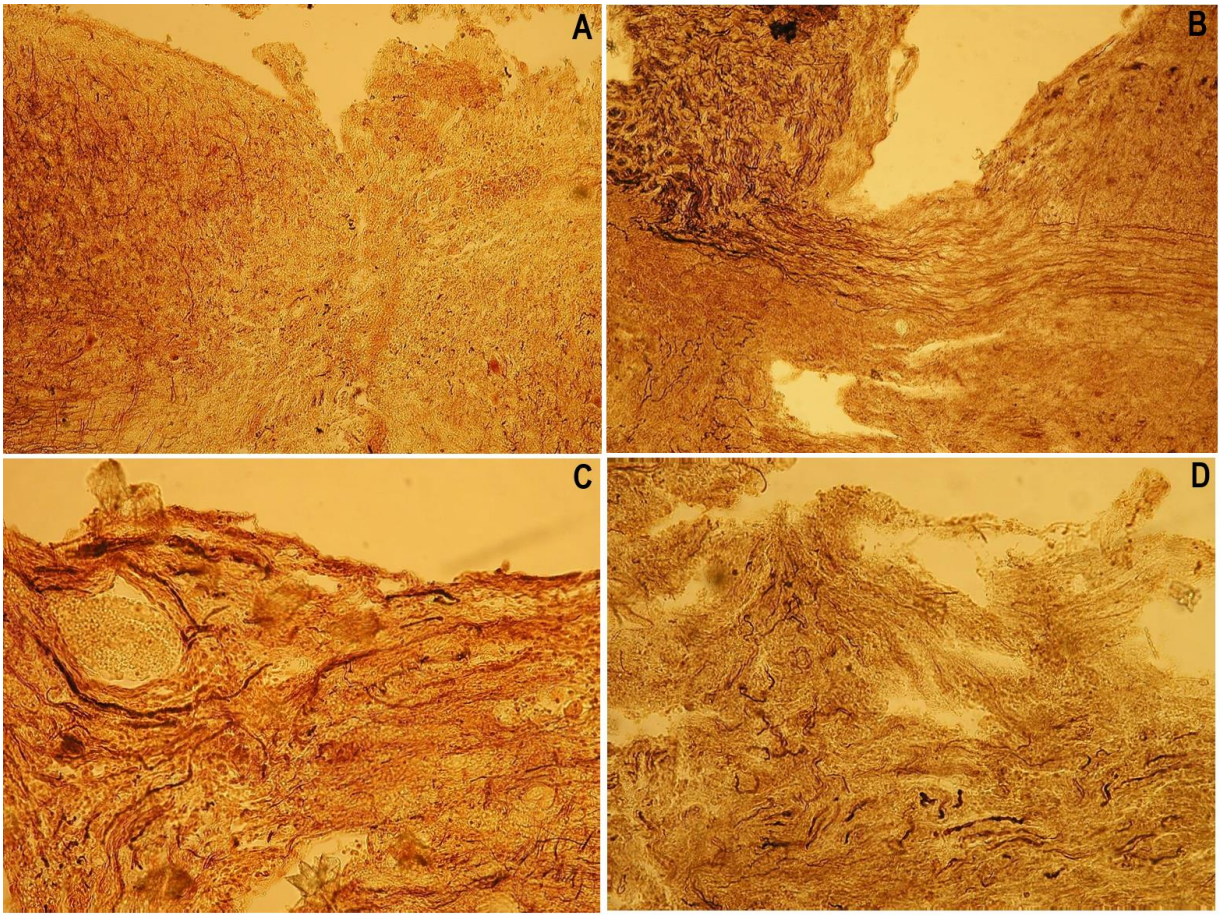


Рисунок 58 – Микрофотография спинного мозга крыс через 4 месяца после гемисекции (импрегнация серебром). Условные обозначения: A) зона травмы спинного мозга после гемисекции: деструкция ткани мозга, глиальная организация (об. 10, ок. 10); B) боковые тракты спинного мозга в зоне гемисекции: неоваскуляризация, размножение ткани мозга, глиальная организация (об. 20, ок. 10); C) дезорганизация и дислокация белого вещества спинного мозга после гемисекции и употребления СМП_2ф (об. 20, ок. 10); D) ипсилатеральные тракты спинного мозга (Т10-Т11) после левосторонней гемисекции и употребления СМП_2ф: дезорганизация ткани мозга в зоне повреждения, регенерация отдельных нервных волокон, глиальная организация (об. 20, ок. 10)

Морфометрический анализ нейронов передних рогов спинного мозга позволил выявить увеличение исследуемых показателей с ипсилатеральной

стороны относительно повреждения: средняя площадь перикарионов составляла 315,0 ± 33,9 мкм^2 (на 22 % превышала контроль и на 31,5 % снижалась относительно нормы ($p<0,05$). Со стороны контралатеральной стороны статистически значимой разницы не установлено.

Ультраструктурное исследование ткани поврежденного спинного мозга выявило, что на фоне основных структурных изменений после травмы (необратимое изменение нервных клеток вследствие механической деформации ткани мозга, разрыв микрососудов и кровоизлияние в область резекции, травмирование и деструкция нервных волокон и клеток, усиленные окклюзией микрососудов ткани мозга) регенерация спинного мозга происходит на уровне отдельных миелиновых и безмиелиновых нервных волокон, что определяется степенью фиброза, отеком мозговой ткани с эритроцитарным стазом гемокапилляров.

Установлено, что мясной продукт оказывает некоторое положительное влияние на восстановительные процессы в травмированной ткани спинного мозга. Отмечена активация глиальных клеток спинного мозга, морфологически визуализирующаяся в виде активного пиноцитоза, кластерной регенерации и миелинизации нервных волокон. Регресс очагового отека ткани спинного мозга сопровождался активной регенерацией нервных волокон и регрессом некроза структурно-функциональных единиц спинного мозга.

В ткани поврежденного спинного мозга при применении мясного продукта отмечены морфологические признаки активации глиальных клеток и регенерации нервных волокон (Рисунок 59). Установлено увеличение количества безмиелиновых нервных волокон и уровень пиноцитозной активности глиальных клеток. В миелиновых нервных волокнах отмечено частичное восстановление миелина и цитологической ультраструктуры осевого цилиндра. Превалирующее количество регенерирующих нервных волокон в ткани травмированного спинного мозга локализованы в виде кластеров. В безмиелиновых волокнах регистрируется восстановление цитоскелета и увеличение количества неповрежденных митохондрий. Вокруг нервных волокон локализовано незначительное количество

коллагеновых волокон, свободные глиоциты и единичные новообразованные синапсы между прорастающими нейритами и дендритами нейронов. Морфометрическое исследование показало, что количество ламелл миелина в регенерированных нервных волокнах составляет 19,9 ± 2,6 ламелл/волокно, т.е. достоверно больше по сравнению с травмой почти в 2 раза (p <0,01).

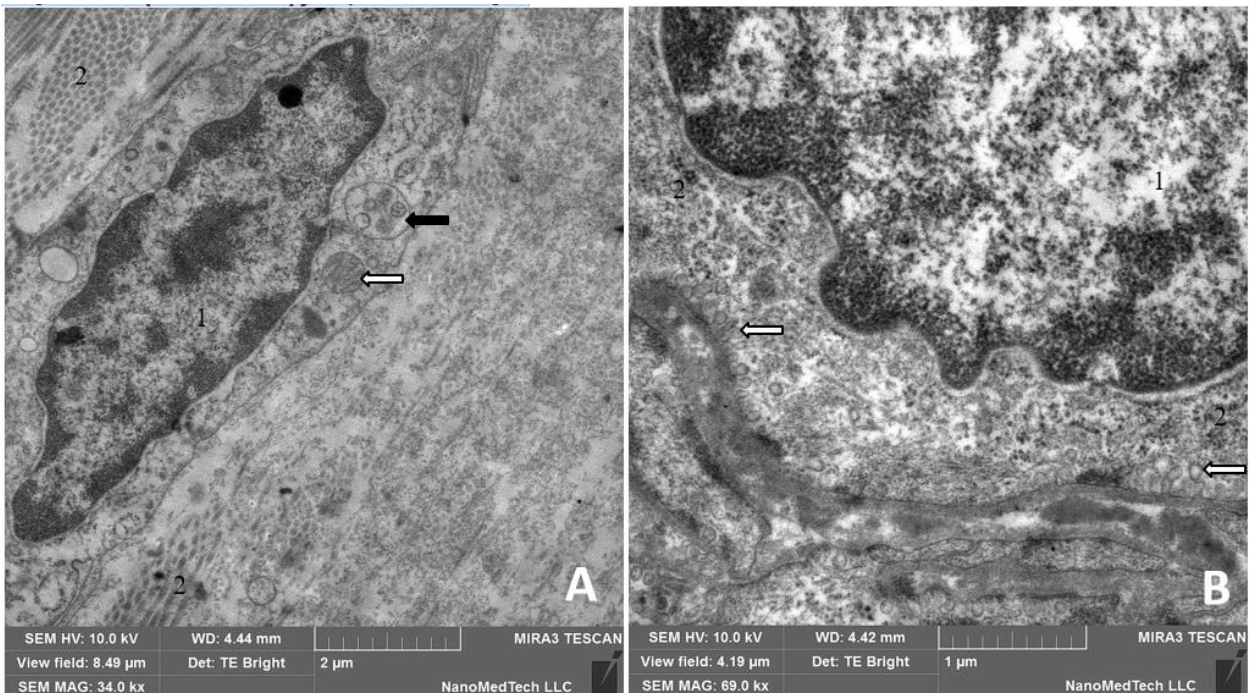


Рисунок 59 – Функционально активный глиоцит в зоне утилизации дериватов некротизированной ткани. Условные обозначения: 1 – ядро глиоцита; 2 – коллагеновые волокна; ⇦ митохондрия; ⬅ атипичные везикулы (электронограмма: ×34000). Функционально активный нейрон (В): 1 – ядро; 2 – полисомы; ⇦ пиноцитозные везикулы (электронограмма: ×69000)

На Рисунке 60 представлена микрофотография участка спинного мозга с активированными глиоцитами в зоне некроза.

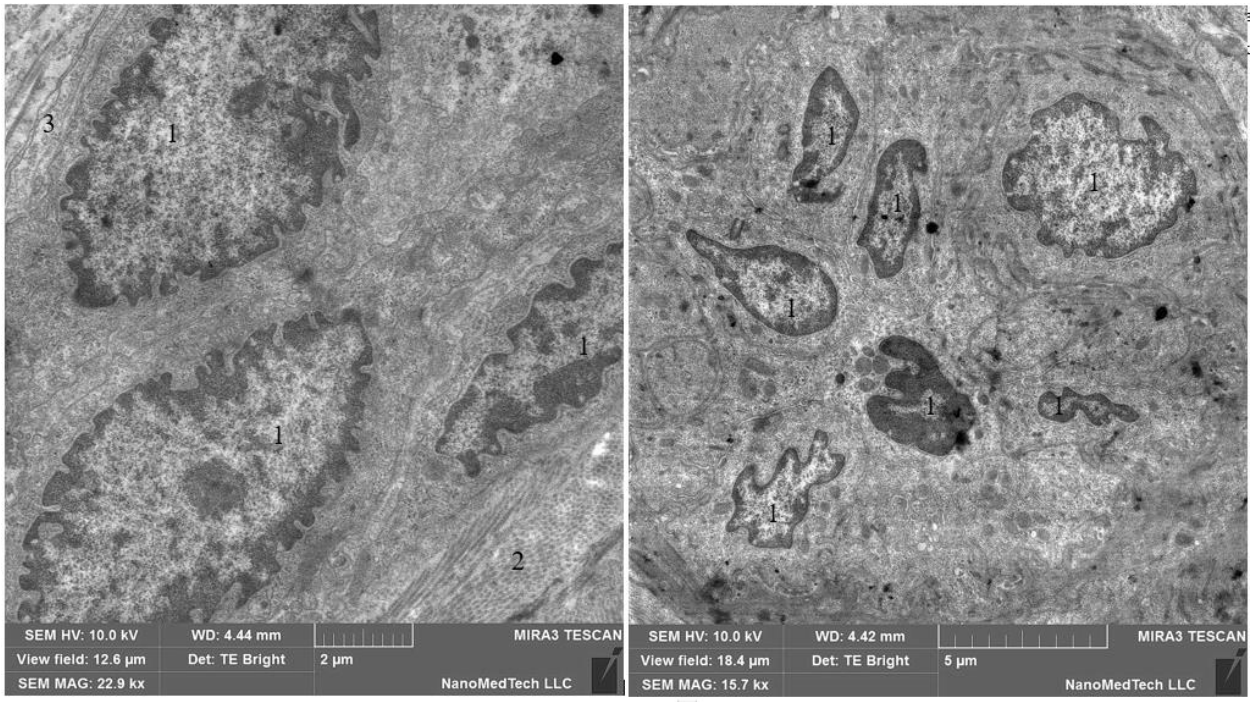


Рисунок 60 – Глиальный рубец в зоне некроза ткани спинного мозга: 1 – ядро глиоцита; 2 – коллагеновые волокна; 3 – регенерирующий осевой цилиндр (электронограмма: ×22900; электронограмма: ×15700)

При изучении характера восстановления поврежденного седалищного нерва при употреблении СМП_2ф установлен положительный терапевтический эффект: выявлено увеличение регенерации нервных волокон в проксимальном и дистальном отделах травмированного нерва. Так, в проксимальном отделе количество нервных волокон составило 5138,6 ± 438,7 шт/мм^2, а в дистальном – 3448,3 ± 419,5 шт/мм^2, что на 16,9 % и 23,1 % ($p<0,05$) больше значений группы контрольных крыс (Таблица 49).

Таблица 49. Регенерация нервных волокон седалищного нерва после невротомии

Группа	Проксимальный	Дистальный
Норма	10318,0 ± 760,0	
ТПН	4394,9 ± 454,7*	2799,2 ± 397,3*
ТПН + СМП_2ф	5138,6 ± 438,7*,**	3448,3 ± 419,5*,**

Примечания: * – достоверно к норме ($p<0,05$);

** – достоверно к травме ($p<0,05$).

В проксимальном отделе травмированного нерва отмечено формирование дополнительных кластеров регенерированных нервных волокон, большинство из которых имели выраженную миелиновую оболочку. Также отмечена активная пролиферация шванновских клеток. Между группами этих клеток нервные волокна регенерировали кластерами или поодиночке. Большинство нервных волокон были гиперимпрегнированны. В дистальном отделе также встречались спирали Перрончито и отдельные рекуррентные нервные волокна (Рисунок 61).

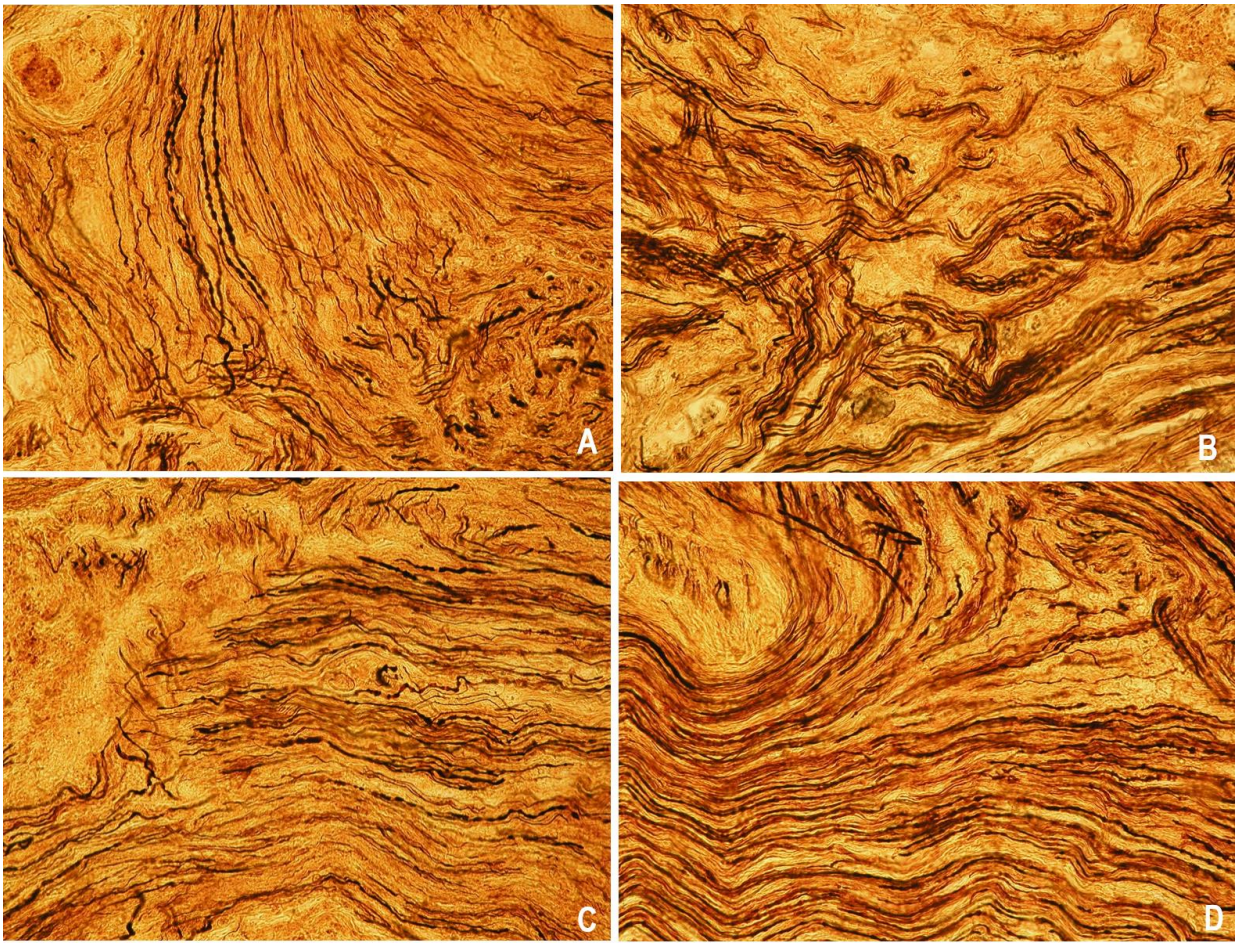


Рисунок 61 – Микрофотография фрагмента седалищного нерва крыс после невротомии и сшивания (end-to-end) (импрегнация серебром. Об. 20, ок. 10).
Условные обозначения: A, B – контрольные крысы с ТПН – регенерация нервных волокон в дистальном отделе седалищного нерва (A): рекурентные пучки волокон, разнонаправленная регенерация; пучки нервных волокон в дистальном отделе седалищного нерва после травмы (B): глиальная организация, разнонаправленная регенерация; C, D – терапия травмы СМП_2ф – нервные волокна на разных стадиях регенерации (C): глиальная организация, разнонаправленная регенерация; восстановление дистального отдела седалищного нерва после травмы (D)

Таким образом, показано, что курсовое употребление в течение 14 сут в количестве 5г/голову СМП_2ф у животных с гемисекцией оказало незначительный эффект на восстановление поврежденного спинного мозга. Достоверного увеличения регенерации нервных волокон не установлено, но отмечено увеличение морфометрических показателей нейронов, что можно рассматривать в качестве восстановительного признака активации синтетических процессов.

При этом выявлено более значимое действие на процессы регенерации нервных волокон при травматическом повреждении периферического нерва. Более существенное восстановление структуры травмированного нерва происходило в дистальном отделе, что может указывать на активацию восстановительных процессов, но не на снижение фиброзных процессов в зоне травмы.

Для более подробного изучения эффекта СМП_2ф проведены ультраструктурные исследования мышц крыс через 4 мес после ТПН. Скелетные мышцы является наиболее комплексной системой стромальных тканей и функциональных элементов – миосимпластов (мышечных волокон), сложных высокоорганизованных нервных и сосудистых сплетений. В дополнении к органеллам, которые есть в других клетках, мышечные волокна имеют сложную структурную и функциональную активность ядра (миоядер), комплексную систему вакуолярной системы (саркоплазматическая сетка) и потенциал зависимой нейротрансмиссии (Т-трубочки), специфические типы сократительных белков (миозин, актин, десмин). Нормальная функция мышцы зависит не только от сложности структуры мышечной клетки, но и от целостности и нормального функционирования кровеносных сосудов и нервных стволов, определяющих потенциал к нагрузке и восстановления. Интактная мышца на ультраструктурном уровне состоит из миосимпластов, цитоплазма которых заполнена множественными сократительными миофибриллами, межфибриллярными и перинуклеарными митохондриями и миоядрами с остальным набором органелл. Миофибриллы организованы в виде саркомеров, четко стратифицированы темные и светлые диски, телофрагмы (Z-диски) (Рисунок 62, А). Микроциркуляторное русло, главным образом, представлено гемокапиллярами соматического типа с

цельной базальной мембраной и эндотелием (Рисунок 62, В). В эндотелиоцитах регистрируются множественные пиноцитозные везикулы – показатель высокой функциональной активности.

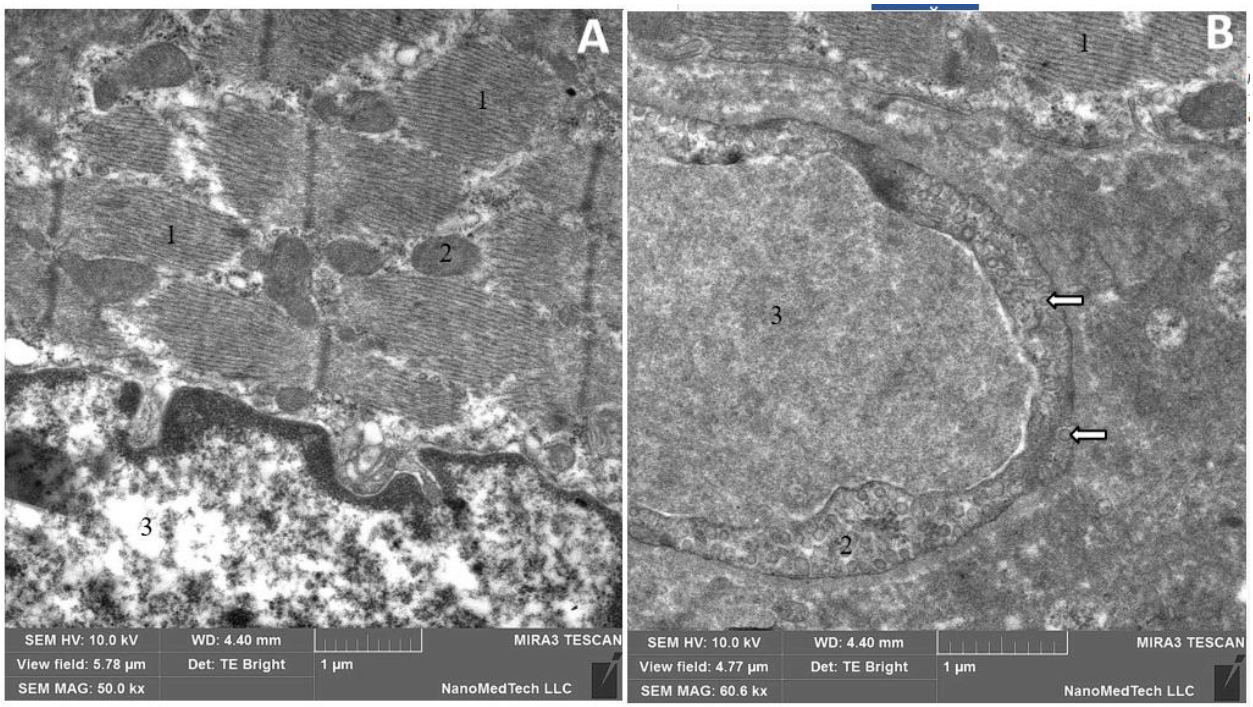


Рисунок 62 – Ультраструктура скелетной мышцы интактных животных.

Условные обозначения: А - ядро имеет незначительные инвагинации, регистрируется двумембранная организация, функциональное разделение хроматина, ядрышко; саркомеры организованы «тонкими» и «толстыми» миофибриллами, разделены межфибриллярными митохондриями (1 – миофибриллы; 2 – митохондрии; 3 – ядро (электронограмма: ×50000); В - ультраструктура гемокапилляра скелетной мышцы интактных животных: в эндотелии множественные пиноцитозные везикулы, неповрежденная базальная мембрана, периваскулярное пространства без отека интерстиция мышцы (1 – миофибриллы; 2 – эндотелий; 3 – просвет капилляра; ⇦ пиносомы (электронограмма: ×60600)

Результаты исследования мышц при ТПН показали изменения структурной организации мышечных волокон и в меньшей мере стромальных элементов органа. Установлены фокальное расслоение (нарушение плотности) мышечных волокон, отек цитоплазмы и дезорганизация саркомеров; нарушения поперечной исчерченности мышечных волокон, в основе чего лежит деструкция сократительных белковых молекул (актин-миозиновых комплексов) и элиминация саркомеров. Отмечено снижение плотности митохондрий миосимпластов, инвагинация мембраны миоядер, что можно рассматривать в качестве признака гипотрофии мышцы (Рисунок 63, А).

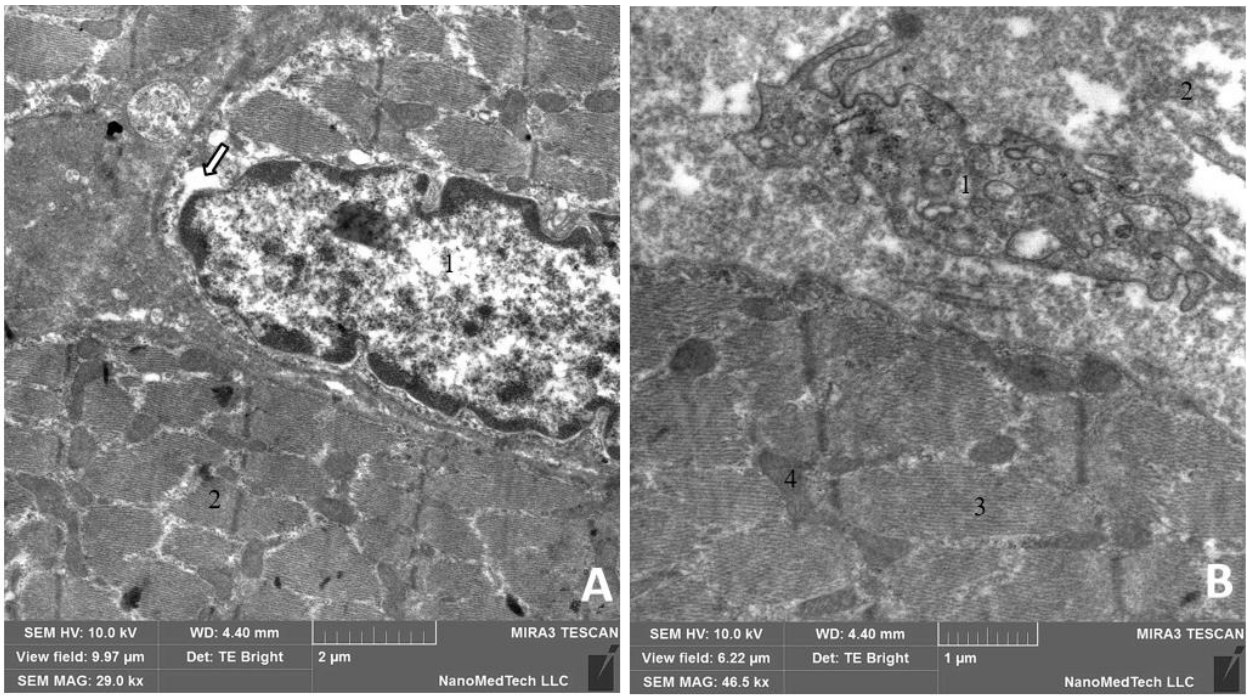


Рисунок 63 – Ультраструктура скелетной мышцы на фоне денервации. Условные обозначения: А - инвагинация нуклеолемы, фокальный перинуклеарный отек (1 – миофибриллы; 2 – ядро; ⇦ перинуклеарный отек (электронограмма: ×29000); В - дериваты разрушенных клеток мышцы на фоне денервации: миофибриллы мышечных волокон со структурно неизмененными саркомерами (1 – дериваты (коагулированные протеины и т.д.); 2 – ядро; 3 – миофибриллы; 4 – митохондрии (электронограмма: ×46500)

Отмечено изменение системы специфических мембранных систем Т-трубочек. Вокруг мышечных волокон регистрируется базальная мембрана с фибробластами на разном функциональном уровне, дериваты разрушенных клеток и элементов стромы интерстиция (Рисунок 63, В). Саркомеры существенно увеличены по длине, что обусловлено коагуляцией «тонких» и «толстых» миофибрилл. Микрососуды имели округлую или овальную форму. Отмечены эритроцитарный стаз и выраженная дилатация гемокапилляров, посткапиллярных венул и артериол, особенно резкий гемостаз отмечен в перимизии.

Таким образом, на фоне травматического повреждения нервной системы установлена инициация гипотрофического процесса на уровне отдельных структурно-функциональных единиц скелетной мышцы. Денервация мышцы вызвала вазодилятацию, изменение местной гемодинамики и, как следствие, метаболические и структурные изменения мышцы.

У опытных животных, которые получали СМП_2ф, мышечная ткань не имела признаков патологического процесса. Отмечены лишь некоторые цитологические изменения. Жировой или гидропической дистрофии, а также воспалительных реакций не выявлено. При использовании мясного продукта установлено увеличение относительной плотности частично сохранных и восстановленных саркомеров, увеличение количества межфибриллярных митохондрий. На продольных срезах мышечных волокон четко регистрируются светлые (I-диски) и темные (А-диски) диски саркомеров (Рисунок 64, А). Поперечная полосатость была равномерной, без признаков патологических изменений. В структуре мышечного волокна встречались лишь единичные ядра с инвагинациями и признаками перинуклеарного отека.

Между группами мышечных волокон встречались гемокапилляры. Превалирующее количество капилляров характеризовалось высоким трансэндотелиальным транспортом, признаком чего является резкое увеличение количества и плотности пиноцитозных везикул (пиносом) в цитоплазме эндотелиоцитов. Признаков дистрофических процессов, травматических повреждений гемокапилляров и кровоизлияний в интерстиций мышцы не установлено (Рисунок 64, Б). Регистрировали лишь единичные капилляры с эритроцитарным стазом. Пространственная организация микроциркуляторного кровеносного русла скелетных мышц определяет активность обменных процессов и зависит от степени повреждения нерва. Реакция микрососудов в зоне повреждения является одной из самых ранних реакций мышцы и имеет непосредственное отношение к развитию воспаления, атрофии и атрофии мышцы. Можно предположить, что частичное восстановление функциональных показателей микроциркуляторного русла оказало позитивное влияние на гипотрофический процесс мышцы.

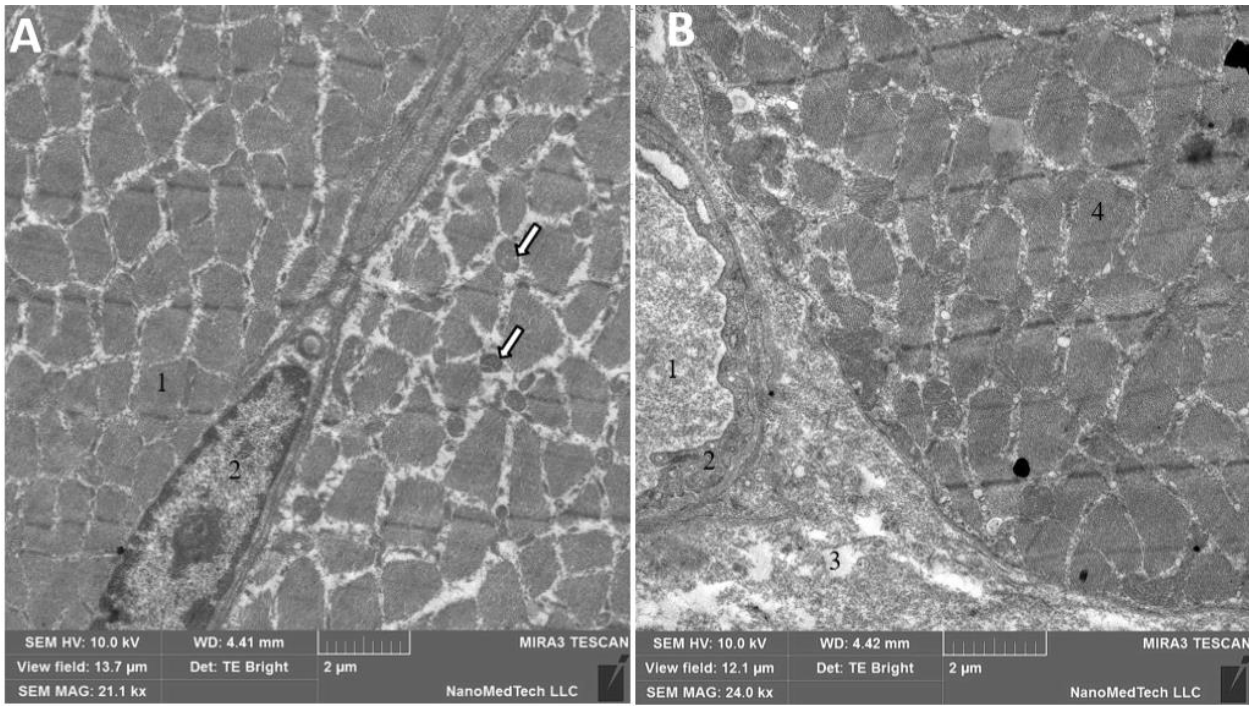


Рисунок 64 – Ультраструктура скелетной мышцы на фоне денервации и использования мясного продукта. Условные обозначения: А - структурно неизмененное ядро фибробласта, снижение отека цитоплазмы мышечных волокон; в мышечных волокон четко регистрируются светлые (I-диски) и темные (А-диски) диски саркомеров (1 – миофибриллы; 2 – ядро фибробласта; ⇦ митохондрии (электронограмма: ×21100); В - структурно неповрежденный гемокапилляр и мышечное волокно (1 – просвет капилляра; 2 – эндотелий; 3 – интерстиций; 4 – неповрежденный миосимпласт (электронограмма: ×24000)

Обобщая результаты электронномикроскопического изучения скелетных мышц после невротомии можно сделать предположение, что использование мясного продукта оказывает поддерживающее влияние на общее состояние организма травмированных животных, частным проявлением которого является трофическая поддержка кровеносных сосудов и мышц, в том числе в условиях повреждения структурных компонентов нервной системы.

Таким образом, установлено, что СМП_2ф из прижизненно-модифицированной свинины с добавлением гидролизата куриного белка (БАВ_1) при введении в рацион на протяжении 14 сут в количестве 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 и когнитивные функции на 14 сут, способствует нормализации метаболизма и активирует метаболическую активность нейронов коры мозга. При ТСМ и ТПН оказывает положительное влияние на динамику восстановления функциональной активности в отдаленные периоды за счет активации глиальных клеток спинного мозга и трофической поддержки кровеносных сосудов и мышц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ

Проведены научные исследования по практической апробации разработанного Алгоритма, включавшие изучение пищевых ингредиентов: гидролизата куриного белка, ягод годжи китайского и казахского происхождения, биомассы клеток диоскореи дельтовидной; продукты с потенциально специализированным свойствами: белково-пептидный комплекс, полученный из иммунных органов свиней, консервы мясных стерилизованных фаршевых для снижения риска развития и последствий цереброваскулярной патологии из прижизненно – модифицированного сырья, в том числе обогащенный гидролизатом куриного белка, для снижения риска развития и последствий гиперлипидемии и атеросклероза из свиных сердец и аорт, для диетотерапии патологий центральной и периферической нервной системы из прижизненно – модифицированного сырья и дополнительно обогащенный гидролизатом куриного белка.

Установлена песпективность, адекватность и эффективность разработанного Алгоритм и общих принципов процедуры исследования, позволяющего изучить специфическую активность функциональных и специализированных пищевых продуктов, с учетом природы и направленности действия биоактивных веществ, входящих в их состав для изучения продуктов и ингредиентов специализированного назначения, а также биоактивных соединений различного происхождения.

Разработанный Алгоритм позволяет оптимизировать комплекс исследований и показателей, специфичных для конкретного продукта/ингредиента/биоактивных соединений и делает возможным полное и всестороннее изучение как заявляемых характеристик, так и иных потенциальных биологических эффектов.

ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА ЧАСТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ПРОДУКТА И ДОБАВОК ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

В главе представлены технологические решения к разработке специализированного мясного продукта, обогащенного биологически активными веществами животного происхождения и капсулированной функциональной добавкой, включенной в носители.

7.1. РАЗРАБОТКА ЧАСТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО МЯСНОГО ПРОДУКТА

Полученные результаты сравнительного исследования мясных продуктов, приведенные в главе 6.3.2, а также пилотная технология, описанная в главе 4.2, нашли продолжение в разработке частной рецептуры специализированного мясного продукта из прижизненно-модифицированного сырья, обогащенного белковым гидролизатом, (консервы мясные стерилизованные фаршевые биокоррегирующего действия) для диетотерапии патологий центральной и периферической нервной системы.

Рецептура специализированного мясного продукта из прижизненно-модифицированного сырья, обогащенного белковым гидролизатом, включает: 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% включительно.

На основании рецептуры были изготовлены опытно-промышленные партии консервов мясных стерилизованных фаршевых биокоррегирующего действия. Технологический процесс производства опытно-промышленной партии специализированного мясного продукта из прижизненно-модифицированного

сырья, обогащенного белковым гидролизатом, представлен на рисунке 61 и заключался в следующих стадиях (Рисунок 65):

- входной контроль и приемка сырья: верификацию мясного сырья, пищевых ингредиентов и материалов, используемых для производства продукта, осуществляется в соответствии с ГОСТ 24297–2013; мясное сырье оценивается на соответствие в соответствии с требованиями ГОСТ 7269-2015 и ТУ 9211-956-00419779-10 «Свинина для диетического питания»;
- подготовка сырья: для мясного сырья в тушах, полутушах, четвертинах и отрубах включает осмотр и при необходимости дополнительную зачистку (от загрязнений, остатков шерсти, щетины, диафрагмы и т.п.) и/или промывку холодной водопроводной водой с температурой не выше 20 °С), разделку, обвалку и жиловку; для замороженного мясного сырья в тушах, полутушах, четвертинах, отрубах и блоках из нежилованного мяса – размораживание, взвешивание, разделку, обвалку и жиловку; мясное сырье жилованное в блоках выдерживают при температуре от 0 до 4°С в течение 24 – 48 ч до достижения температуры в толще блока от –8 °С до –5 °С;
- измельчение мясного сырья: мясное сырье загружается в куттер и измельчается при 3000 об/мин до получения однородной массы (2 – 3 мин);
- составление фаршевой системы: измельченное мясное сырье загружается непосредственно в камеру гомогенизации; питьевую воду, поваренную соль, крахмал, белковый гидролизат (БАВ_1) подается в камеру гомогенизации через вакуумное устройство насосом; для составления гомогенной массы и пюреобразной консистенции устанавливают скорость измельчения 3500 об/мин, визуально определяя степень перемешивания и гомогенизации, производят нагрев паштетной массы до температуры (70 ± 5) °С;
- фасование: готовую массу фасуют в тару из комбинированного материала для консервируемой продукции по ГОСТ 13534-2015 либо в полимерные многослойные пленки по ГОСТ 12302-2013 массой нетто 100 г; наполнение банок и пакетов производят в ручную, термозапечатывание банок

плоскими крышками с язычками и пакетов – с использованием фасовочно-упаковочной машины; герметичность запаивания банок и прочность сварочного шва проверяют согласно НД; наполненные банки и пакеты подвергают контрольному взвешиванию;

- стерилизация: укупоренные банки, либо пакеты загружают в автоклавные корзины и стерилизуют в вертикальном автоклаве при температуре 115 ºС в течение 35 мин, противодавление составляет (0,20 –0,22) Мпа;
- сортировка, упаковка, контроль качества: после охлаждения банки и пакеты выгружают из автоклавных корзин, передают на сортировку и мойку.

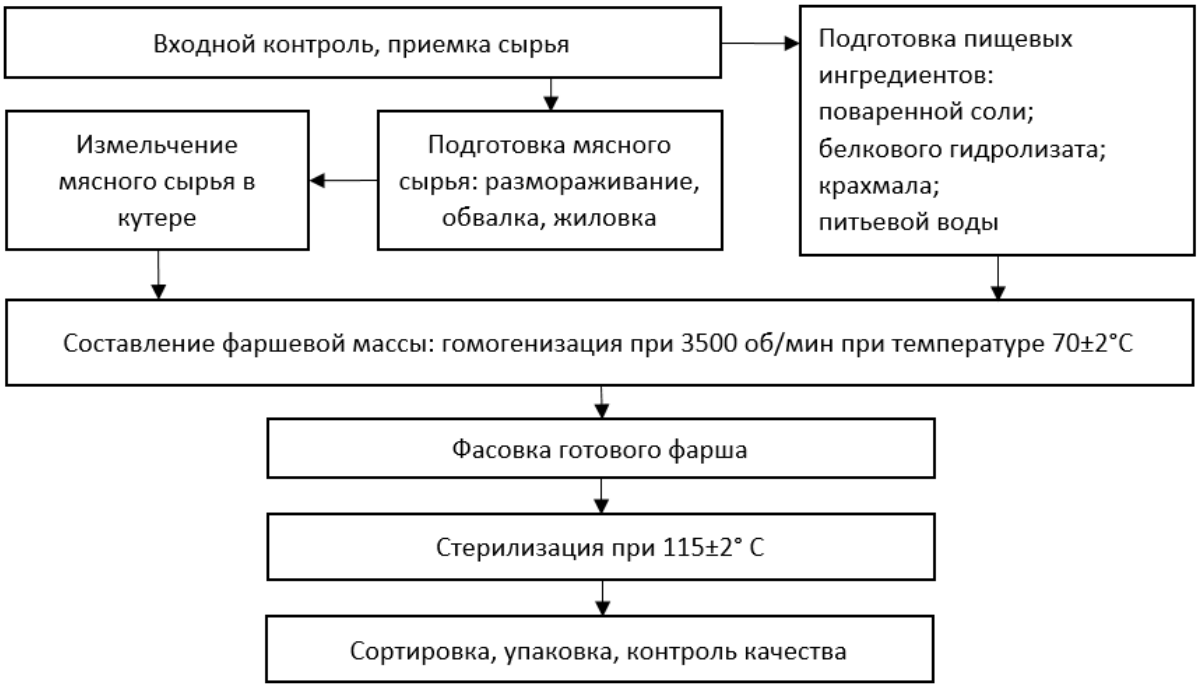


Рисунок 65 – Технологическая схема производства опытно-промышленной партии специализированного мясного продукта из прижизненно-модифицированного сырья, обогащенного белковым гидролизатом

Характеристика продукции представлена в Таблице 50. 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 °С и относительной влажности воздуха (75 ± 5) %.

Срок годности мясных продуктов в таре из комбинированных материалов и многослойных пакетах – не более 6 мес, после вскрытия рекомендуется хранить не более 48 ч при температуре от 0 до 6 °С.

Таблица 50. Органолептические и физико-химические показатели для специализированных фаршевых консервов из свинины, обогащенных белковым гидролизатом

Показатель	Характеристика
Внешний вид	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.
Запах и вкус	Свойственные свинине, вкус слабосоленый, без посторонних запаха и вкуса
Консистенция	Сочная, некрошливая, упругая
Посторонние примеси	Не допускаются
Массовая доля свинины (по закладке), %, не менее	65,0
Массовая доля белкового гидролизата (по закладке), %, не менее	2,0
Массовая доля белка, %, не менее	10,0
Массовая доля жира, %, не более	10,0
Массовая доля крахмала (по закладке), %, не более	3,0
Массовая доля хлористого натрия (поваренной соли), %	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 по показателям промышленной стерильности (отсутствие мезофильных аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов), содержанию токсичных элементов (свинец, мышьяк, кадмий, ртуть в 3 – 5 раз ниже допустимых уровней).

Далее в рамках работы произведен расчет экономической эффективности на 100 кг специализированного мясного продукта из прижизненно-модифицированного сырья, обогащенного белковым гидролизатом, на основании «Методических указаний по учету затрат и калькулированию себестоимости мяса и мясных продуктов» (ВНИИМП, 2010).

В Таблице 51 приведен расчёт стоимости сырья и основных материалов для производства специализированного мясного продукта (паштета). Норма расхода на 1000 (одну тысячу) физических банок была определена с учётом рецептур и выходов готового продукта.

Таблица 51. Расчёт стоимости сырья и основных материалов для производства специализированных фаршевых мясных консервов

Ингредиент	**Норма расхода на 1000 банок (100 г), кг**	**Цена за 1 кг, руб.**	**Сумма, тыс. руб.**
Свинина жилованная с массовой долей жировой ткани не более 30%	65,0	315,0	20,48
Гидролизат куриного белка	2,0	2 600,0	5,20
Крахмал картофельный	3,0	67,0	0,20
Соль поваренная	0,3	7,5	0,002
Вода питьевая	29,7	24,5	0,73
ИТОГО			**26,61**

Расчет стоимости вспомогательных и упаковочных материалов для производства специализированного мясного продукта приведен в Таблице 52.

Таблица 52. Расчёт стоимости тары и упаковочных материалов для производства специализированных фаршевых мясных консервов

Наименование	**Норма расхода, шт.**	**Цена в руб. за 1 шт.**	**Сумма, тыс. руб.**
Банки из ламистера	1010	2,5	2,53

В Таблице 53 представлен расчёт затрат на оплату труда производственных рабочих в соответствии с «Нормативами технологической трудоемкости на продукцию полуфабрикатного и консервного производств» (ВНИИМП, 2005).

Таблица 53. Расчёт затрат на оплату труда производственных рабочих при производстве специализированных фаршевых мясных консервов

Наименование	Технологическая трудоемкость, ч	Часовая тарифная ставка, руб.	Затраты на оплату труда, тыс. руб.
Паштет из свинины	14,79	115,0	1,70

В Таблице 54 приведён расчёт стоимости энергозатрат в соответствии с «Инструкцией по нормированию расхода топлива, тепловой и электрической энергии для предприятий» (ВНИИМП, 2005).

Таблица 54. Расчёт стоимости энергозатрат при производстве специализированных фаршевых мясных консервов

Наименование	Единица измерения	Норма расхода за единицу измерения	Цена в руб. за 1 едницу измерения **	Сумма, тыс. руб.
Теплоэнергия	тыс. ккал	170,0	1,28	0,22
Электроэнергия	кВт·ч	9,0	3,6	0,03
Вода	$м^3$	1,16	22,0	0,03
ИТОГО				**0,28**

Примечание: ** – среднеотраслевые цены.

В Таблице 55 приведена сводная калькуляция себестоимости производства специализированного мясного продукта (паштета), калькуляционная единица была принята как 1000 физических банок.

Таблица 55. Калькуляция себестоимости специализированных фаршевых мясных консервов

№ п/п	Статья затрат	Сумма, тыс. руб.
1	**Сырье и основные материалы**	26,61
2	**Тара и упаковочные материалы**	2,53
3	**Топливо и энергия на технологические цели**	0,28
4	**Затраты на оплату труда производственных рабочих**	1,70
5	**Цеховые и общезаводские затраты**	3,89
6	**Производственная себестоимость**	35,01
7	**Прибыль**	1,75
8	**Оптовая цена**	36,76
9	**НДС 10%**	3,68
Оптово-отпускная цена		**40,44**

Таким образом, оптовая стоимость 1000 банок специализированного мясного продукта (паштета) составляет 40,44 тыс. руб. Оптово-отпуская цена 1 банки специализированного мясного продукта (паштета) составляет 40,44 руб.

Стоит отметить, что розничнаяцена паштетов в торговой сети составляет: 111 руб. – для паштета с мясом свинины ж/б «Вкусвил» (мясные компоненты: печень свиная охлажденная (32,2%), свинина (28,8%); нетто: 190 г).

7.2. РАЗРАБОТКА ЧАСТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ КАПСУЛИРОВАННОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ДОБАВКИ

На основании исследований, описанных в главе 5.2.1, которые выявили непригодность использования агарозы в качестве носителя для таргетной доставки белково-пептидных соединений в тонкий кишечник (гидрогель полностью растворялся в условиях «желудка»), и необходимость подбора концентраций альгината натрия и сшивающего агента (хлорида кальция) для обеспечения более полной сорбции соединений белковой природы, был проведен эксперимент по подбору оптимальных условий иммобилизации БАВ_2.

Данный эксперимент, в свою очередь, основывался на результатах предварительного исследования, описанных в главе 4.1, и включал вариацию концентраций альгината натрия (1,0 %, 1,2 %, 1,5 %) и хлорида кальция (0,5 %, 1,5 % и 2 %). В рамках данного исследования оценивали: величину сорбции белково-пептидных соединений в носитель путем измерения в формирующем растворе кальция хлорида остаточной концентрации белка биуретовым методом; функциональные характеристики капсул; деградацию полисахаридных капсул и характера высвобождения целевых веществ в кислотно-основной среде ЖКТ на модели С.

Капсулы с наилучшими функциональными свойствами – сферической формы, упругие – образовались при концентрации альгината натрия 1,2 %. Максимальная степень включения в капсулы наблюдалась при концентрации кальция хлорида 0,5 % (88 ± 2)% (Рисунок 66).

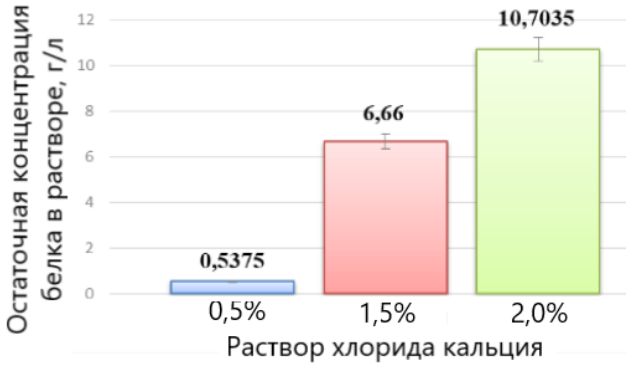


Рисунок 66 – Остаточная концентрация белка в формирующих растворах хлорида кальция

На Рисунке 67 представлена диаграмма высвобождения белково-пептидных соединений из кальций-альгинатных капсул на модели ЖКТ (С), описанной в главе 5.2.1. В среде с pH 1,5 отмечено минимальное высвобождение белковых соединений (не превышало 8 %); в среде с pH 6,0 капсулы также не претерпевали значительных изменений, отмечено небольшое увеличение массы (на 30 %) за счет набухания. Максимальная степень высвобождения (75,56 и 84,58 %) наблюдалось в среде с pH 7,4, что соответствует условиям тонкого кишечника.

Полученные данные свидетельствует о том, что разработанные капсулы устойчивы к кислой среде желудка и почти полностью деградируют в условиях, имитирующих кислотно-основную среду двенадцатиперстной кишки через 220 – 230 мин.

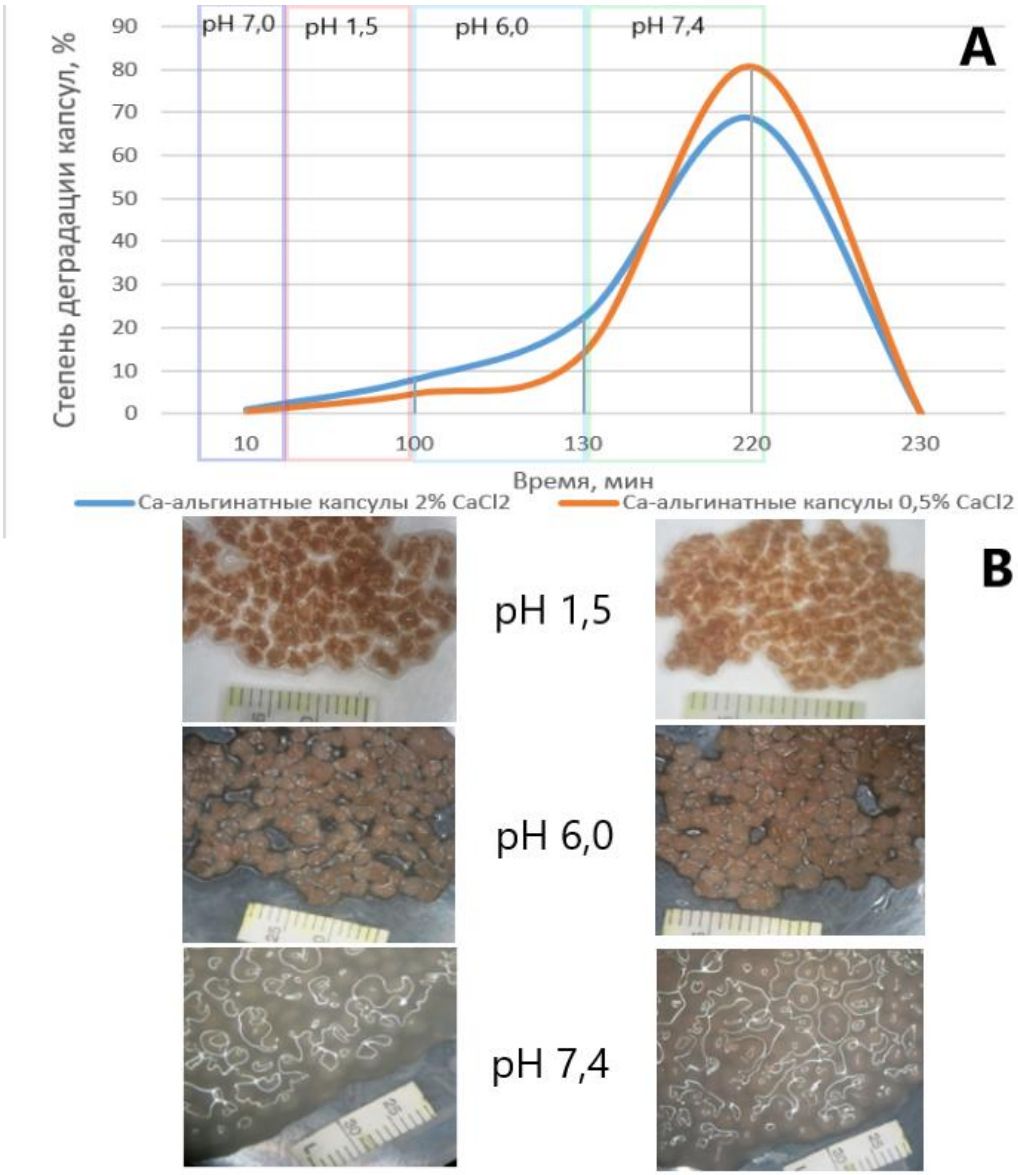


Рисунок 67 – Диаграмма высвобождения белковых соединений (А) и фотографии кальций альгинатных капсул с включенным БАВ_2 (В) в условиях кислотно-основной среды ЖКТ

Далее были проведены исследования по изучению сохранения биологической активности белково-пептидных комплексов, высвобожденных из капсул. Для этого оценивали пролиферативные и тканеспецифичные свойства образца, полученного на конечной стадии модели ЖКТ, БАВ_2 и кальций-альгинатных капсул «пустышек» *ex vivo* на эксплантатах ткани головного мозга (эктодерма), печени (энтодерма) и мышц (мезодерма) куриного эмбриона (n=240). Установлено, что при инкубировании тканей в среде с добавлением исследуемого образца (50 нг/мл) зона

роста эксплантатов коры головного мозга увеличивалась в среднем на 59,8 %, печени – на 89,3% и мышц – на 139,2 % (Рисунок 68). БАВ_2 оказывал более выраженный эффект на рост выселяющихся клеток. Однако он полностью теряет активность в процессе переваривания. Также отмечено, что альгинат натрия оказывает незначительное стимулирующее действие на рост тканей (увеличение периферической зоны эксплантатов на 15 – 20 %).

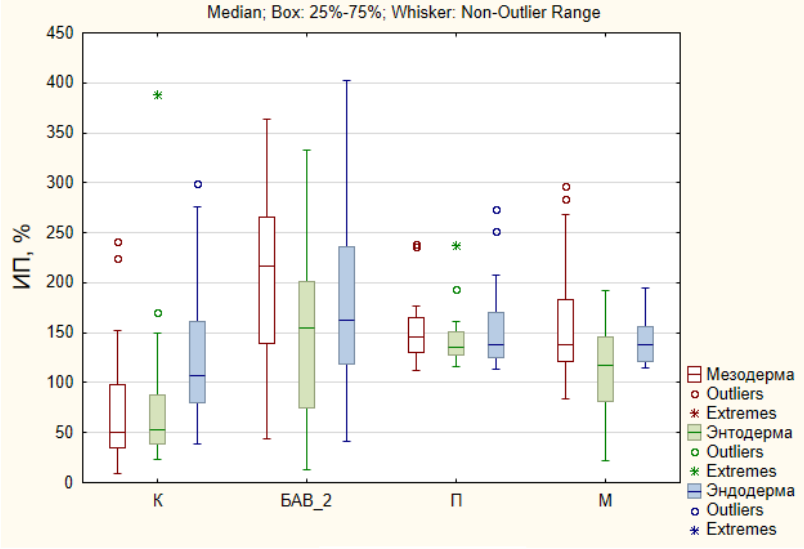


Рисунок 68 – Результаты изучения биологической активности белково-пептидных комплексов, высвобожденных из кальций-альгинатных капсул после моделирования кислотно-основной среды ЖКТ: К – контрольные эксплантаты; П – капсулы-«пустышки»; М – белково-пептидные комплексы, высвобожденные из капсул

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что подобранные условия формирования кальций-альгинатных капсул (концентрация альгината натрия – 1,2 %, концентрация кальция хлорида – 0,5 %) обеспечивают максимальную степень включения (88 ± 2 %), сохраняют целостность и биологические свойства БАВ_2 в агрессивных условиях ЖКТ, позволяют доставить целевые соединения в тонкий отдел кишечника, обеспечивая пролонгированное действие целевых соединений.

В эксперименте *ex vivo* показано, что соединения БАВ_2 после прохождения ЖКТ сохраняют активность, способствуют росту и дифференцировке

органотипических клеток мезедермального происхождения. Последний факт свидетельствует о тканеспецифичности соединений БАВ_2 к иммунным органам, развивающимся из мезодермального листка зародыша.

Конечная технология производства капсулированной функциональной добавки представлена на Рисунке 69 и включала следующие стадии:

- входной контроль и приемка сырья: верификация сырья и материалов, используемых для производства в соответствии с ГОСТ 24297–2013;
- подготовка сырья: для сырья замороженного в блоках – выдерживание при температуре от 0 до 4 °С в течение 24 – 48 ч до достижения температуры в толще блока от –8 до –5 °С; для охлажденного сырья – зачистка мезентеральных лимфатических узлов селезенки и тимуса от сопутствующих тканей (капсулы, жира), промывка, измельчение на куски 5 × 5 см, замораживание при температуре –40 °С, выдерживание при температуре от 0 до 4 °С в течение 24 – 48 ч до достижения температуры в толще блока от –8 до –5 °С;
- измельчение сырья по отдельности: подмороженное сырье измельчают с использованием промышленной мясорубки при низкой температуре;
- экстракция: проводили 0,9%-ым раствором натрия хлорида, приготовленном на основе воды с модифицированным изотопным составом (40 ppm дейтерия) в соотношении сырье : экстрагент равном 1:5, при температуре 4 – 5 °С и скорости 400 об/мин в течение 30 мин для тимуса и 75 мин для селезенки и мезентеральных лимфоузлов при дополнительном увеличении скорости до 3000 об/мин за 3 мин до завершения процесса экстракции; полученные экстракты тканей центрифугировали при 12000 об/мин, 4°С, в течение 5 мин, осадок утилизировали;
- приготовление комплексного экстракта: надосадочную жидкость полученных экстрактов смешивали в соотношении 1:1:1 (по содержанию белка в экстрактах) для достижения концентрации белка 21,0 ± 1,0 г/л;
- смешивание комплексного экстракта и раствора альгината натрия: полученную смесь экстрактов соединяли с 1,2%-ым раствором альгината натрия и гомогенизировали при 800 об/мин в течение 30 мин;

- получение капсул: пропускание суспензии с использованием перистальтического насоса по каплям в формирующий раствор 2%-ого раствора хлорида кальция при непрерывном перемешивании; полученные капсулы промывают дистилированной водой и лиофильно высушивают при –40 °С и 1,5 мПа;
- упаковка и контроль качества.

Проведённые технологические расчеты по измерению массы и числа капсул, количеству иммобилизованного белка показали, что средняя масса одной сухой капсулы составляет $0{,}55 \times 10^{-3}$ г. При этом средняя масса белковых соединений, содержащихся в 1 капсуле равна $1{,}28 \times 10^{-4}$ г.

Рисунок 69 – Технологическая схема производства опытно-промышленной партии капсулированной функциональной добавки

В соответствии с Алгоритмом проведено исследование альгинатных капсул с включенным БАВ_2 *in vivo* на поросятах-отъемышах трех пометов (n=25), сформированных на группы:

Группа 1 – опытная, состоящая из маловесных поросят (n=15; массой 1,70[1,37 – 1,85] кг);

Группа 2 – контрольная, состоящая из крупных поросят (n=10; массой 2,72 [2,22 – 2,95] кг).

Поросятам группы 1 перорально индивидуально вводили (200 мг/голову) капсулированную функциональную добавку. Поросятам группы 2 перорально индивидуально вводили эквивалентный объем воды. На протяжении 28 сут животные потребляли полнорационный комбикорм СК-7. На 0, 7, 14 и 21 сут выполняли взвешивание и ветеринарный осмотр поросят. На 0, 14 и 28 сут производили отбор крови из яремной вены для гематологического, биохимического, иммуноферментного анализов.

В результате эксперимента отмечено, что на 3 и 4 нед. масса тела животных группы 1 увеличивалась на 33,1 % ($p<0,001$) и 12,2 % ($p=0,064$) относительно группы 2 (Таблица 56).

Таблица 56. Привесы поросят в течение 28 сут при введении функциональной капсулированной добавки

Группа	**Начальная масса, кг**	**Масса на 28 сут, кг**	**Недельный привес, %**			**Привес за 28 сут, %**
			0 – 7 сут	**7 – 14 сут**	**14 – 21 сут**	
Группа 1 (контроль)	2,54 [2,06 –2,64]	3,96 [3,64– 5,57]	7,13 [6,50 – 13,64]	9,07 [6,40 – 13,64]	31,57 [15,53–43,90]	69,79 [53,70–91,17]
Группа 2 (опыт)	1,54* [1,24 – 1,66]	3,37 [3,05– 4,45]	15,29* [12,33 – 19,04]	17,32* [12,69–20,72]	73,13 [11,49–127,44]	150,85 [72,35–285,63]

Выявлены изменения биохимических показателей, характеризующих обмен белка, на 14 сут: у животных группы 1 – 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 группы 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% ($p=0,005$). На 28 сут отмечена тенденция к увеличению кретинина и мочевины у поросят группы 1. При межгрупповом сравнении у животных группы 1 на 14 и 28 сут выявлено достоверное увеличение альбумина на 12,3 и на 16,8 %; мочевины – на 17,1и на 38,5%; содержание белка было увеличено на 11,5% на 28 сут (Таблица 57).

Таблица 57. Результаты анализа крови поросят

Показатель	Группа	Период эксперимента, сут			p-value	
		T0 (0 сут)	T1 (14 сут)	T2 (28 сут)	T0vsT1	T1vsT2
WBC	1_K	23,17 [20,44-26,17]	25,16 [19,83-30,24]	26,38 [22,91-33,66]	0,100	0,433
	2	20,14 [17,03-24,26]	25,65 [21,07-28,45]	30,22 [25,17-31,65]	0,069	0,204
RBC	1_K	7,12 [4,27-7,71]	6,84 [6,32-7,33]	6,27 [5,72-7,14]	0,167	0,161
	2	5,19 [4,49-6,43]	6,93 [6,31-7,40]	6,68 [5,94-7,60]	**<0,001**	0,424
HGB	1_K	87,50 [79,75-108,25]	104,00 [93,50-113,00]	111,00 [98,75-119,25]	0,126	**<0,001**
	2	79,00 [63,00-95,50]	111,50 [102,00-121,50]	114,50 [102,50-126,00]	**<0,001**	0,416
HCT	1_K	22,66 [20,81-28,47]	27,67 [24,03-31,87]	28,88 [25,70-31,28]	0,279	0,073
	2	22,33 [17,83-26,78]	29,33 [25,94-33,49]	30,64 [26,86-35,46]	**0,004**	0,228
PLT	1_K	837,01 [566,75-1315,50]	502,50 [403,50-725,50]	485,50 [291,75-771,50]	**0,007**	0,218
	2	819,50 [607,00-2266,00]	614,00 [533,25-928,50]	403,00 [295,00-618,75]	**<0,001**	**0,003**
PCT	1_K	0,59 [0,37-1,26]	0,38 [0,30-0,46]	0,37 [0,19-0,55]	**0,007**	0,296
	2	0,72 [0,35-2,36]	0,49* [0,39-0,68]	0,32 [0,22-0,50]	**0,004**	**0,014**
MPV	1_K	8,01 [6,28-10,63]	6,70 [6,20-7,60]	7,20 [6,35-7,73]	**0,014**	0,647
	2	6,80 [6,30-11,35]	7,95* [6,83-8,38]	7,45 [7,13-8,10]	0,315	0,949
Total protein	1_K	62,10 [60,43-69,03]	59,00 [57,38-60,83]	55,68 [51,48-58,68]	**0,028**	0,465
	2	64,90 [63,65-68,65]	61,00 [58,98-64,00]	62,90* [59,40-65,48]	**0,005**	0,889
Albumin	1_K	43,20 [41,70-45,88]	35,75 [34,18-38,88]	30,95* [29,88-32,10]	**0,013**	0,109
	2	46,40* [44,80-49,45]	40,75* [39,15-42,48]	37,18 [36,65-38,55]	**0,002**	0,176
Creatinine	1_K	64,05 [58,30-68,45]	49,25 [43,08-53,58]	51,38 [47,92-55,31]	**0,005**	0,465
	2	57,80 [56,35-64,35]	52,30 [48,70-55,05]	54,75 [53,43-60,70]	**0,023**	0,093
Urea	1_K	7,75 [6,18-15,16]	3,96 [3,30-4,50]	3,05 [2,89-3,24]	**0,005**	0,465
	2	7,81 [6,12-13,03]	4,78* [3,86-5,16]	4,96* [4,66-5,33]	**0,001**	0,069
Прямой билирубин	1_K	2,56 [2,07-3,10]	2,08 [1,78-2,40]	2,26 [1,95-2,84]	0,114	1,000
	2	4,41* [3,73-5,89]	3,20* [2,47-4,83]	2,45 [2,01-2,73]	0,156	0,401

продолжение Таблицы 57

Общий билирубин	1_К	2,87 [2,26-3,92]	2,39 [2,26-2,94]	2,92 [2,50-3,49]	0,374	1,000
	2	6,58* [4,96-8,08]	4,11* [3,48-5,31]	2,84 [2,56-3,38]	0,088	0,263
AST	1_К	28,55 [25,40-43,60]	35,45 [31,55-47,48]	36,40 [27,30-48,88]	0,203	1,000
	2	45,10* [39,60-58,35]	28,20 [26,30-36,40]	46,65 [35,78-57,53]	**0,027**	0,208
ALT	1_К	26,25 [22,90-33,48]	34,70 [32,55-40,30]	28,05 [27,53-34,30]	0,114	0,273
	2	47,30* [37,75-49,50]	27,40 [23,20-44,60]	26,43 [25,58-31,23]	**<0,001**	0,093
LDG	1_К	463,40 [458,83-530,33]	459,80 [411,03-575,88]	522,40 [411,93-624,48]	0,646	0,273
	2	587,20* [532,05-719,70]	439,1 [394,25-521,45]	539,60 [525,35-638,90]	**0,005**	**0,017**
GGT	1_К	41,34 [39,50-44,37]	30,48 [29,03-38,18]	26,11 [24,33-29,00]	**0,013**	0,068
	2	41,57 [36,86-45,46]	42,96 [34,50-52,67]	37,95* [32,56-41,09]	0,691	0,484
ALP	1_К	317,35 [204,98-441,95]	150,55 [111,65-166,80]	124,35 [108,13-141,75]	**0,007**	0,715
	2	432,05 [279,30-507,18]	165,10 [139,90-211,10]	250,95* [188,93-308,38]	**0,001**	**0,025**
TGr	1_К	0,27 [0,24-0,46]	0,46 [0,36-0,58]	0,72 [0,62-0,85]	0,333	0,144
	2	0,45* [0,38-0,69]	0,54 [0,44-0,66]	1,13* [1,06-1,23]	0,426	**0,012**
CHolesterol	1_К	8,41 [5,72-11,33]	5,56 [4,98-6,18]	2,24 [2,09-2,43]	**0,007**	0,144
	2	7,32 [5,95-9,86]	5,30 [4,50-5,65]	3,08* [2,67-3,46]	**<0,001**	0,093
GLU	1_К	7,45 [7,05-8,35]	1,98 [1,85-2,21]	3,40 [3,05-3,98]	**0,005**	0,273
	2	7,50 [5,40-7,90]	2,39 [2,06-2,78]	4,75 [4,55-5,33]	**0,036**	0,933

Среди показателей, характеризующих липидный обмен, отмечено: на 14 сут у животных группы 1 и 2 – снижение ОХС на 27,6 % ($p<0,001$) и на 33,9 % ($p=0,007$); на 28 сут у животных группы 2 – увеличение ТГ на 52,2 % ($p=0,012$). В сыворотке крови животных группы 1 и 2 на 14 сут относительно 0 сут выявлено снижение содержания глюкозы на 68,1 % ($p=0,036$) и на 73,4 % ($p=0,005$). Среди ферментных показателей: на 14 сут у поросят группы 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 группы 2 снижалась активность ГГТ на 26,3 % (p=0,013) и ЩФ на 52,6 % (p=0,007). При межгрупповом сравнении у животных группы 1 в начале эксперимента отмечено статистически значимое 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 крови животных 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 группы 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 группы 1, которая составила 52,34 [50,47 – 53,27] против 71,03 [62,15 – 82,24] для контроля (Таблица 58).

Таблица 58. Результаты иммуноферментного анализа крови поросят

Показатель	**Группа**	**Период эксперимента, сут**			**p-value**	
		T0 (0 сут)	**T1 (14 сут)**	**T2 (28 сут)**	**T0vsT1**	**T1vsT2**
IL2	1_K	634,27 [292,98-815,98]	795,72 [709,79-1217,10]	946,29 [647,82-2093,14]	0,114	0,333
	2	352,02 [199,02-493,32]	1182,24 [847,92-1611,18]	1580,07 [1158,58-2505,14]	0,001	0,023
IL4,	1_K	63,14 [29,44-78,45]	42,14 [33,03-49,09]	41,37 [32,60-104,54]	0,203	0,333
	2	18,90 [13,14-35,84]	21,01 [19,55-33,64]	116,83 [54,53-180,02]	0,311	0,002

Выявлены количественные изменения показателей, характеризующих функциональное состояние эритроцитов и тромбоцитов: у поросят группы 1 отмечено на 14 сут относительно 0 сут увеличение RBC и HGB на 25,1 % и на 29,1 % (p<0,001), HCT на 23,9 % (p=0,004); снижение PLT на 25,1 % (p<0,001) и PCT на 31,9 % (p=0,004); на 28 сут относительно 14 сут – снижение PLT на 34,4 % (p=0,003) и PCT на 34,7 % (p=0,014); у поросят группы 2 на 14 сут относительно 0 сут –

уменьшение PLT на 40,0 % (p=0,007), PCT 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 PCT и MPV на 22,4 и 15,7% (p<0,05) на 14 сут у поросят группы 1.

В результате доказана эффективность применения БАВ_2, включенного в альгинатные капсулы 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.

Для изучения эффективности самоорганизующихся наноструктур с включенными биоактивными соединениями БАВ_2 (лиотропные жидкие кристаллы (ЛЖК) и микроэмульсии (МК) для перкутанного использования), полученные по технологии Мурашовой Н. М. (2017), было проведено исследование *in vivo* на мышах (интактных – М, n=11) с моделью плоскостной раны (n=57), сформированных на группы (Рисунок 70 А, Б):

W – контрольные мыши (n = 9), не получавшие лечения;

A – мыши с лечением метилурациловой мазью (n=10);

B – мыши с лечением ЛЖК «пустышка» (n=9);

C – мыши с лечением ЛЖК, содержащим БАВ_2 (n=10);

D – мыши с лечением МК «пустышка» (n=10);

E – мыши с лечением МК, содержащим 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 B и D на 53,8 и 76,9 %, группе C и E на 215,4 и 161,5%, достоверной разницы относительно группы A не

выявлено (p=0,0916). По сравнению с мышами, получавшими метилурациловую мазь, прочность рубцов была выше в группе B и D на 21,2 и 39,4 %, в группе C и E на 148,5 и 106,1 %. По сравнению с мышами, получавшими лечение «пустышками»: в отношении ЛЖК (группа B) тензиометрические значения были выше в группе C и E на 105,0 и 70,0 %, различий между группой B и D не выявлено (p=0,0541); в отношении МК (группа C) тензиометрические параметры рубца были ниже в группе D и E на 43,9 и 17,1 %; отмечено снижение плотности рубца в группе D относительно E на 32,4 % (p=0,0025) (рисунок 70, B). Гистологические исследования показали, что у мышей групп A и D отмечается сохранение архитектоники дермы и наличие коллагеновых волокон; эластические волокна либо истончены и фрагментированы, либо уплотнены; значительное количество фибробластов. У мышей групп B, C и E наблюдалась 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 C хорошо видны микрососуды и сеть капилляров.

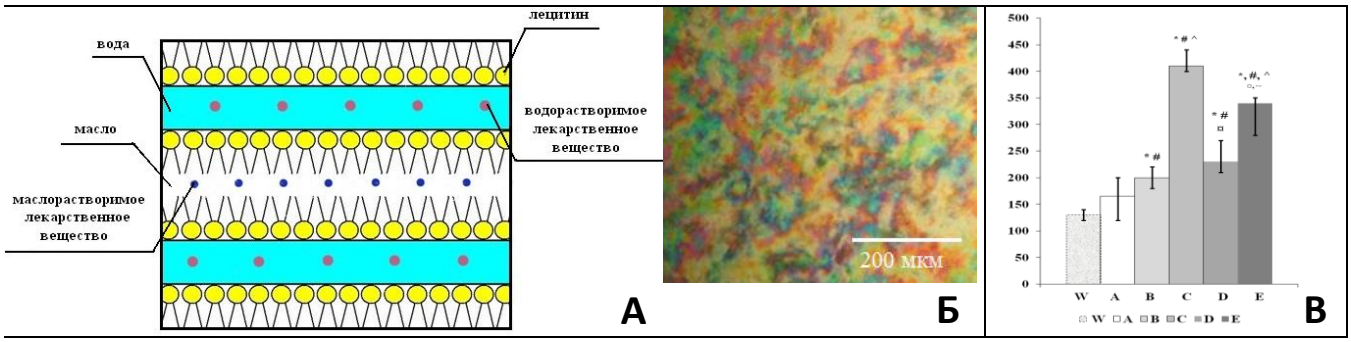


Рисунок 70 – Препарат на основе самоорганизующихся наноструктур с включенным БАВ_2 для перкутанного использования.

Условные обозначения: A - солюбилизация водо- и маслорастворимых биоактивных веществ в ламеллярном ЛЖК; Б) микрофотография образца ЛЖК при скрещенных поляризаторах; В) тензиометрические параметры рубца при перкутанном лечении ран у мышей: * при p <0,05 относительно группы W; # – при p <0,05 относительно группы A; ^ – при p <0,05 относительно группы B; ¤ – при p <0,05 относительно группы C; ~ – при p <0,05 относительно группы D

Более выраженные эффекты жидких кристаллов относительно микроэмульсий обусловлены их большей вязкостью и, следовательно, медленной диффузией, за счет чего происходит более пролонгированное действие веществ. Кроме того, возможно сделать предположение о том, что вышеперечисленные белки, проникая в кровяное русло непосредственно через стенки фолликул, могут запускать каскад реакций, активизируя покоящиеся стволовые клетки, которые, в свою очередь, становятся клетками-предшественниками и обеспечивают более эффективное прорастание клеток эпидермиса (эпидермальную стратификацию), сопровождающееся уменьшением нарушений местного и системного гомеостаза. Полное описание полученных результатов эксперимента приведено в работе Basov A. et al. (2020).

Технология микрокапсулирования прошла технологическую апробацию на ОАО «Московский завод сычужного фермента» в 2018 году (Приложение Г).

Расчет себестоимости производства капсулированной функциональной добавки был проведен на основании «Методических указаний по учету затрат и калькулированию себестоимости мяса и мясных продуктов» (ВНИИМП, 2010).

Определены цены на используемое сырье (Таблица 59) с применением коэффициентов потребительской стоимости в соответствии с соотношением цен на мясо на костях («Справочник показателей потребительских свойств мяса и мясных продуктов», ВНИИМП, 2006). Коэффициенты потребительной стоимости на использованные виды сырья: свинина – 1, селезенка – 0,1, тимус – 0,8; мезентеральные лимфатические узлы (брыжейка) – 0,25.

Таблица 59 - Расчет стоимости основной сырьевой составляющей капсулированной функциональной добавки

Статья затрат	Ед. изм.	Расход на 1 т	Цена, ед. руб.	Стоимость, на 1 т, руб.
Селезенка	кг	494,5	14,8	7 318,6
Тимус (вилочковая железа)	кг	688,0	118,4	81 459,2
Мезентеральные лимфатические узлы (брыжейка)	кг	632,1	37,0	23 387,7
Итого сырье и основные материалы				**112 165,5**

По данным Росстата на ноябрь 2020 г. средняя цена на свинину (цена производства) составила 177,6 руб. за 1 кг с учетом НДС. Таким образом, стоимость свинины (1 кг) без учета НДС – 148,0 руб.

В расчетах принимаются цены на сырье, используемое в производстве капсулированной функциональной добавки, в соответствии с коэффициентами потребительной стоимости:

- селезенка (0,1): 148×0,1=14,8 руб/кг;

- тимус (вилочковая железа) (0,8): 148×0,8=118,4 руб/кг;

- мезентеральные (брыжеечные) лимфатические узлы (0,25): 148×0,25=37,0 руб/кг.

Расчёт стоимости основной сырьевой составляющей капсулированной функциональной добавки, а также стоимость вспомогательных и упаковочных материалов для производства капсулированной функциональной добавки приведен в Таблице 60.

Таблица 60. Расчет стоимости вспомогательных и упаковочных материалов

Статья затрат	**Ед. изм.**	**Расход на 1 т, кг**	**Цена, ед. руб.**	**Стоимость, на 1 т, руб.**
1	2	3	4	5
Вспомогательные материалы на технологические цели:				
Соль поваренная	кг	294,0	7,5	2 205
Вода D/H 40 ppm	л (кг)	32 715,0	280,0	9 160 200
Альгинат натрия	кг	312,0	1 000	312 000
Хлорид кальция	кг	1 300,0	4,5	5 850
Гидроксид натрия	кг	400	27	10 800
Упаковочные материалы:				
Пластиковые банки 0,15 л	шт.	6 670	10,0	66 700
Мерная ложка	кг	6 670	5,0	33 350
Этикетки	шт.	6 670	2,8	18 676
Итого вспомогательные и упаковочные материалы				**9 609 781,0**

Следующим этапом стал расчет затрат на оплату труда производственных рабочих и учет цеховых и общезаводских затрат (Таблица 61).

Таблица 61. Расчет затрат на оплату труда производственных рабочих и накладные расходы

Статья затрат	Ед. изм.	Расход на 1 т, ч	Часовая тарифная ставка, руб.	Затраты на 1 т, руб.
1	2	3	4	5
Затраты на оплату труда производственных рабочих	час	24	200	4 800
Цеховые и общезаводские затраты	X	X	-	10 992

В таблице 62 приведена сводная калькуляция себестоимости капсулированной функциональной добавки, включающая расходы на топливо и энергию на технологические цели (калькуляционная единица – 1 тонна).

Таблица 62. Калькуляция себестоимости капсулированной функциональной добавки

№ п/п	Статья затрат	Сумма, руб.
1	Сырье и основные материалы	112 165,5
2	Вспомогательные материалы, тара и упаковочные материалы	9 609 781,0
3	Топливо и энергия на технологические цели	1 140,0
4	Затраты на оплату труда производственных рабочих	4 800,0
5	Цеховые и общезаводские затраты	10 992,0
6	Производственная себестоимость	9 738 878,5
7	Прибыль	486 943,9
8	Оптовая цена	10 225 822,4
9	НДС 10 %	1 022 582,2
Оптово-отпускная цена 1 т биоактивной добавки		**11 248 404,6**

Таким образом, оптовая стоимость 1 т биологически активной добавки составляет 11 248 404,6 руб. Оптово-отпуская цена 1 кг биологически активной добавки составляет 11 248,4 руб, оптово-отпуская цена одной пластиковой банки емкостью 0,15 л – 1687,30 руб. Курсовой прием 3 мес будет стоить 1687,30 руб.

Анализ рынка показал отсутствие аналогов. Для сравнения оптово-отпускной стоимости предложены следующие фармацевтические препараты:

1) Тактивин раствор для и/п/к 0.01% 1мл амп 5 шт – курс 0,01% раствора подкожно один раз в день 5-6 сут – стоимость 631 руб;

2) суперчистый экстракт тимуса крс «НАЙТИМУН» ("NEYTHYMUN") Nr.29 f+k pro inject.St. II Ampullen, производитель: vitOrgan Arzneimittel GmbH (Германия) – курс: от 5 сут до выздоровления, разовый прием - 2 мл; инъекции – стоимость упаковки 5 ампул по 2 мл: 8100 руб;

3) гидролизат плаценты человека "Лаеннек" раствор для инъекций, производитель Джапан Био Продактс Ко., Лтд, Япония– курс от 3 сут, дозы - от 2 до 10 мл. – стоимость упаковки 10 ампул по 2 мл: 11 550 руб.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И 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 (Приложение Д).

3. Разработан алгоритм и общие принципы процедуры исследования, позволяющий 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 эффективность алгоритма. С его помощью можно оптимизировать комплекс исследований и показателей,

специфичных для конкретного продукта и позволяющий полностью и всесторонне изучить заявляемые характеристики. На основе проведенных исследований разработаны и утверждены методические рекомендации по экспериментальному моделированию сердечно–сосудистых заболеваний у лабораторных животных (Приложение Е), программа и методики оценки эффективности биологически активных веществ животного происхождения и мясных специализированных продуктов (Приложение Ж).

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 биокоррегирующего действия. Технические условия» (Приложение З), учтены при разработке лабораторного регламента на производство Функционального мясного продукта / 2018. Оригинальность подтверждается патентом № 2550649 (Приложение И). 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 иммунокомпетентных клеток, что указывает на повышение функциональной активности прежде всего гуморального звена иммунной защиты организма. Данные технологии позволят расширить возможности применения и повысить биодоступность белковых соединений природного происхождения.

7. Технология самоорганизующихся жидких кристаллов впервые предложена для перкутанного использования белково-пептидных комплексов. Показано более быстрое заживление ран при терапии лецитиновыми жидкими кристаллами и микроэмульсией, за счет выраженной резорбции биоактивных белково-пептидных комплексов через кожу. Прочность рубца увеличивалась при терапии лиотропными жидкими кристалами и микроэмульсией 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-отпуская цена 1 кг биологически активной добавки составляет 11 248,4 руб, оптово-отпуская цена одной пластиковой банки емкостью 0,15 л – 1687,30 руб..

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

% GRA – относительное содержание гранулоцитов

% MI – миелоциты

%LYM – лимфоциты

%MON – относительное содержание моноцитов

Gc – коэффициент сопоставимой избыточности

GRA – гранулоциты

DDW – Dioscorea deltoidea Wall / Диоскорея дельтовидная

HCT – гематокрит

HGB – гемоглобин

LYM – лимфоциты

MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците

MCHC - средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах

MCV – средний объем эритроцита

MID – содержание смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток

MPV – средний объем тромбоцита

ORAC – поглощающая способность кислородных радикалов

PCT – тромбокрит

PDWc – распределение тромбоцитов

PLT – тромбоциты

RBC – эритроциты

Rc – коэффициент рациональности аминокислотного состава

RDWc – ширина распределения эритроцитов

RL – коэффициент рациональности жирнокислотного состава

U – коэффициент утилитарности аминокислотного слстава белка

WBC – лейкоциты

ААС - атомно-абсорбционной спектрометрии (

АГЛ – алиментарная гиперлипидемия

АК – аминокислота

АлАт – аланинаминотрансфераза

АПФ – ангиотензин-превращающий фермент

АсАт – аспартатаминотрансфераза

БАВ – биологически активные вещества

БАСК – бактерицидная активность сыворотки крови

БЦ - биологическая ценность

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГГТ – гамма-глютамилтранспептидаза

ДЛ – дислипидемия

ДЦПНЖК – длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ЗАК – заменимые аминокислоты

ИА – индекс атерогенности сыворотки крови животных

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИПГ - интрацеребральная посттравматическая гематома

ИС – иммуносупрессия

КАТ – каталаза

КК – креатинкиназа

КРАС - коэффициент различия аминокислотного состава

КУНА - коэффициент утилитарности j-й незаменимой аминокислоты

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МДА – малоновый диальдегид

МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты

НАК – незаменимые аминокислоты

НЖК – насыщенные жирные кислоты

НТД – нормативно-техническая документация

ОАЕ – общая антиоксидантная емкость

ОХС – общий холестерин в сыворотке крови

ПГТТ – пероральный глюкозотолерантный тест

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РОК – методом розеткообразования / розеткообразующие клетки

Cmin - минимальный аминокислотный скор

СМП – специализированные мясные продукты

СОД - супероксиддисмутаза

СП – специализированные продукты питания

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ТГ – триглицериды

ТПН – травма периферического нерва

ТСМ – травма спинного мозга

ФАО/ВОЗ – продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН / Всемирная организация здравоохранения

ФИ – функциональные ингредиенты

ФП – функциональные продукты питания

ХС – экзогенный холестерин (поступивший с пищей)

ХС ЛПВП - холестерин липопротеинов высокой плотности

ХС ЛПНП - холестерин липопротеинов низкой плотности

ЩФ – щелочная фосфотаза

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Addo, K. Indigenous fermentation and soy fortification: effects on protein quality and carbohydrate digestibility of a traditional Ghanaian corn meal / K. Addo, S. Lykins, C. Cotton // Food Chem. – 1996. – Vol. 51. – №. 3. – P. 377–380.

Admassu, H. Bioactive Peptides Derived from Seaweed Protein and Their Health Benefits: Antihypertensive, Antioxidant, and Antidiabetic Properties / H. Admassu, M. Gasmalla, R. Yang, W. Zhao // Journal of food science. – 2018. – Vol. 83(1). – P. 6-16. DOI: 10.1111/1750-3841.14011

Aebi, H. Catalase in vitro / H. Aebi // Methods in enzymology. – 1984. – Vol. 105. – P. 121-126. DOI: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3

Agostinelli, E. Polyketone polymer: a new support for direct enzyme immobilization / E. Agostinelli, F. Belli, G. Tempera et al. // Journal of biotechnology. – 2007. – Vol. 127. – № 4. – P. 670–678. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.08.011

Ahmad, I. Review of angiotensin-converting enzyme inhibitory assay: Rapid method in drug discovery of herbal plants / I. Ahmad, A. Yanuar, K. Mulia, A. Mun'im // Pharmacognosy reviews. – 2017. – Vol. 11. – №. 21. – P. 1-7. DOI: 10.4103/phrev.phrev_45_16

Akhremko, A. Adaptation of two-dimensional electrophoresis for muscle tissue analysis / A. Akhremko, E. R. Vasilevskaya, L. Fedulova // Potravinarstvo. – 2020. – Vol. 14. – P. 595-601. DOI: 10.5219/1380

Akhremko, A. Adaptation of two-dimensional electrophoresis for muscle tissue analysis / A. Akhremko, E. R. Vasilevskaya, L. Fedulova // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2020. – Vol. 14. – P. 595-601. DOI: 10.5219/1380.

Alam, A. K. Effect of different excipients on the release of vinpocetine from biodegradable polymeric implants of chitosan and sodium alginate / A. K. Alam, M. T. Khadiza, I. Swarnali, S. Rajia. // The Pharma Innovation Journal. – 2017. – Vol. 6. – № 5. – P. 146-151.

Alknn, S. Immobilization of catalase via adsorption into natural and modified active carbon obtained from walnut in various methods / S. Alknn, A. Gür, M. Ertan et al. // African Journal of Biotechnology. – 2009. – № 8. – P. 2631-2635.

Alsmeyer, R. H. Equations predict PER from amino acid analysis / R. H. Alsmeyer, A. E. Cunningham, M. L. Happich // Food Technol. – 1974. – Vol. 28. – P. 34-40.

Aman, S. Antimicrobial polyphenols from small tropical fruits, tea and spice oilseeds / S. Aman, A. Naim, R. Siddiqi, S. Naz // Food Science and Technology International. – 2013. – Vol. 20(4). – P.241-51. DOI: 10.1177/1082013213482476.

Andersen, M. L. Animal models in biological and biomedical research – experimental and ethical concerns / M. L. Andersen, L. M. F. Winter // Anais da Academia Brasileira de Ciencias. – 2019. – Vol. 91(suppl 1) – e20170238. DOI: 10.1590/0001-3765201720170238

Araujo, M. C. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensinI converting enzyme / M. C. Araujo, R. L. Melo, M. H. Cesari et al. // Biochemistry. – 2000. – Vol. 39. – P. 8519–8525.

Argudo, P. G. Preparation and Application in Drug Storage and Delivery of Agarose Nanoparticles / P. G. Argudo, E. Guzmán, A. Lucia, R. G. Rubio, F. Ortega // International Journal of Polymer Science. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1–9.

Arihara, K. Functional Foods// Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition), Editors M. Dikeman, C. Devine. – Academic Press, 2014. – P. 32-36. DOI:0.1016/B978-0-12-384731-7.00172-0.

Arihara, K. Strategies for designing novel functional meat products / K. Arihara // Meat Science. – 2006. – Vol. 74. – P. 219-229. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.04.028.

Armstrong, J. S. Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria / J. S. Armstrong, M. Whiteman // Methods Cell Biol. – 2007. – Vol. 80. – P. 355–377.

Aryaeian, N. Polyphenols and their effects on diabetes management: A review/ N. Aryaeian, S. K. Sedehi, T. Arablou //Medical journal of the Islamic Republic of Iran. – 2017. – Vol. 31. – P.134. DOI:10.14196/mjiri.31.134

Barnard, D. E. Open- and closed-formula laboratory animal diets and their importance to research / D. E. Barnard, S. M. Lewis, B. B. Teter, J. E. Thigpen // J Am Assoc Lab Anim Sci. – 2009. – Vol. 48. – № 6. – P. 709-713.

Barnes, S. Nutritional genomics, polyphenols, diets, and their impact on dietetics// Journal of the American Dietetic Association. – 2008. – Vol. 108(11). – P.1888–1895. DOI:10.1016/j.jada.2008.08.014

Barouei, J. Prophylactic role of maternal administration of probiotics in the prevention of irritable bowel syndrome / J. Barouei, M.C. Adams, D.M. Hodgson// Medical Hypotheses. – 2009. – Vol.73(5). – P.764-7.

Barrette, B Requirement of Myeloid Cells for Peripheral and Central Axon Regeneration / B. Barrette, M. A. Hébert, M. Filali et al. // Journal of Neuroscience. – 2008. – Vol. 28(38). – P. 9363-9376. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1447-08.2008

Barros Filho, T. E. Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in Wistar rats / T. E. Barros Filho, A. E. Molina // Clinics (Sao Paulo). – 2008. – Vol. 63. – № 1. – P. 103-108. DOI: 10.1590/s1807-59322008000100018

Barros Filho, T. E. Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in Wistar rats / T. E. Barros Filho, A. E. Molina // Clinics (Sao Paulo, Brazil). – 2008. – Vol. 63(1). – P. 103-108. DOI: 10.1590/s1807-59322008000100018

Basu, A. Berries: emerging impact on cardiovascular health / A. Basu, M. Rhone, T.J. Lyons // Nutrition Revolution. – 2010. – Vol. 68. – № 3. – P. 168–177. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2010.00273.x

Becker, T. A. Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization / T.A. Becker, D. R. Kipke, T. Brandon // ournal of biomedical materials research. – 2001. – Vol. 54. – № 1. – P. 76-86. DOI: 10.1002/1097-4636(200101)54:1<76::aid-jbm9>3.0.co;2-v.

Benstoem, C. Selenium and Its Supplementation in Cardiovascular Disease—What do We Know? / C. Benstoem, A. Goetzenich, S. Kraemer, S. Borosch, W. Manzanares, et al.// Nutrients. – 2015. – Vol. 7. – P. 3094-3118. DOI: 10.3390/nu7053094

Bertges, L.C. Hyperlipidemia induced by Triton WR1339 (Tyloxapol) in Wistar rats / L. C. Bertges, C. A. Mourão Jr, J. B. Souza et al. // Rev Bras Cien Med Saúde. – 2011. – Vol.1.-№1. – P. 32-34.

Biel, W. Compositional and Nutritional Evaluation of Guar (Cyamopsis tetragonoloba L.) Meal / W. Biel, A. Jaroszewska // Animal Nutrition and Feed Technology. – 2019. – Vol. 19. – №. 3. – P. 385-393.

Boehm, F. Anti-and pro-oxidative mechanisms comparing the macular carotenoids zeaxanthin and lutein with other dietary carotenoids – a singlet oxygen, free-radical in vitro and ex vivo study/ F. Boehm, R. Edge, T. Truscott // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2020. – Vol.19(8). – P.1001-1008. DOI:10.1039/D0PP00120A.

Bogdanov, A.R. Conjugated linoleic acid in diet therapy of obesity: the state of the problem/ A.R. Bogdanov, M. Zeigarnik, B.S. Kaganov // Voprosy dietologii. – 2012. – Vol. 2. – P.15-24. DOI:10.20953/2224-5448-2012-3-15-24.

Bohets, H. H. Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK1, MDCK and human proximal tubular cells / H. H. Bohets, M. N. Van Thielen, I. Van der Biest et al. // Kidney Int. – 1995. – Vol. 47. – № 2. – P. 395–403.

Bolhuis, D. P. Salt promotes passive overconsumption of dietary fat in humans / D. P. Bolhuis, A. Costanzo, L. P Newman, R. S. J. Keast // The Journal of nutrition. – 2015. – Vol. 146. – №. 4. – P. 838-845. DOI: 10.3945/jn.115.226365

Bonomini, F. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress / F. Bonomini, L. F. Rodella, R. Rezzani // Aging Dis. – 2015. – Vol. 6. – P. 109–20. DOI: 10.14336/AD.2014.0305

Boullata, J.I. Drug and nutrition interactions: not just food for thought // Journal of clinical pharmacy and therapeutics. – 2013. – Vol. 38(4). – P.269–271. DOI:10.1111/jcpt.12075

Boye, J. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method / J. Boye, R. Wijesinha-Bettoni, B. Burlingame // British Journal of Nutrition. – 2012. – Vol. 108. – № S2. – P. S183-S211. DOI: 10.1017/S0007114512002309

Boye, J. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method / J. Boye, R. Wijesinha-Bettoni, B. Burlingame // British Journal of Nutrition. – 2012. – Vol. 108. – №. S2. – P. S183-S211. DOI: 10.1017/S0007114512002309

Brady, P. N. Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: Biases and mechanistic insights / P. N. Brady, M. A. Macnaughtan // Analytical biochemistry. – 2015. – Vol. 491. – P. 43–51. DOI: 10.1016/j.ab.2015.08.027

Brewis, I. A. Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins / I. A. Brewis, P. Brennan // Adv Protein Chem Struct Biol. – 2010. – Vol. 80. – P. 1-44. DOI: 10.1016/B978-0-12-381264-3.00001-1.

Bronzato, S. Dietary Supplements and Cardiovascular Diseases/ S. Bronzato, A. Durante // International journal of preventive medicine. – 2018. – Vol. 9(80). DOI: 10.4103/ijpvm.IJPVM_179_17.

Brown, I. J. Salt intakes around the world: implications for public health / I. J. Brown, I. Tzoulaki, V. Candeias, P. Elliott // Int J Epidemiol. – 2009. – Vol.38. – № 3. – P. 791-813. DOI: 10.1093/ije/dyp139

Buamah, T. F. Studies on the protein efficiency ratio method for the evaluation of poultry feed supplements. Modifications associated with choice of dietary protein level for assay / T. F. Buamah, E. P. Singsen // The Journal of nutrition. – 1975. – Vol. 105. – №. 6. – P. 688–700.

Bucher, H.C. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials/ H.C. Bucher, P. Hengstler, C. Schindler, G. Meier // American

Journal of Medicine. – 2002. – Vol.112(4). – P. 298-304. DOI: 10.1016/s0002-9343(01)01114-7.

Burdge, G. C. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of α-linolenic acid metabolism in young men / G. C. Burdge, A. E. Jones, S. A. Wootton // British Journal of Nutrition. – 2002. – Vol. 88. – №. 4. – P. 355-363. DOI: 10.1079/BJN2002662

Calatayud, M. Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications / M. Calatayud, C. López-de-Dicastillo, G. López-Carballo et al. // Food Chem. – 2013. – Vol. 139. – № 1-4. – P. 51–58.

Chapman, D. G. Evaluation of protein in foods: 1. A method for the determination of protein efficiency ratios / D. G. Chapman, R. Castillo, J. A. Campbell // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. – 1959. – Vol. 108. – №. S2. – P. 679-685.

Chen, G Combined treatment with FK506 and nerve growth factor for spinal cord injury in rats / G. Chen, Z. Zhang, S. Wang, D. Lv // Experimental and therapeutic medicine. – 2013. – Vol. 6(4). – P. 868-872. DOI: 10.3892/etm.2013.1254

Chen, J. Nutritional indices for assessing fatty acids: A mini-review / J. Chen, H. Liu // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – №. 16. – P. 5695. PMID: 32784511; DOI: 10.3390/ijms21165695

Chen, S. Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acid compositions / S. Chen, G. Bobe, S. Zimmerman et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2004. — Vol. 52. – № 11. – P. 3422–3428.

Cheng, Y. Astragalus polysaccharides lowers plasma cholesterol through mechanisms distinct from statins/ Y. Cheng, K. Tang, S. Wu, L. Liu, C. Qiang, et al. // PLoS One. – 2011. – Vol. 6(11). – P. e27437. DOI: 10.1371/journal.pone.0027437.

Chernukha, I.M. Biologically active peptides of meat and meat product proteins: a review. Part 2. Functionality of meat bioactive peptides/ I.M. Chernukha, N.G. Mashentseva, D.A. Afanasev, N.L. Vostrikova // Theory and Practice of Meat Processing. – 2020. – Vol. 5. – № 2. – P. 12-19. DOI: 10.21323/2414-438X-2020-5-2-12-19

Cho, W.C.S. Ginsenoside Re of Panax ginseng possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin – induced diabetic rats / W.C.S. Cho, W.S. Chung, S.K. Lee, A.W. Leung, C.H. Cheng, et al. // Europen Journal of Pharmacology. – 2006. – № 550. – P. 173–179. 10.1016/j.ejphar.2006.08.056

Christie, W. W. The Oily Press : Lipid Analysis : Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis (4th Edition) / W.W. Christie, X. Han ; Volume 24 in The Oily Press Lipid Library. – USA : Woodhead Publishing, 2012. – P. 448. – ISBN 9780081014653

Cilla, A. Mineral and/or milk supplementation of fruit beverages helps in the prevention of H2O2-induced oxidative stress in Caco-2 cells / A. Cilla, J. M. Laparra, A. Alegria, R. Barbera// Nutr. Hosp. – 2011. – Vol. 26. – № 3. – P. 614–621

Cinq-Mars, C. D. Investigations into inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell transport of the angiotensin I-Converting enzyme-inhibitory peptides in pacific hake (Merluccius productus) fillet hydrolysate / C. D. Cinq-Mars, C. Hu, D. D. Kitts. E. C. Y. Li-Chan // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – Vol. 56. – P. 410-419. DOI: 10.1021/jf072277p

Cruz, R. M. S. Methods in Food Analysis (1st ed.) / R. M. S. Cruz, I. Khmelinskii. Editor: M. Vieira. CRC Press, Boca Raton, 2014. – P. 248. DOI: 10.1201/b16964

D'Elia, L. Potassium intake, stroke, and cardiovascular disease a meta-analysis of prospective studies/ L. D'Elia, G. Barba, F.P. Cappuccio, P. Strazzullo// Journal of the American College of Cardiology. – 2011. – Vol. 57(10). – P. 1210-1219. DOI:10.1016/j.jacc.2010.09.070

Daliri, E. B., Influence of fermented soy protein consumption on hypertension and gut microbial modulation in spontaneous hypertensive rats / E. B. Daliri, F. K. Ofosu, R. Chelliah et al. // Biosci Microbiota Food Health. – 2020. – Vol. 39. – № 4. – P. 199-208. DOI: 10.12938/bmfh.2020-001$

Dardenne, M. The sheep cell rosette assay for the evaluation of thymic hormones / M. Dardenne, J. F. Bach // Biological activity of thymic hormones. – 1975. – P. 235-243.

Datta, S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials / S. Datta, L. R. Christena, Y. R. Rajaram // 3 Biotech. – 2013. – Vol. 3. – № 1. – P. 1-9. DOI: 10.1007/s13205-012-0071-7

Davis, E.A. Food Microstructure, an Integrative Approach./ E.A. Davis, J. Gordon // Food Microstructure. – 1982. – Vol. 1. – P. 11-12.

Da-yun, S. Effects of 20(S)-protopanaxadiol saponins on blood lipid metabolism and antioxidative activity in hyperlipidemia rats / S. Da-yun, V. Xiao-feng, Q. Shochin, X. Hua-li // Chinese Traditional Herbal Drugs. – 2004. – Vol. 35. – P. 416–419.

De Souza, C. F. V. In vivo evaluation of cross-linked milk and wheat proteins mediated by microbial transglutaminase in white wistar rats / C. F. V. De Souza, J. G. Venzke, S. H. Flores, M. A. Z. Ayub // Am. J. Food Technol. – 2009. – Vol. 4. – №. 3. – P. 96-107.

De Vos, P. Encapsulation for Preservation of Functionality and Targeted Delivery of Bioactive Food Components/ P. de Vos, M. M. Faas, M. Spasojevic, J. Sikkema // International Dairy Journal. – 2010. – Vol. 20. – P. 292-302. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.11.008

Denes, A. Brain-Immune interactions in health and disease/ A. Denes, J.A. Miyan // Frontiers in neuroscience. – 2015. – Vol.8(23). – P.382. DOI: 10.3389/fnins.2014.00382

Denisenko, T. A. Spectrophotometric determination of phenolic compounds sum in plants using aluminum chloride, 18-molybdodiphosphate and folin-ciocalteu reagents / T. A. Denisenko, A. B. Vishnikin, L. P. Tsiganok // Analitika i kontrol. – 2015. – Vol. 19. – № 4. – P. 373-380. DOI: 10.15826/analitika.2015.19.4.012

Diehl, B. W. K. Multinuclear high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy / B. W. K. Diehl. Publisher: Hamilton R.J. (eds) Lipid Analysis in Oils and Fats. Springer, Boston, MA, 1998. – P. 87. DOI: 10.1007/978-1-4613-1131-7_4

Dietschy, J. M. Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations // The Journal of nutrition. – 1998. – Vol. 128. – №. 2. – P. 444S-448S.

Eggersdorfer, M. Emerging nutrition gaps in a world of affluence-Micronutrient intake and status globally / M. Eggersdorfer, P. Walter // International Journal for Vitamin and Nutrition Research. – 2011. – Vol. 81. – №. 4. – P. 238. DOI: 10.1024/0300-9831/a000068

Ellenbroek, B. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? / B. Ellenbroek, J. Youn // Disease models & mechanisms. – 2016. – Vol. 9. – №. 10. – P. 1079-1087. DOI: 10.1242/dmm.026120

Ezzati, M. Rethinking the "Diseases of Affluence" Paradigm: Global Patterns of Nutritional Risks in Relation to Economic Development/ M. Ezzati, S. Vander Hoorn, C.M.M.

Lawes, R. Leach, P.T. James, et al. (2005) // PLoS Med. – 2005. – Vol. 2(5). – № e133. DOI:10.1371/journal.pmed.0020133

Fan, J. Dietary glycemic index, glycemic load, and risk of coronary heart disease, stroke, and stroke mortality: a systematic review with meta-analysis / J. Fan, Y. Fan, J. Song et al. // PloS one. – 2012. – Vol. 7. – №. 12. – P. e52182.

Farhadi, S. The relationship between nutrition and infectious diseases: A review / S. Farhadi, R. S. Ovchinnikov // Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ). – 2018. – Vol. 2. – №. 3. – P. 168. DOI: 10.4103/bbrj.bbrj_69_18.

Fedulova, L. Identification of tissue-specific proteins of immunocompetent organs of Sus scrofa isolated in deuterium depleted medium/ L. Fedulova, A. Elkina, E. Vasilevskaya, E. Barysheva// Medical Science. – 2018. – Vol. 22(94). – P. 509-513.

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

Feng, S. Effects of Stigmasterol and β-Sitosterol on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Mouse Model: A Lipidomic Analysis/ S. Feng, L. Gan, C.S. Yang, A.B. Liu, W. Lu et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2018. – Vol. 66(13). – P. 3417-3425. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b06146

Ferguson, L. R. Nutrigenomics approaches to functional foods// Journal of the American Dietetic Association. – 2009. – Vol. 109(3). – P. 452–458. DOI:10.1016/j.jada.2008.11.024

Ferrario, C. M. Renin angiotensin aldosterone inhibition in the treatment of cardiovascular disease / C. M. Ferrario, A. E. Mullick // Pharmacol Res. – 2017. – Vol. 125. – P. 57-71. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.05.020.

Ferreira, R. S. The impact of laboratory chow for rats in the experiments: Chemical and biological evaluation of nine grain-based diet options / R. S. Ferreira, L. Morelini, E. M. C. Azeredo // Human & Experimental Toxicology. – 2017. – Vol. 37. DOI: 10.1177/0960327117695637

Fortmann, S.P. Vitamin, Mineral, and Multivitamin Supplements for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force / S.P. Fortmann, B.U. Burda, C.A. Senger // Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. - 2013. – Report № 14-05199-EF-1. – URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK173987/ (дата обращения:11.04.2019)

Friedman, M. The mechanism responsible for the hypercholesteremia induced by triton wr-1339 / M. Friedman, S. O. Byers // Am. J. Physiol. – 1952. – Vol. 11. – № 168. – P.117-130.

Fuhrman, J. The hidden dangers of fast and processed food // American journal of lifestyle medicine. – 2018. – Vol. 12. – №. 5. – P. 375-381. DOI: 10.1177/1559827618766483

Fujita, Y. High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice / Y. Fujita, K. Maki // BMC Obes. – 2015. – Vol.3. – № 1. DOI: 10.1186/s40608-016-0082-8

Fuller, M. Determination of protein and amino acid digestibility in foods including implications of gut microbial amino acid synthesis // British Journal of Nutrition. – 2012. – Vol. 108. – №. S2. – P. S238-S246.

Gabriel, H. Capillary electrophoresis in the analysis of polyunsaturated fatty acids / H. Gabriel, T. V. Amelia, F. Cristina, R. Aura // Acta Medica Marisiensis. – 2015. – Vol. 61. – №. 4. – P. 378-381. DOI: 10.1515/amma-2015-0103

Gajda, Angela M. Using Diet to Induce Metabolic Disease in Rodents / M. Gajda, Angela, Michael A. Pellizzon, Matthew R. Ricci. In: Szallasi A., Bíró T. (eds) TRP Channels in Drug Discovery. Methods in Pharmacology and Toxicology. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. DOI: 10.1007/978-1-62703-095-3_21

García-Magaña, M. de L. Functional Properties and Dietary Fiber Characterization of Mango Processing By-products (Mangifera indica L., cv Ataulfo and Tommy Atkins) / M. de L. García-Magaña, H.S. García, L.A. Bello-Pérez, S.G. Sáyago-Ayerdi, M.M. de Oca// Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands). – 2013. – Vol.68(3). – P.254-8. DOI: 10.1007/s11130-013-0364-y.

Geleijnse, J. M. Sodium and potassium intake and risk of cardiovascular events and all-cause mortality: the Rotterdam Study / J. M. Geleijnse, J. C. Witteman, T. Stijnen et al. // European journal of epidemiology. – 2007. – Vol. 22. – №. 11. – P. 763-770. DOI: 10.1007/s10654-007-9186-2

Geng, F. A rapid assay for angiotensin-converting enzyme activity using ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry / F. Geng, Y. He, L. Yang, Z. Wang // Biomedical Chromatography. – 2010. – Vol. 24. – № 3. – P. 312-317.

Giansanti, P. Six alternative proteases for mass spectrometry–based proteomics beyond trypsin / P. Giansanti, L. Tsiatsiani, T. Y. Low, A. J. R. Heck // Nature Protocols. – 2016. – V. 11. – №. 5. – P. 993-1006.

Gibson, G. R. Dietary modulation of the human colonic microbota: introducing the concept of prebiotics/ G. R. Gibson, M. B. Roberfroid // The Journal of Nutrition. – 1995. – Vol. 125. – P. 1401-1412. DOI: 10.1093/jn/125.6.1401

Gilani, G. S. Background on international activities on protein quality assessment of foods // British Journal of Nutrition. – 2012. – Vol. 108. – №. S2. – P. S168-S182

Gilani, G. S. Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats / G. S. Gilani, E. Sepehr // The Journal of nutrition. – 2003. – Vol. 133. – №. 1. – P. 220-225.

Giles, K. Diet composition as a source of variation in experimental animal models of cancer cachexia / K. Giles, C. Guan, T. R. Jagoe, V. Mazurak // Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. – 2016. – Vol. 7. – P. 110-125. DOI: 10.1002/jcsm.12058.

Girija, K. Hypolipidemic effect of amaranthus caudatus l. in triton wr-1339 induced hyperlipidemic rats / K. Girija, K. Lakshman, P. Udaya Chandrika // Pharmacologyonline. – 2011. – Vol. 40. – № 1. – P. 84-91.

Grada, A. Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing / A. Grada, J. Mervis, V. Falanga // The Journal of investigative dermatology. – 2018. – Vol. 138. – № 10. – P. 2095-2105. DOI:10.1016/j.jid.2018.08.005

Graham, I. Европейские рекомендации по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний в клинической практике / I. Graham, D. Atar, K. Borch-Johnsen et al. // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2008. – Т.4. – № 3. – С. 111-128.

Graudal, N. Compared with usual sodium intake, low-and excessive-sodium diets are associated with increased mortality: a meta-analysis / N. Graudal, G. Jürgens, B. Baslund, M.

H. Alderman // American journal of hypertension. – 2014. – Vol. 27. – №. 9. – P. 1129-1137. DOI: 10.1093/ajh/hpu028

Graudal, N.A. Effects of low sodium diet versus high sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines cholesterol, and triglyceride/ N.A. Graudal, G. Jurgens // The Cochrane database of systematic reviews. – 2003. – Vol.1. – № CD004022. DOI: 10.1002/14651858.CD004022

Greaves, K. A. Consumption of Soy Protein Reduces Cholesterol Absorption Compared to Casein Protein Alone or Supplemented with an Isoflavone Extract or Conjugated Equine Estrogen in Ovariectomized Cynomolgus Monkeys/ K. A. Greaves, M.D. Wilson, L. L. Rudel, J. K. Williams, J. D. Wagner// The Journal of Nutrition. – 2000. – Vol. 130(4). – P. 820–826.

Greco, E. A. Epigenetic modifications induced by nutrients in early life phases: gender differences in metabolic alteration in adulthood / E. A. Greco, A. Lenzi, S. Migliaccio, S. Gessani // Frontiers in genetics. – 2019. – Vol. 10. – P. 795. DOI: 10.3389/fgene.2019.00795

Grimm, E. R. Genetics of eating behavior: established and emerging concepts / E. R. Grimm, N. I. Steinle // Nutrition reviews. – 2011. – Vol. 69. – №. 1. – P. 52-60. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2010.00361.x

Guerra, A. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion / A. Guerra, L. Etienne-Mesmin, V. Livrelli et al. // Trends in Biotechnology. – 2012. - Vol. 30. – № 11. – P. 591-600.

Hariyadi, D. M. Current Status of Alginate in Drug Delivery / D. M. Hariyadi, N. Islam // Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. – 2020. – 8886095. DOI: 10.1155/2020/8886095.

Hasler, C.M. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health//The Journal of Nutrition. – 2002. – Vol. 132(12). – P. 3772–3781. DOI:10.1093/jn/132.12.3772

Hasler, C.M. Position of the American Dietetic Association: Functional foods/ C.M. Hasler, A.S. Bloch, C.A. Thomson, E. Enrione, C. Manning // Journal of the American Dietetic Association. – 2004. – Vol.104(5). – P.814-26. DOI: 10.1016/j.jada.2004.03.015

Hendriks, W. H. Ileal and faecal protein digestibility measurement in humans and other non-ruminants–a comparative species view / W. H. Hendriks, J. van Baal, G. Bosch // British Journal of Nutrition. – 2012. – Vol. 108. – №. S2. – P. S247-S257.

Hernandez-Ledesma, B. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin / B. Hernandez-Ledesma, A. Quiros, L. Amigo, I. Recio // International Dairy Journal. – 2007. – Vol. 17. – №. 1. – P. 42-49.

Herrero, A. M. Poultry Quality Evaluation : Chapter 10 - Vibrational Spectroscopy for Quality Assessment of Meat / A. M. Herrero, P. C. Hernandez, Francisco Jiménez-Colmenero, Perez R.-C. Claudia. Editor(s): Massimiliano Petracci, Cécile Berri, In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Poultry Quality Evaluation, Woodhead Publishing, 2017. – P. 247-276. ISBN 9780081007631, DOI: 10.1016/B978-0-08-100763-1.00010-6

Higdon, J. V. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis/ J. V. Higdon, B. Delage, D. E. Williams, R. H. Dashwood // Pharmacological research. – 2007. – Vol.55(3). – P.224–236. DOI:10.1016/j.phrs.2007.01.009

Holley, A. K. Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse/ A. K. Holley, V. Bakthavatchalu, J.M. Velez-Roman, D.K. St Clair// International journal of molecular sciences. – 2011. – Vol. 12(10). – P. 7114–7162. DOI:10.3390/ijms12107114

Holme, J. A. The use of in vitro methods for hazard characterisation of chemicals / J. A. Holme, E. Dybing // Toxicology letters. – 2002. – Vol. 127. – № 1-3. – P. 135-141. DOI: 10.1016/S0378-4274(01)00493-3

Houston, M.C. The importance of potassium in managing hypertension// Current hypertension reports. – 2011. – Vol. 13(4). – P. 309-317. DOI: 10.1007/s11906-011-0197-8

Hsu, H. W. A multienzyme technique for estimating protein digestibility / H. W. Hsu, D. L. Vavak, L. D. Satterlee et al. // Journal of Food Science. – 1977. – Vol. 42. – №. 5. – P. 1269-1273.

Iida, S. Spontaneous stroke in a genetic model of hypertension in mice / S. Iida, G. L. Baumbach, J. L. Lavoie et al // Stroke. – 2005. – Vol. 36. – №. 6. – P. 1253-1258. DOI: 10.1161/01.str.0000167694.58419.a2

Imai, T. A novel free radical scavenger, NSP-116, ameliorated the brain injury in both ischemic and hemorrhagic stroke models / T. Imai, S. Iwata, D. Miyo et al. // Journal of pharmacological sciences. – 2019. – Vol. 141. – №. 3. – P. 119-126.

Ivanova, P. T. LIPID arrays: New tools in the understanding of membrane dynamics and lipid signaling / P. T. Ivanova, S. B. Milne, J. S. Forrester // Molecular Interventions. – 2004. – Vol. 4. – №. 2. – P. 86-96.

James, M. L. Preclinical models of intracerebral hemorrhage: a translational perspective / M. L. James, D. S. Warner, D. T. Laskowitz // Neurocritical care. – 2008. – Vol. 9(1). – P. 139-152. DOI: 10.1007/s12028-007-9030-2

James, M.L. Preclinical models of intracerebral hemorrhage: a translational perspective / M.L. James, D. S. Warner, D. T. Laskowitz // Neurocrit Care. – 2008. – Vol. 9. – № 1. – P. 139-152. DOI: 10.1007/s12028-007-9030-2

Jang, A. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates / A. Jang, M. Lee // Meat science. – 2005. – Vol. 69. – № 4. – P. 653–661. DOI: 10.1016/j.meatsci.2004.10.014

Jang, H. Nutrition, epigenetics, and diseases / H. Jang, C. Serra // Clinical nutrition research. – 2014. – Vol. 3. – №. 1. – P. 1. DOI: 10.7762/cnr.2014.3.1.1

Jayant, R. D. Polyelectrolyte-coated alginate microspheres as drug delivery carriers for dexamethasone release / R. D. Jayant, M. J. McShane, R. Srivastava, // Drug delivery. – 2009. – Vol. 16. – №. 6. – P. 331-340. DOI: 10.1080/10717540903031126

Johnston, R. B. Improved imaging of rat hindfoot prints for walking track analysis / R. B. Johnston, L. Zachary, A. L. Dellon, W. A. Seiler, D. M. Teplica // Journal of neuroscience methods. – 1991. – Vol. 38(2-3). – P. 111-114. DOI: 10.1016/0165-0270(91)90161-r

Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation : Energy and protein requirements (Geneva) // World Health Organ Tech Rep Ser. – 1985. – Vol. 724. – P. 1-67.

Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation : Protein and amino acid requirements in human nutrition // World Health Organ Tech Rep Ser. – 2007. – Vol. 935. – P. 1-265. PMID: 18330140

Juillerat, L. Determinants of angiotensin II generation during converting enzyme inhibition / L. Juillerat, J. Nussberger, J. Ménard et al. // Hypertension. – 1990. – Vol. 16. – № 5. – P. 564-572.

Kato, N. Critical role of p38 MAPK for regeneration of the sciatic nerve following crush injury in vivo / N. Kato, M. Matsumoto, M. Kogawa // Journal of neuroinflammation. – 2013. – Vol. 10. – 1. DOI: 10.1186/1742-2094-10-1

Katona, P. The interaction between nutrition and infection / P. Katona, J. Katona-Apte // Clinical Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 46. – №. 10. – P. 1582-1588. DOI: 10.1086/587658

Kedare, S.B. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay / S.B. Kedare, R.P. Singh // Journal of food science and technology. – 2011. – Vol. 48. – № 4. – P. 412–422. https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1

Kesic, A. Phytochemical Profile of Honey : Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health / A. Kesić, N. Ibrišimović-Mehmedinović, A. Šestan. Ed.: A. V. Rao, L. G. Rao; Iva Simcic: Croatia, 2015 – P. 99-109. DOI: 10.5772/60087

Khalil, C. A. The emerging role of epigenetics in cardiovascular disease // Therapeutic advances in chronic disease. – 2014. – Vol. 5. – №. 4. – P. 178-187.

Kim, E. K. Purification and characterisation of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein / E. K. Kim; S. J. Lee, B. T. Jeon et al. //. Food Chemistry. – 2009. – Vol. 114. – P. 1365–1370. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.11.035

Kjell, J. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies / J. Kjell, L. Olson // Disease models & mechanisms. – 2016. – Vol. 9. – №. 10. – P. 1125-1137. DOI: 10.1242/dmm.025833

Knittelfelder, O. L. A versatile ultra-high performance LC-MS method for lipid profiling / , O. L. Knittelfelder, B. P. Weberhofer, T. O. Eichmann et al. // Journal of Chromatography B. – 2014. – Vol. 951. – P. 119-128. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.01.011

Ko, J. Y. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (Paralichthys olivaceus) using digestive proteases / J. Y. Ko, J. H. Lee, K. Samarakoon et al. // Food Chem Toxicol. – 2013. – Vol. 52. – P. 113–120.

Kotenkova, E. Bovine mucous membranes as a source of antimicrobial compounds / E. Kotenkova, E. Lukinova, L. Kovalyov // Potravinarstvo. – 2018. – Vol. 12. – № 1. – P. 667-672. DOI: 10.5219/976

Kotenkova, E. Influence of technological processing on lipid-lowering activity of substances containing in porcine hearts and aortas/ E. Kotenkova, I. Chernukha // Potravinarstvo. – 2019. – Т. 13. – № 1. – С. 331-336. DOI: 10.5219/1119

Kovaleva, M. Muscle organs proteomics multy-level database / M. Kovaleva, L. Kovalev, K. Lisitskaya et al. // FEBS Journal. – 2013. – Vol. 280. –Supplement 1. – P. 488.

Krafft, P. R. Etiology of stroke and choice of models / P. R. Krafft, E. L. Bailey, T. Lekic et al. // International Journal of stroke. – 2012. – Vol. 7. – №. 5. – P. 398-406. DOI: 10.1111/j.1747-4949.2012.00838.x

Kulczyński, B. Goji Berry (Lycium barbarum): Composition and Health Effects-a Review/ B. Kulczyński, A. Gramza-Michałowska // Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. – 2016. – Vol. 66(2). – P. 67–75. DOI: 10.1515/pjfns-2015-0040

Kumar, D. Effect andevaluation of antihyperlipidemic activity guide disolated fraction from total methanol extract of Bauhinia variegata (linn.) inTritonWR-1339 induced

hyperlipidemic rats / D. Kumar, V. Parcha, A. Maithani, I. Dhulia // Asian Pacific Journal of Tropical Disease. – 2012. – Vol. 2. – P. S909-S913.

Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – №. 5259. – P. 680-685. DOI: 10.1038/227680a0

Landström, E. Health-care professionals' perceived trust in and willingness to recommend functional foods: a qualitative study/ E. Landström, B. Sidenvall, U.K. Koivisto Hursti, M. Magnusson // Appetite. – 2007. – Vol.48(2). – P.241-7. DOI: 10.1016/j.appet.2006.09.008

Langley, M. R. Dietary influence on central nervous system myelin production, injury, and regeneration / M. R. Langley, E. M. Triplet, I. A. Scarisbrick // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. – 2020. – Vol. 1866. – № 7. – P. 165779. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.165779

Laranjo, M. Salt in the Earth : The Role of Salt on Food and Human Health / M. Laranjo, A.C.Agulheiro-Santos, M. E. Potes. Editors: M. Cengiz, S. Karabulut. IntechOpen. BoD – Books on Demand. 2020. – P. 134. DOI: 10.5772/intechopen.86905

Lazarov, O. Hippocampal neurogenesis: learning to remember / O. Lazarov, C. Hollands // Progress in neurobiology. – 2016. – Vol. 138. – P. 1-18. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2015.12.006

Lee, S. Y. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants / S. Y. Lee, S. J. Hur, // Food Chemistry. – 2017. – Vol. 228. – P. 506-517. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.039

Lee, Y. K. The knowledge, attitudes, and practices of dietitians licensed in Oregon regarding functional foods, nutrient supplements, and herbs as complementary medicine/ Y. K. Lee, C. Raab, C. Raab //Journal of the American Dietetic Association. – 2000. – Vol. 100(5). – P. 543–548. DOI:10.1016/S0002-8223(00)00169-3

Liu, A. L. Methods for Generating Hydrogel Particles for Protein Delivery / A. L. Liu, A. J. García // Annals of Biomedical Engineering. – 2016. – Vol. 44. – № 6. – P. 1946-1958. DOI:10.1007/s10439-016-1637-z

Liu, H. Scalp acupuncture attenuates neurological deficits in a rat model of hemorrhagic stroke / H. Liu, X. Sun, W. Zou et al. // Complementary therapies in medicine. – 2017. – Vol. 32. – P. 85-90. DOI: 10.1016/j.ctim.2017.03.014

Liu, H. Scalp acupuncture attenuates neurological deficits in a rat model of hemorrhagic stroke / H. Liu, X. Sun, W. Zou et al. // Complementary therapies in medicine. – 2017. – Vol. 32. – P. 85-90. DOI: 10.1016/j.ctim.2017.03.014

Liu, H. Scalp acupuncture attenuates neurological deficits in a rat model of hemorrhagic stroke / H. Liu, X. Sun, W. Zou et al. // Complementary Therapies in Medicine. – 2017. – Vol. 32. – P. 85-90, DOI: 10.1016/j.ctim.2017.03.014

Liu, Y. Comparative analysis of carotenoid accumulation in two goji fruits / Y. Liu, S. Zeng, W. Sun, M. Wu, W. Hu et al. // BMC Plant Biology. – 2014. – Vol. 14. – P. 269. DOI: 10.1186/s12870-014-0269-4

Logo, T. F. S. Determination of Antioxidant Capacity on the Thermo Scientific Varioskan LUX Multimode Reader [Electronic source] – URL: http://www.thermofisher.com/ru/ru/home.html (accessed accessed: 21.05.2019).

Luo, J. Combination of bone marrow stromal cell transplantation with mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes functional recovery after spinal cord transection / J. Luo, H. T. Zhang, X. D. Jiang, S. Xue, Y. Q. Ke // Acta neurochirurgica. – 2009. – Vol. 151(11). – P. 1483-1492. DOI: 10.1007/s00701-009-0402-6

Ma, Z.F. Goji Berries as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Their Molecular Mechanisms of Action/ Z.F. Ma, H. Zhang, S.S. Teh, C.W. Wang, Y. Zhang, et al.// Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2019. – Vol. 2019. – P. 2437397. DOI:10.1155/2019/2437397

MacLellan, C. L. Rodent models of intracerebral hemorrhage / C. L. MacLellan, G. Silasi, A. M. Auriat et al. // Stroke. – 2010. – Vol. 41. – №. 10_suppl_1. – P. S95-S98. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.594457

MacLellan, C. L. Rodent models of intracerebral hemorrhage / C. L. MacLellan, G. Silasi, A. M. Auriat, F. Colbourne // Stroke. – 2010. – 41(10 Suppl). – S95–S98. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.594457

Maeno, M. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from Lactobacillus helveticus CP790 / M. Maeno, N. Yamamoto, T. Takano // Journal of dairy science. – 1996. – Vol. 79. – №. 8. – P. 1316-1321.

Magdi, M. Mossoba. Trans Fats Replacement Solutions : 5 - Application of Gas Chromatography and Infrared Spectroscopy for the Determination of the Total Trans Fatty Acid, Saturated Fatty Acid, Monounsaturated Fatty Acid, and Polyunsaturated Fatty Acid Contents in Edible Fats and Oils / M. Mossoba Magdi, C. Tyburczy, P. Delmonte et al. Editor(s): Dharma R. Kodali. Published by Elsevier Inc. All rights reserved, 2014. – P. 89-121. ISBN 9780983079156, DOI: 10.1016/B978-0-9830791-5-6.50010-1

Mainville, I. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics / I. Mainville, Y. Arcand, E. R. Farnworth // Int. J. Food Microbiol. – 2005. – № 99. – P. 287-296.

Manjanna, K.M. Calcium alginate cross-linked polymeric microbeads for oral sustained drug delivery in arthritis / K.M. Manjanna, T.M. Pramod Kumar, B. Shivakumar // Drug discoveries & therapeutics. – 2010. – Vol. 4. – № 2. – P. 109-122.

Margiana, R. A New Method in Walking Analysis Using the Angles around the Midpoint between Print Length and Toe Spread by Four Different Color Footprints /R. Margianaa, A. A. Jusuf, R. A. Aman, I. K. Liem , J. A. Pawitan // International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR). – 2015. – Vol. 21. – № 1. – P. 117-128. ISSN 2307-4531

Margiana, R. A New Method in Walking Analysis Using the Angles around the Midpoint between Print Length and Toe Spread by Four Different Color Footprints / R. Margianaa, A. A. Jusuf, R. A. Aman, I. K. Liem, J. A. Pawitan // International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR). – 2015. – Vol. 21. – № 1. – P.117-128. ISSN 2307-4531

Marinkovic, I. A novel combined model of intracerebral and intraventricular hemorrhage using autologous blood-injection in rats / I. Marinkovic, D. Strbian, O. S. Mattila, U. Abo-Ramadan, T. Tatlisumak // Neuroscience. – 2014. – Vol. 272. – P. 286-294. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.001

Marklund, S. L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight / S. L. Marklund // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1982. – Vol. 79. – P. 7634- 7638. DOI: 10.1073/pnas.79.24.7634

Masuda, A. Automated protein hydrolysis delivering sample to a solid acid catalyst for amino acid analysis / A. Masuda, N. Dohmae // Analytical chemistry. – 2010. – Vol. 82. – № 21. – P. 8939-8945.

Matias, A. M. Differential Effects of High Sugar, High Lard or a Combination of Both on Nutritional, Hormonal and Cardiovascular Metabolic Profiles of Rodents / A. M. Matias, W. M. Estevam, P.M. Coelho et al. // Nutrients. – 2018. – Vol. 10. – P. 1071.

Matsui, T. Antihypertensive peptides from natural resources / T. Matsui, K. Matsumoto, T. H. K. Mahmud, A. Arjumand, // Advances in Phytomedicine; Elsevier. – 2006. – Vol. 2. – P. 255–271. DOI: 10.1016/S1572-557X(05)02015-5

Matsumoto, H. Two-Dimensional Gel Electrophoresis by Glass Tube-Based IEF and SDS-PAGE / H. Matsumoto, H. Haniu, B. T. Kurien, N. Komori // In: Kurien B., Scofield R. (eds) Electrophoretic Separation of Proteins. – Humana Press, New York, NY. – 2019. – Vol.1855. – P. 107-113. ISSN: 10643745. DOI: 10.1007/978-1-4939-8793-1_11

Matyash, V. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for highthroughput lipidomics / V. Matyash, G. Liebisch, T. V. Kurzchalia // Journal of lipid research. – 2008. – Vol. 49. – P.1137-1146.

Mayer, H. K. RP-HPLC analysis of furosine and acid-soluble β-lactoglobulin to assess the heat load of extended shelf life milk samples in Austria / H. K. Mayer, B. Raba, J. Meier, A. Schmid // Dairy Sci. Technol. – 2010. – № 90. – P. 413–428. DOI: 10.1051/dst/2009058

Mayorova, A. Investigation of the bischofite gel reparative effect on the linear wound model / A. Mayorova, B. Sysuev, I. Kchanaliyeva et al. // Research Results in Pharmacology. – 2018. – Vol. 4. – № 3. – P. 87-93. DOI: 10.3897/rrpharmacology.4.30697.

Mc Grow, C. P. Experimental cerebral infraction effects of pentobarbital in Mongolian gerbils / C. P. Mc Grow // Archives of neurology. – 1977. – Vol. 34. – № 6 – P. 334-336. DOI: 10.1001/archneur.1977.00500180028006

McCann, J. C. Is docosahexaenoic acid, an n− 3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals / J. C. McCann, B. N. Ames // The American journal of clinical nutrition. – 2005. – Vol. 82. – №. 2. – P. 281-295. DOI: 10.1093/ajcn.82.2.281

McClements, D. J. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review / D. J. McClements // Advances in Colloid and Interface Science. – 2018. – Vol. 253. – P. 1-22. DOI: 10.1016/j.cis.2018.02.002

Meng, Z. DNA damage in mice treated with sulfur dioxide by inhalation / Z. Meng, G. Qin, B. Zhang // Environmental and molecular mutagenesis. – 2005. – Vol. 46. – №. 3. – P. 150-155.

Ménoret, S. In Vivo Analysis of Human Immune Responses in Immunodeficient Rats / S. Ménoret, L. H. Ouisse, L. Tesson // Transplantation: April 2020. – Vol. 104. – Issue 4. – P. 715-723 DOI: 10.1097/TP.0000000000003047

Mestas, J. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology / J. Mestas, C. C. Hughes // Journal of immunology. – 2004. – Vol. 172 (5). – P. 2731-2738. DOI: 10.4049/jimmunol.172.5.2731

Migliorini, L. Food security and nutrition in the Russian Federation - a health policy analysis // Glob Health Action. – 2015. – № 8. – P. 27537. DOI: 10.3402/gha.v8.27537

Minekus, M. A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and the small intestine / M. Minekus, P. Marteau, R. Havenaar // Alternatives to Laboratory Animals. – 1995. – Vol. 23. – № 2. – P. 197-209.

Minekus, M. A standardised static in vitro digestion method suitable for food–an international consensus / M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito et al. //Food & function. – 2014. – Vol. 5. – №. 6. – P. 1113-1124.

Miranda, T.A. Time-related effects of general functional training in spinal cord-injured rats / T. A. Miranda, J. M. Vicente, R. M. Marcon et al. // Clinics (Sao Paulo, Brazil). – 2012. – Vol. 67(7). – P. 799-804. DOI: 10.6061/clinics/2012(07)16

Mocan, A. Functional constituents of wild and cultivated Goji (L. barbarum L.) leaves: phytochemical characterization, biological profile, and computational studies/ A. Mocan, G. Zengin, M. Simirgiotis, M. Schafberg, A. Mollica, D. C. Vodnar, et al // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2017. – V. 32. – P. 153–168. DOI: 10.1080/14756366.2016.1243535

Mocan, A. Polyphenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Lycium barbarum L. and Lycium chinense Mill. Leaves/ A. Mocan, L. Vlase, D.C. Vodnar, C. Bischin, D. Hanganu et al. // Molecules. – 2014. – Vol. 19. – P. 10056-10073. DOI: 10.3390/molecules190710056

Mohamad, N. R. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes / N. R. Mohamad, N. H. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, R. A. Wahab // Biotechnology, biotechnological equipment. – 2015. – Vol. 29. – №2. – P. 205-220. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192

Mohan, A. Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review / A. Mohan, C. K. Rajendran, R. Subin, Q. He, L. Bazinet, C. Udenigwe //. Royal Society of Chemistry. – 2015. – №. 5. – P. 79270-79278. DOI: 10.1039/C5RA13419F

Mohebi-Nejad, A. Omega-3 supplements and cardiovascular diseases/ A. Mohebi-Nejad, B. Bikdeli //Tanaffos. – 2014. – Vol.13(1). – P. 6–14.

Möller, N.P. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects/ N.P. Möller, K.E. Scholz-Ahrens, N. Roos // European Journal of Nutrition. – 2008. – Vol. 47. – P.171–182. DOI:10.1007/s00394-008-0710-2

Möller, N.P. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects / N. P. Möller, K. E. Scholz-Ahrens, N. Roos, J. Schrezenmeir // European journal of nutrition. – 2008. – Vol. 47. – P. 171-182. DOI: 10.1007/s00394-008-0710-2

Mondello, L. Comprehensive two-dimensional gas chromategraphy-mass spectrometry: A review / L. Mondello, P. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo // Mass spectrometry reviews. – 2008. – Vol. 27. – №. 2. – P. 101-124.

Moore, D. R. The Biological Value of Protein / D. R. Moore, P. B. Soeters // Nestle Nutr Inst Workshop Ser. – 2015. – Vol. 82. – P. 39-51. DOI: 10.1159/000382000. Epub 2015 Oct 20. PMID: 26545252.

Morais, R. R.. Immobilization of α-Amylase onto Luffa operculata Fibers / R. R. Morais, A. M. Pascoal, S. S. Caramori, F. M. Lopes, K. F. Fernandes // Enzyme Research. – 2013. – Vol. 2013. – ID. 803415. DOI: 10.1155/2013/803415

Morup, I. New method for prediction of protein value from essential amino acidpattern / I. Morup, E. Olesn // Nutrition Reports International. – 1976. – Vol. 13. – P. 355-365

Moughan, P. J. Dietary peptides increase gut endogenous amino acid losses in adult humans / P. J. Moughan, C. A. Butts, A. M. Rowan, A. Deglaire // American Journal of Clinical Nutrition. – 2005. – Vol. 81. – № 6. – P. 1359-1365.

Mwangi, S. Effect of manganese preconditioning and replacing inorganic manganese with organic manganese on performance of male broiler chicks/ S. Mwangi, J. Timmons, T. Ao, M. Paul, L. Macalintal, et al. // Poultry Science. – 2019. – Vol. 98(5). – P. 2105-2113. DOI:10.3382/ps/pey564.

Nasri, R. Marine-Derived Bioactive Peptides as New Anticoagulant Agents: A Review / R. Nasri, M. Nasri // Current protein & peptide science. – 2013. – Vol. 14(3). – P.199-204. DOI: 10.2174/13892037113149990042.

Nguyen, T. T. The Cholesterol-Lowering Action of Plant Stanol Esters// The Journal of Nutrition. – 1999. – Vol. 129(12). – P. 2109–2112. DOI:10.1093/jn/129.12.2109

Nkwonta, C. G. Comparative effects of moist and dry heat on nutrient potentials of tetracarpidium conophorum nut in rats / C. G. Nkwonta, C. A. Ezeokonkwo, I. C. Obizoba // Pakistan J Nutr. – 2013. – Vol. 12. – P. 89–92.

O'Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // Journal of Biological Chemistry. – 1975. – V. 250. – № 10. – P. 4007-4021.

O'Lynnger, T.Blood Injection Intracerebral Hemorrhage Rat Model In: J. Chen, Z. Xu, X. Xu, J. Zhang (eds) Animal Models of Acute Neurological Injury. Springer Series in Translational Stroke Research. Springer, Cham. – 2019. – P. 257-262. DOI: 10.1007/978-3-030-16082-1_18

O'Donovan, C. High-quality protein knowledge resource: SWISS-PROT and TrEMBL/ C. O'Donovan, M. J. Martin, A. Gattiker et al. // Briefings in bioinformatics. – 2002. – Vol. 3. – №. 3. – P. 275-284. DOI: 10.1093/bib/3.3.275

Ogunji, J. O. Effect of dietary protein con-tent on growth, food conversion and body compositionof Oreochromis niloticus fingerlings, fed fish mealdiet / J. O. Ogunji, M. J. Wirth // – 2000. – Vol. 15. – № 4. – P. 381-389.

Ojimelukwe, P. Phenolic content and antioxidant activity of some under-utilized Nigerian yam (Dioscorea spp.) and cocoyam (Xanthosoma maffa (scoth)) tubers/ P. Ojimelukwe, A. Ukom, C. Ezeama, D.O Oritz, I.J. Aragon // IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology. – 2014. – Vol. 8. – P. 104-111. DOI:10.9790/2402-0871104111

Ottino, J.M. New Tools, New Outlooks, New Opportunities//AIChE Journal. – 2005. – Vol. 51(7). – P. 1839-1845.

Ou, B. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe / B. Ou, M. Hampsch-Woodil, R.L. Prior // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2001. – Vol. 49. – № 10. – P. 4619-4626. DOI: 10.1021/jf010586o

Oulmouden, F. Hypolipidemic and Anti-Atherogenic Effect of Aque ous Extract of Fennel (Foeniculum Vulgare) Extractinan Experimental Model of Atherosclerosis Induced by Triton WR-1339 / F. Oulmouden, R. Saïle, N. ElGnaoui et al. // European Journal of Scientific Research. – 2011. – V. 52. – № 1. – P.91-99.

Özyürek, M. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement / M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2011. – Vol. 30. – P. 652–664. DOI: 10.1016/j.trac.2010.11.016

Pai, P.G. Evaluation of Hypolipidemic Effects of Lycium Barbarum (Goji berry) in a Murine Model / P.G. Pai, P. Habeeba, S. Ullal // Journal of Natural Remedies. – 2013. – Vol. 13. – № 1. – P.1-5. DOI: 10.18311/jnr/2013/110

Pellizzon, M. Choice of laboratory animal diet influences intestinal health // Lab Anim. – 2016. – Vol. 45. – P. 238–239 (2016). DOI: 10.1038/laban.1014

Pipelzadeh, M. H. An Experimental Model for Studying Atherosclerosis / M. H. Pipelzadeh, A. Dezfulian, M. H. Koocheck, M. Moradi // Iranian Biomedical Journal. – 2003. – Vol. 7. – № 2. – P. 65-71.

Pogozheva, A. V. Contemporary approaches to nondrug correction of hypercholesterolemia // Kardiologiia. – 2010. – Vol. 50. – №. 4. – P. 86-91.

Popov, D.V. Preparation of human skeletal muscle samples for proteomic analysis with isobaric iTRAQ labels / D.V. Popov, O. L. Vinogradova, V. G. Zgoda // Molecular Biology. – Vol. 53. – № 4. – P. 685-691 DOI: 10.1134/S0026898419040104

Porsolt, R. D. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments / R. D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, M. Jalfre // European journal of pharmacology. – 1978. – Vol. 47. – № 4. – P. 379-381. DOI: 10.1016/0014-2999(78)90118-8

Potterat, O. Goji (Lycium barbarum and L. chinense): Phytochemistry, Pharmacology and Safety in the Perspective of Traditional Uses and Recent Popularity// Planta Medica. – 2010. – Vol. 76. – P. 7–19. DOI: 10.1055/s-0029-1186218

Pranami, D. Lactulose: a prebiotic, laxative and detoxifying agent/ D. Pranami, R. Sharma, H. Pathak // Drugs & Therapy Perspectives. – 2017. – Vol. 33. – P. 228–233. DOI:10.1007/s40267-017-0384-z

Qing, Ji. Recent Advance in Applications of Proteomics Technologies on Traditional Chinese Medicine Research / Ji Qing, Zhu Fangshi, Liu Xuan et al. // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2015. – Vol. 2015. – P. 13. Article ID 983139. DOI: 10.1155/2015/983139

Ramos, S. Dietary flavanols exert different effects on antioxidant defenses and apoptosis/proliferation in Caco-2 and SW480 colon cancer cells / S. Ramos, I. Rodríguez-Ramiro, M. A. Martín et al. // Toxicol In Vitro. – 2011. – Vol. 25. – № 8. – P.1771–1781.

Rankinen, T. Genetics of food intake and eating behavior phenotypes in humans / T. Rankinen, C. Bouchard // Annu. Rev. Nutr. – 2006. – Vol. 26. – P. 413-434. DOI: 10.1146/annurev.nutr.26.061505.111218.

Rao, A.V. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease/ A.V. Rao, S. Agarwal // Journal of the American College of Nutrition. – 2000. – Vol. 19(5). – P.563-9. DOI: 10.1080/07315724.2000.10718953.

Rasineni, K. Molecular mechanism of alcoholic fatty liver / K. Rasineni, C. A. Casey // Indian journal of pharmacology. – 2012. – Vol. 44. . – № 3. – P. 299-303. DOI: 10.4103/0253-7613.96297

Re, R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente et al. // Free Rad. Biol. Med. – 1999. – Vol. 26. – P. 1231-1237.

Ren, C. Animal Stroke Model: Ischemia–Reperfusion and Intracerebral Hemorrhage / C. Ren, C. Sy, J. Gao et al. In: Kobeissy F., Dixon C., Hayes R., Mondello S. (eds). ; Injury Models of the Central Nervous System. Humana Pressю. – New York: NY, 2016. – P. 373-390. DOI: 10.1007/978-1-4939-3816-2_21

Ren, C. Animal Stroke Model: Ischemia–Reperfusion and Intracerebral Hemorrhage. In: Kobeissy F., Dixon C., Hayes R., Mondello S. (eds) Injury Models of the Central Nervous System. Methods in Molecular Biology. – 2016. – Vol. 1462. – P. 373-390DOI: 10.1007/978-1-4939-3816-2_21

Report of an FAO Expert Consultation: Dietary protein quality evaluation in human nutrition // FAO Food and Nutrition Paper, 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand. – Vol. 92. – P. 1-66. ISBN 978-92-5-107417-6; ISSN 0254-4725

Report of Joint FAO/WHO Expert Consultation: Protein Quality Evaluation // FAO Food and Nutrition Paper, 4-8 December, 1989, Bethseda, Md., USA, in. 51. – Vol. 51. – P. 1-66. ISBN 92-5-103097-9

Rincón-Cervera, M. Á. Quantification and distribution of omega-3 fatty acids in South Pacific fish and shellfish species / M.Á. Rincón-Cervera, V. González-Barriga, J. Romero et al. // Foods. – 2020. – Vol. 9. – №. 2. – P. 233. DOI: 10.3390/foods9020233

Rogers, D. C. Correlation Between Motor Impairment and Infarct Volume After Permanent and Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat / D. C. Rogers, C. A. Campbell, J. L. Stretton, K. B. Mackay // Stroke. – Vol. 28. – P. 2060-2066. DOI: 10.1161/01.str.28.10.2060

Rubattu, S. Reduced brain UCP2 expression mediated by microRNA-503 contributes to increased stroke susceptibility in the high-salt fed stroke-prone spontaneously hypertensive rat / S. Rubattu, R. Stanzione, F. Bianchi et al. // Cell death & disease. – 2017. – Vol. 8. – №. 6. – P. e2891-e2891. DOI: 10.1038/cddis.2017.278

Ruiz-Gutierrez, V. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds / V. Ruiz-Gutiérrez, M. C. Perez-Camino // Journal of Chromatography A. – 2000. – Vol. 885. – P. 321–341.

Ryan, J.T. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish / J. T. Ryan, R. P Ross., D. Bolton, G. F Fitzgerald., C. Stanton // Nutrients. – 2011. – Vol. 3. – № 9. – P. 765-791. DOI: 10.3390/nu3090765

Sahare, P. Immobilization of peroxidase enzyme onto the porous silicon structure for enhancing its activity and stability / P. Sahare, M. Ayala, R. Vazquez-Duhalt, V. Agrawal // Nanoscale Research Letters. – 2014. – Vol. 9. – № 1. – P. 409. DOI: 10.1186/1556-276X-9-409

Samaranayaka, A. G. Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a Pacific Hake (Merluccius productus) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation / A. G. Samaranayaka, D. D. Kitts, E. C. Li-Chan// J Agric Food Chem. – 2010. – Vol. 58. – № 3. – P. 1535–1542.

Sansing, L. H. Autologous blood injection to model spontaneous intracerebral hemorrhage in mice/ L. H. Sansing, S. E. Kasner, L. McCulloug // Journal of visualized experiments : JoVE. – 2011. – 54. – 2618. DOI: 10.3791/2618

Santini, A. State of the art of Ready-to-Use Therapeutic Food: A tool for nutraceuticals addition to foodstuff / A. Santini, E. Novellino, V. Armini, A. Ritieni // Food Chemistry. – 2013. – Vol.140(4). – P.843-9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.098

Santos-Silva, J. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: II. Fatty acid composition of meat / J. Santos-Silva, R. J. B. Bessa, F. Santos-Silva // Livestock Production Science. – 2002. – Vol. 77. – № 2-3. – P. 187-194.

Saravanakumar, A. Hypolipidemic activity of Sesbania grandiflora in triton wr-1339 induced hyperlipidemic rats / A. Saravanakumar, S. Vanitha, M. Ganesh et al. // International Journal of Phytomedicine. – 2010. – № 2. – P.52-58.

Sarker, B. Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physicochemical properties / B. Sarker // Journal of materials chemistry. B. – 2014. – Vol.2. – № 11. – P. 1470-1482. DOI: 10.1039/c3tb21509a

Sarwar, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats // The Journal of nutrition. – 1997. – Vol. 127. – №. 5. – P. 758–764.

Sasidharan, S. R. An Experimental Approach for Selecting Appropriate Rodent Diets for Research Studies on Metabolic Disorders / S. R. Sasidharan, J.A. Joseph, S. Anandakumar et al. // BioMed research international. – 2013. – Vol. 2013. DOI: 10.1155/2013/752870

Satish Rao, B. S. Cytoprotective and antigenotoxic potential of Mangiferin, a glucosylxanthone against cadmium chloride induced toxicity in HepG2 cells / B. S. Satish Rao, M. V. Sreedevi, B. Nageshwar Rao// Food Chem Toxicol. – 2009. – Vol. 47. – № 3. – P. 592–600.

Schaafsma, G. The protein digestibility-corrected amino acid score // The Journal of nutrition. – 2000. – Vol. 130. – № 7. – P. 1865S-7S. DOI: 10.1093/jn/130.7.1865S. PMID: 10867064.

Schaafsma, G. The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score // The Journal of nutrition. – 2000. – Vol. 130. – №. 7. – P. 1865S-1867S.

Senaphan, K. Ferulic acid alleviates changes in a rat model of metabolic syndrome induced by high-carbohydrate, high-fat diet / K. Senaphan, U. Kukongviriyapan, W. Sangartit et al. // Nutrients. – 2015. – Vol. 7. P. 6446-6464. DOI: 10.3390/nu7085283;

Serviddio, G. Measurement of mitochondrial membrane potential and proton leak / G. Serviddio, J. Sastre // Methods Mol Biol. – 2010. – Vol. 594. – P. 107-121.

Severino, P. Alginate nanoparticles for drug delivery and targetin / P. Severino, C. F. da Silva, L. N.Andrade et al. // Current Pharmaceutical Design. – 2019. – Vol. 25. – № 11. – P. 1312-1334. DOI: 10.2174/1381612825666190425163424

Shiby, V. K. Fermented milks and milk products as functional foods--a review/ V. K. Shiby, H. N. Mishra // Critical reviews in food science and nutrition. – 2013. – Vol.53(5). – P. 482–496. DOI:10.1080/10408398.2010.547398

Shin, Z. I. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo / Z. I. Shin, R. Yu, S. A. Park et al. // J Agric Food Chem. – 2001. – Vol. 49. – № 6. – P. 3004-3009.

Shishkin, S. S. The application of proteomic technologies for the analysis of muscle proteins of farm animals used in the meat industry (Review) / S. S. Shishkin, L. I. Kovalev, M. A. Kovaleva et al. // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2014. – Vol. 50. – № 5. – P. 421-432.

Shukla, A. K. Spectroscopic Techniques & Artificial Intelligence for Food and Beverage Analysis / A. K. Shukla. Publisher: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2020. – P. 121. ISBN: 9789811564949

Silagy, C.A. A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure/ C.A. Silagy, H.A. Neil // Journal of Hypertension. – 1994. – Vol. 12(4). – P.463-8.

Skenderidis, P. Chemical Properties, Fatty-Acid Composition, and Antioxidant Activity of Goji Berry (Lycium barbarum L. and Lycium chinense Mill.) Fruits/ P. Skenderidis, D. Lampakis, I. Giavasis, S. Leontopoulos, K. Petrotos, et al. // Antioxidants (Basel, Switzerland). – 2019. – Vol. 8(3). – P. 60. DOI: 10.3390/antiox8030060

Slastin, V. Specific Influence of different food fatty acids on cardiovascular system / V. Slastin, Y. Samusieva, L. Moskalchuk, O. Usatiuk // Scientific Works of NUFT. – 2015. – Vol. 21. – № 4. – P. 7-16.

Snyder, J. S. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice / J. S. Snyder, J. S. Choe, M. A. Clifford et al. // Journal of Neuroscience. – 2009. – Vol. 29. – №. 46. – P. 14484-14495. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009

Sosnik, A. Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art / A. Sosnik // ISRN Pharmaceutics. – 2014. – Vol. 2014 - ID. 926157. DOI: 10.1155/2014/926157

Spano, M. Micronutrients' Role in Heart Disease — Some of Them Can Decrease or Increase the Risk// Today's Dietitian. – 2012. – Vol. 14. – №11. – P. 20.

Srikantia, S. G. The use of biological value of a protein in evaluating its quality for human requirements [Electronic resource] // Joint FAO / WHO / UNU Expert Consultation on Energy and Protein Requirements Rome, 5 to 17 October, 1981. – URL: www.fao.or/ocre/eetin/0/2835/2835e00.htm (accessed accessed: 20.04.2011).

Suman, R. K. Development of an experimental model of diabetes co-existing with metabolic syndrome in rats / R. K. Suman, I. Ray Mohanty, M. K. Borde et al. // Adv Pharmacol Sci. – 2016. – Vol. 2016. DOI: 10.1155/2016/9463476

Sun, L. Characterization, antioxidant activities and hepatoprotective effects of polysaccharides from pre-pressing separation Fuji apple peel/ L. Sun, Y. Meng, J. Sun, Y. Guo // CyTA: Journal of food. – 2017. – Vol. 15(2). – P. 307–319.

Sunkara, A. Supplemental Vitamins and Minerals for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment/ A. Sunkara, A. Raizner // Methodist DeBakey cardiovascular journal. – 2019. – Vol. 15(3). – P. 179–184. DOI:10.14797/mdcj-15-3-179

Susnea, I. Application of MALDI-TOF-mass spectrometry to proteome analysis using stain-free gel electrophoresis / I. Susnea, B. Bernevic, M. Wicke et al. // Applications of Maldi-Tof spectroscopy. – 2012. – P. 37-54. DOI: 10.1007/128_2012_321

Tammen, S. A., Friso S., Choi S. W. Epigenetics: the link between nature and nurture //Molecular aspects of medicine. – 2013. – Т. 34. – №. 4. – С. 753-764.

Tamura, A. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion / A. Tamura, D. J. Graham // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 1981. – Vol. 1. – №. 1. – P. 53-60.

Tavano, O. L. Biotechnological applications of proteases in food technology / O. L. Tavano, A. Berenguer-Murcia, F. Secundo et al. // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2018. – Vol. 17. – № 2. – P. 412-436. DOI: 10.1111/1541-4337.12326

Tiffon, C. The impact of nutrition and environmental epigenetics on human health and disease // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19. – №. 11. – P. 3425. DOI: 10.3390/ijms19113425

Toldrá, F. Proteomics in Foods: Principles and Applications / F. Toldrá, Leo M. L. Nollet/ Part of the Food Microbiology and Food Safety book series (FMFS, volume 2). – 2013. 10.1007/978-1-4614-5626-1.

Trevisiol, S. The use of proteases complementary to trypsin to probe isoforms and modifications / S. Trevisiol, D. Ayoub, A. Lesur et al. // Proteomics. – 2016. – V. 16. – №. 5. – P. 715-728.

Udenigwe, C. C. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research / C. C. Udenigwe // Trends in Food Science & Technology. – 2014. – Vol. 36. – P. 137-143. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.02.004

Ulbricht, T. L. V. Coronary heart disease: seven dietary factors / T. L. V. Ulbricht, D. A. T. Southgate // The lancet. – 1991. – Vol. 338. – №. 8773. – P. 985-992.

Vahidinia, Z. The protective effect of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of ischemic stroke via reducing the C-Jun N-terminal kinase expression / Z. Vahidinia, A. A. Tameh, M. Nejati et al. // Pathology-Research and Practice. – 2019. – Vol. 215. – №. 9. – P. 152519. DOI: 10.1016/j.prp.2019.152519

Veniaminova, E. Metabolic, Molecular, and Behavioral Effects of Western Diet in Serotonin Transporter-Deficient Mice: Rescue by Heterozygosity? / E. Veniaminova, R. Cespuglio, I. Chernukha et al. // Front Neurosci. – 2020. – Vol. 14. – № 24. DOI: 10.3389/fnins.2020.00024

Wang, L. Role of oxidative stress, apoptosis, and intracellular homeostasis in primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to cadmium / L. Wang, J. Cao, D. Chen// Biol Trace Elem Res. – 2009. – Vol. 127. – P. 53–68.

Wang, N. Preparation and Characterization of Agarose Hydrogel Nanoparticles for Protein and Peptide Drug Delivery / N. Wang, X. S. Wu // Pharmaceutical Development and Technology. – 1997. – Vol. 2. – № 2. – P. 135-142. DOI: 10.3109/10837459709022618

Wang, Y. Barley β-glucan reduces blood cholesterol levels via interrupting bile acid metabolism/ Y. Wang, S.V. Harding, S.J. Thandapilly, S.M. Tosh, P.J.H. Jones, N.P. Ames// The British journal of nutrition. – 2017. – Vol.118(10). – P. 822-829. DOI:10.1017/S0007114517002835

Waterland, R. A. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis / R. A. Waterland, K. B. Michels //Annu. Rev. Nutr. – 2007. – Vol. 27. – P. 363-388.

Weininger, J. Encyclopedia Britannica : Nutritional disease, 11 Nov. 2020 [electronic source] – URL: https://www.britannica.com/science/nutritional-disease (accessed accessed: 31.01.2021)

Weir M. R. Optimal Dietary Strategies for Reducing Incident Hypertension / M. R. Weir, C. A. M. Anderson // Hypertension. – 2009. – № 54. – P. 698-699. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.136630

Westermeier, R. Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design. 2 completely revised edition / R. Westermeier, T. Naven, H. R. Hopker; British library. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008. – P. 502. ISBN: 978-3-527-31941-1.

Wichers, H. Immunomodulation by food: promising concept for mitigating allergic disease? / H. Wichers // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2009. – Vol. 395. – P. 37-75. DOI: 10.1007/s00216-009-2838-1

Wiśniewski, J. R. Universal sample preparation method for proteome analysis / J. R. Wiśniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, M. Mann // Nature Methods. – 2009. – № 6(5). – 359-362. DOI: 10.1038/nmeth.1322

Wójcicki, K. Near and mid infrared spectroscopy and multivariate data analysis in studies of oxidation of edible oils / K. Wójcicki, I. Khmelinskii, M. Sikorski, E. Sikorska // Food Chemistry. – 2015. Vol. 187. – P. 416-423. ISSN 0308-8146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.04.046

Wojcieszek, J. Speciation analysis and bioaccessibility evaluation of trace elements in goji berries (Lycium Barbarum, L.) / J. Wojcieszek, P. Kwiatkowski, L. Ruzik // Journal of Chromatography. – 2017. – Vol. 1492. – P. 70-78. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.02.069

Wu, H. Dietary and pharmacological fatty acids and cardiovascular health / H. Wu, L. Xu, C. M. Ballantyne // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. // – 2020. – Vol. 105. – P. 1030-1045.

Yan, F. Probiotics and immune health/F. Yan, D. B. Polk //Current opinion in gastroenterology. – 2011. – Vol. 27(6). – P.496–501. DOI:10.1097/MOG.0b013e32834baa4d

Yao, H. Standards and pitfalls of focal ischemia models in spontaneously hypertensive rats: with a systematic review of recent articles / H. Yao, T. Nabika // Journal of translational medicine. – 2012. – Vol. 10. – P. 139. DOI: 10.1186/1479-5876-10-139

Yehuda, S. Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging / S. Yehuda, S. Rabinovitz, D. I. Mostofsky // Neurobiol Aging. – 2005. – Vol. 26. – № 1. – P. 98-102. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.013.

Yust M. M. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase / M. M. Yust, J. Pedroche, J. Giron-Calle, M. Alaiz, F. Millan, J. Vioque // Food Chemistry. – 2003. – Vol. 81(3). – P. 363-369. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00431-4.

Zeng, Y.W. Strategies of functional food for cancer prevention in human beings/ Y.W. Zeng, J.Z. Yang, X.Y. Pu, J. Du, T. Yang, et al.// Asia Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2013. – Vol. 14(3). – P.1585-92. DOI: 10.7314/apjcp.2013.14.3.1585

Zhang, L. Diet-dependent net acid load and risk of incident hypertension in United States women / L. Zhang, G. C. Curhan, J. P. Forman // Hypertension. – 2009. – № 54. – P. 751-755.

Zhao, X. Comparisons of cytoprotective effects of three flavonoids against human hepatocytes oxidative injury induced by hydrogen peroxide or carbon tetrachloride in vitro / X. Zhao, X. Zhang // Journal of Medicinal Plants Research. – 2009. – Vol. 3. – № 10. – P. 776–784.

Zheng, Y. Polysaccharide-based nanocomposites and their applications / Y. Zheng, J. Monty, R. J. Linhardt // Carbohydrate research. – 2015. – Vol. 405. – P. 23-32. DOI: 10.1016/j.carres.2014.07.016

Zhong, Y. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods: Handbook of Antioxidants for Food Preservation / Y. Zhong, F. Shahidi. Ed.: F. Shahidi; Woodhead Publishing: UK, 2015. – P. 287-333. DOI: 10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9

Zuo, Q. Preparation and characterization of PEM-coated alginate microgels for controlledrelease of protein / Q. Zuo, J. Lu, A. Hong et al. // Biomedical materials (Bristol, England). – 2012. – Vol. 7. – № 3. – ID. 035012. DOI:10.1088/1748-6041/7/3/035012

Абасова, Л. И. Артериальная гипертензия и метаболический синдром. Особенности антигипертензивной терапии / Л. И. Абасова, Р. Л. Дашдамиров, А. Б. Бахшалиев // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2011. – Т. 10. – № 4. – С. 107-109. DOI: 10.15829/1728-8800-2011-4-107-109

Акмурзина, В. А. От анализа липидов к липидомике / В. А. Акмурзина, А. А. Селищева, В.И. Швец // Тонкие химические технологии. – 2012. – Т. 7. – № 6. – С. 3-21

Алборов, Р. Г. Зависимость между антиоксидантными свойствами витаминов и их влиянием на толерантность к тромбину / Р. Г.Алборов, С. Л.Галян, С. В.Миневцев и др. // Медицинская наука и образование Урала. – 2005. – № 3. – С. 64-66

Апрятин, С. А. Сравнительная характеристика in vivo моделей гиперлипидемии у крыс линии Вистар и мышей линии C57BL/6 / С. А. Апрятин, К.В. Мжельская, Н.В. Трусов и др. // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – № 6. – С. 14-23. DOI:10.24411/0042-8833-2016-00073

Ахремко, А. Г. Методы определения содержания мясных белков в мясных продуктах / А. Г. Ахремко, В. А. Пчелкина, Е. А. Котенкова, И. М. Чернуха // Все о мясе. – 2017. – № 2. – С. 46-48.

Ахремко, А. Г. Протеомные базы данных, применяемые в пищевой индустрии / А. Г. Ахремко, М. А. Арюзина // Инновационные технологии производства и хранения материальных ценностей для государственных нужд. – 2020. – № 14. – С. 34-43.

Ахремко, А. Г. Сравнительное исследование методов количественного определения белка на примере экстрактов органов SUS SCROFA / А. Г. Ахремко, Е. А Иванова // Научное обеспечение инновационных технологий производства и хранения сельскохозяйственной и пищевой продукции. Сборник материалов I Международной научно-практической конференции молодых ученых и аспирантов. – Краснодар: ГНУ ВНИИТТИ Россельхозакадемии, 2018. – С. 403-408.

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. DOI: 10.21323/2071-2499-2019-1-54-57

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.

Бекмурзинова, Ф. К. Оценка изменения длины теломер хромосом как критерий продолжительности жизни в бариатрической практике / Ф. К. Бекмурзинова, О. Б.

Оспанов, А. Р. Акильжанова // Ожирение и метаболизм. – 2020. – Т. 17. – № 2. – С. 125-129. DOI: 10.14341/omet10331

Беленичев И. Ф. Влияние тиотриазонина на гистоморфологические изменения нейронов коры и гиппокампа в постинсультный период [Текст] / И. Ф. Беленичев, И. А. Мазур, Ю. М. Колесник // Новости медицины и фармации. – 2007. – № 5 – С. 14-25.

Бойцов, С. А. Кардиоваскулярная профилактика 2017. Российские национальные рекомендации / С. А. Бойцов, Н. В. Погосова, М. Г. Бубнов // Российский кардиологический журнал. – 2018. – № 6.

Боровик, Т. Э. Длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты и их роль в детском питании. Обзор литературы / Т. Э. Боровик, С. Г. Грибакин, В.А. Скворцова и др. // Вопросы современной педиатрии. – 2012. – Т. 11. – №. 4. – С. 21-28. DOI: 10.15690/vsp.v11i4.355

Бруевич, Н. А. Проектирование систем адекватного питания с использованием технологий машинного обучения / Н. А. Бруевич, М. А. Никитина // Технологии информационного общества : сборник трудов XIV Международной отраслевой научно-технической конференции, г. Москва, 18-19 марта, 2020 г. – С. 417-420.

Бышевский, А. Ш. О перспективах коррекции природными цеолитами гемостатических сдвигов / А. Ш. Бышевский, В. Г.Соловьев // Тюмень. – 2007. – С. 119.

Бышевский, А. Ш. Связь гемостаза с перекисным окислением липидов / А. Ш.Бышевский, М. К. Умутбаева, Р. Г. Алборов // М.: Медицинская книга. – 2003. – С. 95.

Вайсерман, А. М. Эпигенетическая эпидемиология возраст-зависимых заболеваний / А. М. Вайсерман, В. П. Войтенко, Л. В. Мехова // Онтогенез. – 2011. – Т. 42. – №. 1. – С. 30-50.

Василевская, Е. Р. Методология изучения переваривания и всасывания белков пищевых продуктов in vitro / Е. Р. Василевская, А. Г. Ахремко, А. С. Грызлова, Е. А. Иванова // Все о мясе. – 2019. – № 6. – С. 42-44. DOI: 10.21323/2071-2499-2019-6-42-44.

Василевская, Е. Р. Перспективные возможности снижения отходов при переработке сырья животного происхождения с помощью их использования в качестве биологической добавки / Е. Р. Василевская, Е. А. Иванова // Инновационные аспекты технологий производства, экспертизы качества и безопасности сельскохозяйственного сырья и пищевых продуктов : материалы международной научно-практической конференции посвященной 90-летнему юбилею биотехнологического факультета. – пос. Персиановский: 2019. – С. 253-261.

Василевская, Е. Р. Разработка кормовой добавки на основе биологически активных веществ из сырья животного происхождения [Текст] автореферат дис... канд. тех. наук: 05.18.04 / Е.Р. Василевская. – М.: 2019. – 24 с.

Василевская, Е. Р. Разработка кормовой добавки на основе биологически активных веществ из сырья животного происхождения [Текст] дис... канд. тех. наук: 05.18.04 / Е.Р. Василевская. – М.: 2019. – 24 с.

Вершинин, В. И. Определение суммарного содержания фенольных антиоксидантов в модельных смесях по методу Фолина-Чокальтеу и по методу FRAP / В. И. Вершинин, Е. В. Белова // Аналитика и контроль. – 2019. – Т. 23. – № 3. – С. 314-322. DOI: 10.15826/analitika.2019.23.3.008.

Высоцкий В. Г. К вопросу о терминологии, применяемой при биологической характеристике качества белка / В. Г. Высоцкий, Т. А. Яцишина, Е. М. Мамаева // Вопросы питания. – 1977. – № 6 – С. 3-9.

Высоцкий, В. Г. О методе определения биологической ценности белков / В. Г. Высоцкий, Т. А. Яцишина, Т. В. Рыманенко // Медицинский реферативный журнал. – 1976. – №. 6. – С. 24-35.

Гаврилова, О. А. Состояние системы «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» у подростков различных этнических групп с экзогенно-конституциональным ожирением [Текст] : специальность 14.03.03 : автореф. дисс… канд. мед. наук / Гаврилова Оксана Александровна ; ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека». – Иркутск, 2019. – С. 120.

Гаджиев, Г. Э. Особенности питания населения в регионах, полярных по распространенности артериальной гипертонии // Российский кардиологический журнал. – 2002. – № 5. – С. 84-86. DOI:10.15829/1560-4071-2002-5-85-86

Гаевый, М. Д. Ишемия головного мозга, вызванная гравитационной перегрузкой. / М. Д. Гаевый, Л. М. Аджиенко, Л. М. Макарова, А. А. Абдулсалам // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – Т. 63, № 3 – С. 63-64

Гайдай, Д. С. Разработка модели иммуносупрессии у кроликов, вызванной внутривенным введением циклофосфамида / Д. С.Гайдай, А. Е.Кательникова, К. Л. Крышень и др. // Лабораторные животные для научных исследований. – 2019. – № 2. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-modeli-immunosupressii-u-krolikov-vyzvannoy-vnutrivennym-vvedeniem-tsiklofosfamida (дата обращения: 29.01.2021).

Гайдай, Д. С. Разработка модели иммуносупрессии у кроликов, вызванной внутривенным введением циклофосфамида / Д. С. Гайдай, А. Е. Кательникова, К. Л. Крышень // Лабораторные животные для научных исследований. – 2019. – № 2. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-modeli-immunosupressii-u-krolikov-vyzvannoy-vnutrivennym-vvedeniem-tsiklofosfamida (дата обращения: 29.01.2021).

Гайдай, Е. А. Генетическое разнообразие экспериментальных мышей и крыс: история возникновения, способы получения и контроля / Е. А. Гайдай, Д. С. Гайдай // Лабораторные животные для научных исследований. – 2019. – № 4. URL: http://labanimalsjournal.ru/ru/2618723x-2019-04-09 (дата обращения: 29.01.2021)

Галян, С.Л. Краткие сведения о роли тканевого фактора в регуляции свертывания крови. Глава в кн. О роли щитовидной железы в регуляции гемостаза / С.Л.Галян, А.Ш. Бышевский, Г.А. Сулкарнаева, П.Я.Шаповалов// М.: Медицинская книга. 2006. - С.7-13.

Ганнушкина, И.В. Функциональная ангиоархитектоника головного мозга [Текст] / И. В. Гуннушкина, В. П. Шафранова, Т. В. Рясина. - М.: Медицина, 1977. - 240 с.

Гаппарова, К. М. Клинико-патогенетическая оценка эффективности сочетанного использования растительных и животных источников омега-3 кислот в диетотерапии больных ИБС с нарушенной толерантностью к глюкозе [Текст] : специальность 14.01.04: автореф. дисс… канд. мед. наук / Гаппарова Камилат Минкаиловна ; ГУ "Начно-исследовательский институт питания РАМН". – Москва, 2005. – С. 116.

Гимадиева, А. Р. Экспресс-оценка антиоксидантной активности производных урацила / А. Р. Гимадиева, Ю. З. Хазимуллина, Е. А. Белая и др. // Биомедицинская химия. – 2015. – № 61. – С. 765–769.

Горбатюк, Н. О. Изучение влияния суммы тритерпеновых кислот облепихи (Hippophaë rhamnoides L.) и клюквы (Vaccinium oxycoccos L.) на липолиз в жировой ткани лабораторных животных при курсовом введении / Н. О. Горбатюк, М. В. Черников, А. Ю. Терехов, С. Ю. Маширова // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-19. – С. 4231-4234.

ГОСТ 104444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов = Food products. Methods for determination of quantity of mesophilic aerobes and facultative anaerobes : утвержден и введен в действие Постановлением Комитета Российской Федерации по стандартизации, метрологии и сертификации 21 февраля 1995 г. № 77 : переиздание : дата введения 1996-01-01 / разработан Всероссийским научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности (ВНИИКОП) и Техническим комитетом по стандартизации ТК 93 "Продукты переработки плодов и овощей" . – М.: Стандартинформ, 2010. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 12302-2013. Пакеты из полимерных пленок и комбинированных материалов. Общие технические условия = Packs made of polymeric films and composite materials. General specifications : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 августа 2013 г. № 639-ст : переиздание: дата введения 2014-01-01 / разработан Техническим комитетом по стандартизации ТК 223 "Упаковка" (ОАО "Научно-исследовательский и экспериментально-конструкторский институт тары и упаковки"). – Москва : Стандартинформ, 2019 – Текст : непосредственный.

ГОСТ 13534-2015. Консервы мясные и мясосодержащие. Упаковка, маркировка и транспортирование (Издание с Поправкой) = Meat and meat containing cans. Packing, marking and transportation : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 марта 2016 г. № 192-ст : взамен ГОСТ 13534-89 : дата введения 2017-01-01/ разработан Федеральным государственным бюджетным научным учреждением "Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М.Горбатова" (ФГБНУ "ВНИИМП им.В.М.Горбатова"). – Москва : Стандартинформ, 2019 – Текст : непосредственный.

ГОСТ 23042-2015. Мясо и мясные продукты. Методы определения жира (с Поправкой) = Meat and meat products. Methods of fat determination : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 11 марта 2016 г. № 142-ст : переиздание : дата введения 2017-01-01 / разработан ФГБНУ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" . – М.: Стандартинформ, 2010. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 24297-2013. Верификация закупленной продукции. Организация проведения и методы контроля (с Поправкой) = Verification of purchased products. Organization and methods of control : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 26 августа 2013 г. № 544-ст : переиздание : дата введения 2014-01-01 / разработан Открытым акционерным обществом

"Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации" (ОАО "ВНИИС"). – Москва : Стандартинформ, 2019 – Текст : непосредственный.

ГОСТ 25011-2017. Мясо и мясные продукты. Методы определения белка = Meat and meat products. Protein determination methods : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 6 сентября 2017 г. № 1017-ст : переиздание : дата введения 2018-07-01 / разработан ФГБНУ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" . – М.: Стандартинформ, 2018. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 30726-2001. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида Escherichia coli = Food-stuffs. Methods for detection and determination of Escherichia coli : утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета Российской Федерации по стандартизации и метрологии от 27 июля 2001 г. № 297-ст : введен впервые : дата введения 2002-07-01 / разработан Всероссийским научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности (ВНИИКОП) и МТК 93 "Продукты переработки плодов и овощей" . – М.: Стандартинформ, 2010. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 31659-2012. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella = Food products. Method for the detection of Salmonella spp : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 ноября 2012 г. № 715-ст : введен впервые : дата введения 2013-07-01 / разработан ГНУ ВНИИКОП . – М.: Стандартинформ, 2014. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 31727–2012. Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли общей золы = Meat and meat products. Determination of total ash : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1767-ст : введен впервые : дата введения 2013-07-01 / разработан ГНУ "ВНИИМП им. В.М.Горбатова" Россельхозакадемии . – М.: Стандартинформ, 2013. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 31746-2012. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и Staphylococcus aureus (с Поправкой) = Food products. Methods for detection and quantity determination of coagulase-positive staphylococci and Staphylococcus aureus : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1773-ст : введен впервые : дата введения 2013-07-01 / разработан ГНУ "ВНИИКОП" . – М.: Стандартинформ, 2013. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 31747-2012. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) = Food products. Methods for detection and quantity determination of coliformes : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1771-ст : введен впервые : дата введения 2013-07-01 / разработан ГНУ "ВНИИКОП" . – М.: Стандартинформ, 2013. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 32308-2013. Мясо и мясные продукты. Определение содержания хлорорганических пестицидов методом газожидкостной хроматографии (Переиздание) = Meat and meat products. Gas-liquid chromatography method of determination of the content of chlorine organic pesticide : утвержден и введен в действие Приказом Федерального

агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 1604-ст : переиздание : дата введения 2015-07-01/ разработан ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии . – М.: Стандартинформ, 2019. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур = Guidelines for accommodation and care of animals. Environment, housing and management : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 ноября 2015 г. № 1732-ст : введен впервые : дата введения 2016-07-01 / разработан Некоммерческим Партнерством "Объединение специалистов по работе с лабораторными животными" (Rus-LASA). – М.: Стандартинформ, 2019. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (переиздание) = Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 ноября 2015 г. № 1733-ст : переиздание : дата введения 2016-07-01 / разработан Некоммерческим партнерством "Объединение специалистов по работе с лабораторными животными" (Rus-LASA). – Москва : Стандартинформ, 2019. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 33425-2015. Мясо и мясные продукты. Определение никеля, хрома и кобальта методом электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии (Переиздание) = Meat and meat products. Determination of nickel, chromium and cobalt by electrothermal atomic absorption spectrometry : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 ноября 2015 г. № 1803-ст : переиздание : дата введения 2017-01-01 / разработан ФГБНУ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" . – М.: Стандартинформ, 2019. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 34088-2017. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными животными = Guidelines for accommodation and care of laboratory animals. Rules for keeping and care of farm animals : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 декабря 2017 г. № 1936-ст : переиздание : дата введения 2018-08-01 / разработан Некоммерческим партнерством "Объединение специалистов по работе с лабораторными животными" (Rus-LASA) . – М.: Стандартинформ, 2019. –Текст : непосредственный.

ГОСТ 34132-2017. Мясо и мясные продукты. Метод определения аминокислотного состава животного белка = Meat and meat products. Determination of amino acids composition of animal protein : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 14 сентября 2017 г. № 1093-ст : введен впервые : дата введения 2019-01-01 / разработан ФГБНУ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" . – М.: Стандартинформ, 2017. – Текст : непосредственный.

ГОСТ 34177-2017. Консервы мясные. Общие технические условия = Canned meat. General specifications : национальный стандарт Российской Федерации : издание

официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 декабря 2017 г. № 2038-ст: введен впервые : дата введения 2019-01-01 / разработан Федеральным государственным бюджетным научным учреждением "Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М.Горбатова" (ФГБНУ "ВНИИМП им.В.М.Горбатова"). – Москва : Стандартинформ, 2018 – Текст : непосредственный.

ГОСТ 7269-2015. Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести (Издание с Поправкой) = Meat. Methods of sampling and organoleptic methods of freshness test : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 11 марта 2016 г. № 140-ст : взамен ГОСТ 7269-79 : дата введения 2017-01-01 / разработан Федеральным государственным бюджетным научным учреждением "Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М.Горбатова" (ФГБНУ "ВНИИМП им.В.М.Горбатова"). – Москва : Стандартинформ, 2019 – Текст : непосредственный.

ГОСТ 9793-2016. Мясо и мясные продукты. Методы определения влаги (с Поправкой) = Meat and meat products. Methods for determination of moisture content : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 14 февраля 2017 г. № 47-ст : переиздание : дата введения 2018-01-01 / разработан ФГБНУ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" . – М.: Стандартинформ, 2018. – Текст : непосредственный.

ГОСТ Р 51447-99. Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб = Meat and meat products. Methods of primary sampling : издание официальное : утвержден и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 22 декабря 1999 г. № 602-ст: переиздание : дата введения 2001-01-01 / разработан Временным творческим коллективом с участием членов Технического комитета по стандартизации ТК 116 "Продукты переработки птицы, яиц и сублимационной сушки" . – М.: Стандартинформ, 2018. – Текст : непосредственный.

ГОСТ Р 51766-2001. Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка = Raw material and food-stuffs. Atomic absorption method for determination of arsenic : утвержден и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 27 июня 2001 г. № 249-ст : введен впервые : дата введения 2002-07-01 / разработан Научно-производственной фирмой ООО "КОРТЭК", Федеральным центром государственного санитарно-эпидемиологического надзора и Атлантическим научно-исследовательским институтом рыбного хозяйства и океанографии (АтлантНИРО) . – М.: Стандартинформ, 2011. – Текст : непосредственный.

ГОСТ Р 55481-2013. Мясо и мясные продукты. Качественный метод определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ (Переиздание) = Meat and meat products. Qualitative method for detection of antibiotics residues and other antimicrobial chemotherapeutic agents : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 июня 2013 г. № 361-ст : переиздание : дата введения 2014-07-01/ разработан ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии . – М.: Стандартинформ, 2019. – Текст : непосредственный.

Демидов, Е. А. Применение МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов / Е. А. Демидов, К. В. Старостин, В. М. Попик, С. Е. Пельтек // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 4/1. – С. 758-764.

Драпкина, О. М. Питание и сердечно-сосудистые заболевания / О. М. Драпкина, Я. И. Ашихмин, В. Т. Ивашкин // Трудный пациент. – 2006. – №8. – С.45-48.

Драпкина, О. М. Диета с низким содержанием поваренной соли: за и против / О. М. Драпкина, Р. Н. Шепель // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2015. – Vol. 11. – № 2. – P. 190-195.

Дуля, М. С. Цитокиновый профиль лабораторных инбредных и трансгенных мышей в оценке иммунологического статуса и поиске новых фармакологических регуляторов / М. С. Дуля, В. Н. Каркищенко, Д. В. Хвостов, Р. А. Агельдинов, Н. Н. Каркищенко // Биомедицина. – 2019. – Т. 15. – № 2. – С. 54-62. DOI: 10.33647/2074-5982-15-2-54-62

Егоров, Н. С. Биотехнология: в 8-ми книгах: Учебное пособие для вузов / Н. С. Егоров, В. Д. Самуилов // Кн.7: Иммобилизованные ферменты / И. В. Березин и др. - М.: Высшая школа, 1987. - 159 с.

Замаратская, Г. Протеомика в науке о мясе – современное состояние и перспективы / Г. Замаратская, Ш. Ли // Теория и практика переработки мяса. – 2017. – № 1. – С. 18-26. DOI: 10.21323/2414-438X-2017-2-1-18-26

Захарова, А. М. Определение органических кислот, углеводов и подсластителей в пищевых продуктах и биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А.М. Захарова, Л. А. Карцова, И. Л. Гринштейн // Аналитика и контроль. – 2013. – Т. 17. – № 2. – С. 204-210. ISSN: 2310-757X

Зверева, И.В. Непрерывное внутрисосудистое свертывание крови при отсутствии и избытке в рационе витамина В12 (экспериментальное исследование): дисс….канд. мед. наук: 03.00.04/ Зверева Ирина Владимировна. – Тюмень, 2008. – 102 с.

Зобкова, З. С. Биологическая ценность белка творога, изготовленного с применением трансглутаминазы, и особенности его влияния на растущих крыс / З. С. Зобкова, Л. В. Федулова, Т. П. Фурсова и др. // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87. – №. 2. – С. 44-52. DOI:10.24411/0042-8833-2018-10018

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.

Иванкин, А.Н. Биологически активные вещества из животной ткани и микроорганизмов. Методы получения и структурно-функциональные взаимосвязи [Текст] : специальность 02.00.10 : автореф. … доктора хим. наук / Иванкин Андрей Николаевич ; ВНИИА. – Москва, 1998. – 383 с.

Иванова, И.Л. Возможности коррекции гиперлипидемий природными антиоксидантами/ И.Л. Иванова, В.И. Янькова, В.В. Кнышова, Ю.Н. Лоенко// Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2000. – №6. – С. 22-28.

Иванова, О. М. Радиопротекция и гипертоническая болезнь у больных ишемической болезнью сердца // Вестник новых медицинских технологий. – 2004. – Т. XI, № 4. – С. 54-57.

Какимов А.К. Получение инкапсулированных пробиотиков / А. К. Какимов, Ж. Х. Какимова, А. Е. Бепеева // Практические и теоретические аспекты комплексной переработки продовольственного сырья и создания конкурентноспособных продуктов питания - основа обеспечения импортозамещения и продовольственной безопасности России. – 2016. - № 1. – С. 149-151.

Каркищенко, Н. Н. Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины // Биомедицина. – 2005. – Т. 1. – № 1. – С. 5-16.

Каркищенко, Н. Н., Технология моделирования на лабораторных животных физических методов восстановления организма человека в экстремальных условиях на базе векторной модели функциональных состояний нервной системы / Н. Н. Каркищенко, Ю. А. Чудина, А.Е. Емельянова и др. // Биомедицина. – 2016. – № 2. – С.4-14.

Качковский, М. А. Гемостазиологические, липидемические и гемодинамические показатели, ассоциированные с риском смерти от сердечно- сосудистых заболеваний у пациентов из групп высокого и очень высокого риска по шкале SCORE / М. А. Качковский, В.В Симерзин, О.А. Рубаненко, Н.А. Кириченко // Терапевтический архив. – 2014. – № 3. – С. 59-64.

Каширина, Е. И. Иммуногенность белков, капсулированных в полимерные наночастицы на основе хитозана-альгината [Текст] / Е. И. Каширина, П. Д. Решетов, Л. Г. Алексеева, В. П. Зубов, Е. В. Свирщевская // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8. - №3. – С. 901-904.

Каширина, Е. И. Разработка системы гипоаллергенной упаковки белков в полимерный матрикс [Текст] : специальность 03.01.06 : автореф. дисс… канд. хим. наук / Каширина Елена Игоревна ; ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – Москва, 2018. – 148 с.

Клишевич, М. С. Характеристика развития холестаза у мышей при введении тритона WR 1339 и АНИТ / М. С. Клишевич, М. С. Черканова, И. А. Гончарова и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – Т. 130. – № 2. – С. 39-45.

Ковалева, М. А. Генетически модифицированные линии лабораторных животных, используемые в качестве модели метаболического синдрома и сахарного диабета / М. А. Ковалева, М. Н. Макарова, В. Г. Макаров // Лабораторные животные для научных исследований. – 2018. – Vol. 1. DOI: 10.29296/2618723X-2018-01-03

Королёва, О. В. Перспективы использования гидролизатов сывороточных белков в технологии кисломолочных продуктов [Текст] / О. В. Королёва, Е. Ю. Агаркова, С. Г. Ботина и др. // Молочная промышленностью – 2013. – № 7. – С. 66-68.

Короленко, Т. А. Изменение фракционного состава липопротеинов сыворотки крови мышей и крыс при липемии, вызванной тритоном WR 1339 [Текст] / Т. А. Короленко, Ф. В. Тузиков, Е. Д. Васильева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149. – № 5. – С. 499-502

Косицын, Н. С. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга [Текст] / Н. С. Косицын, А. Н. Макаренко, Н. В. Пасикова и др. // Журнал высшей нервной деятельности – 2002. – № 6. – С. 765-768.

Котенкова, Е. А. Применение биотехнологических и протеомных методов при разработке продуктов питания гиполипидемического и вазопротекторного действия [Текст] : специальность 05.18.04 : дисс… канд. технич. наук / Котенкова Елена

Александровна ; ФНЦ «пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН. – Москва, 2015. – 161 с.

Кочеткова, А. А. Теоретические и практические аспекты разработки специализированных пищевых продуктов для диетотерапии при сердечно-сосудистых заболеваниях / А. А. Кочеткова, В. М. Воробьева, И. С. Воробьева // Пищевая промышленность. – 2016. – № 8. – С. 8-12.

Купаева, Н. В.Анализ антиоксидантного потенциала сырья животного происхождения / Н. В. Купаева, Е. А. Котенкова // Все о мясе. – 2019. – № 5. – С. 34-37. DOI: 10.21323/2071-2499-2019-5-34-37.

Ладодо, К. С. Формирование правильного пищевого поведения / К. С. Ладодо, Т. Э. Боровик, Н. Н. Семенова, А. В. Суржик // Лечащий Врач. – 2009. – № 1. – С. 54-57.

Лилли, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия [Текст] : монография / Р. Лилли ; ред. В. В. Португалов ; пер. В. В. Португалов. - Москва: Мир, 1969. - 645 с.

Лисицкая, К. В. Анализ функциональных свойств биологически активных веществ на моделях эукариотических клеток (обзор) / К. В. Лисицкая, И. В. Николаев, А. А. Торкова и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – № 6. – С. 1-18.

Лисицкая, К. В. Цитопротективный и антиоксидантный эффект препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» на культивируемых клетках человека и собаки (доклинические исследования) / К. В. Лисицкая // Российский ветеринарный журнал. – 2017. –№ 3. – С. 35-38.

Лисицын, А. Б. Оценка качества белка с использованием компьютерных технологий / А. Б. Лисицын, М. А. Никитина, Е. Б. Сусь // Пищевая промышленность. – 2016. – №. 1. – С. 26-29.

Лифляндский, В. Г. Доказательная медицина в нутрициологии, часть 1: нутриенты и продукты питания в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний // Новые медицинские технологии – 2011. – № 10. – С.13-23.

Лукоянова, О. Л. Нутритивная эпигенетика и эпигенетические эффекты грудного молока / О. Л. Лукоянова, Т. Э. Боровик //Вопросы питания. – 2015. – Т. 84. – №. 5. – С. 4-15. DOI: 10.24411/0042-8833-2015-00043

Макаренко, А.Н. Изучение нейронов и глиоглиальных преобразований в клеточных системах головного мозга в норме и при моделировании цереброваскулярной патологии / А.Н. Макаренко, В.Н. Бибикова, Н.Н. Терещенко, С.И. Савосько // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. – 2014. – Т. 14. – № 1 (45). – С. 102-107.

Мальцев, Д. И. Тканеспецифичные мембранотропные биорегуляторы, выделенные из печени и легкого млекопитающих Текст] : специальность 03.01.02: дисс… канд. биол. наук / Мальцев Дмитрий Игоревич ; ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова – Москва, 2013. – 158 с.

Манаенков, О. В. Влияние физико-химической модификации на массоперенос в альгинатных гидрогелях [Текст]: дис… канд. хим. наук: 02.00.04 / О. В. Манаенков. – Тверь, 2005. – 126 с.

Манаенков, О. В. Получение полислойных капсул на основе хитозана и солей альгиновой кислоты для инкапсулирования фосфолипидных мицелл / О. В. Манаенков,

А. И. Сидоров, В. П. Молчанов // Тонкие химические технологии. – 2010. – Т. 5. – №. 2. – С. 76-81.

Махинько, В. Н. DIAAS – усовершенствованная методика расчета биологической ценности пищевых продуктов и рационов / В. Н. Махинько, И. А. Соколовская, А. В. Шаран // Вестник Алматинского технологического университета. – 2017. – № 2 (115). – С. 48-53.

Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А. Н. Миронов, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильев и др. Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, – 2013. – С. 944.

Митрошина, Е. В. Адаптационная роль глиального нейротрофического фактора при ишемии головного мозга [Текст] / Е. В. Митрошина, Б. Ж. Абогессименгане, М. Д. Уразов // Современные технологии в медицине. – 2017 – Т. 9. – № 1. – С. 68-77.

Мищенко, В. П. Перекисное окисление липидов, антиоксиданты и гемостаз / В. П. Мищенко, И. В. Мищенко, О. И. Цебржинский // Полтава: АСМИ (Украина). – 2005. – С. 159.

Мороз, О. В. Исследование процесса гранулирования с целью создания полуфабриката для сладких блюд [Текст] / О. В. Мороз, Е. П. Пивоваров, О. П. Неклеса // Региональные геосистемы. – 2013. – Т. 25. – №24 (167). – С. 125-130.

Морозова, Н. С. Определение неэтерифицированных жирных кислот в биологических образцах: различные способы пробоподготовки / Н. С. Морозова, В. А. Акмурзина, А. В. Матвеев и др. // Тонкие химические технологии. – 2012. – Т. 7. – №. 4. – С. 63-71.

МР 2.3.1.2432-08 Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. Методические рекомендации:—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – С. 36.

МУК 4.1.1472-2003. Атомно-абсорбционное определение массовой концентрации ртути в биоматериалах животного и растительного происхождения (пищевых продуктах, кормах и др.) : утвержден и введен в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации - Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г.Г.Онищенко 29 июня 2003 г. : введен взамен МУК 4.1.005-4.1.008-94 : дата введения 2003-06-30 / разработан Федеральным научным центром гигиены им. Ф.Ф.Эрисмана Минздрава России (Т.В.Юдина, Н.Е.Федорова, М.В.Егорова, В.Н.Волкова); Научно-производственной экологической фирмой "ЭкОН" (С.Ю.Гладков, Е.А.Гладкова, И.В.Шебелова). – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – Текст : непосредственный.

МУК 4.1.986-00. Методика выполнения измерений массовой доли свинца и кадмия в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии : утвержден и введен в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем министра здравоохранения Российской Федерации Г.Г.Онищенко 13 октября 2000 г. : введен впервые : дата введения 2001-01-01 / разработан Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Брагина И.В., Ермаченко Л.А., Ерохина С.И.) и

ООО "КОРТЭК" (Садагов Ю.М., Егорова И.А.). . – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000. – Текст : непосредственный.

Наполов, Ю. К. Иммунодепрессанты, применяемые при патологии иммунной системы: I. Циклоспорин, циклофосфан, азатиопин, меркаптопурин [Текст] / Ю. К. Наполов, К. Б. Борисов // Фармакология и токсикология. – 1991. – Т. 54. – № 4. – С. 80-87.

Неклюдов, А. Д. Биологически активные соединения из природных объектов. Свойства и структурно-функциональные взаимосвязи / А. Д. Неклюдов, И. А. Иванкин; Министерство образования Российской Федерации, Московский государственный университет леса. – Москва : МГУЛ, 2003 – 480 с. ISBN: 5-8135-0162-2

Немсцверидзе, Э. Я. Инвалидность среди трудоспособного населения как медико-демографическая проблема // Социальные аспекты здоровья населения. – 2012. – Т. 1 – № 23.

Никитина, М. А. Информационная система проектирования пищевых продуктов / М. А. Никитина, Е. Б. Сусь // Все о мясе. – 2015. – № 1. – С. 36-39.

Никитина, М. А. Программная поддержка гостовских рецептур мясных и мясосодержащих продуктов / М. А. Никитина, Е. Б. Сусь // Мясная индустрия. – 2015. – № 1. – С. 30-32.

Павлюк, Н. Б. Особенности диетотерапии больных с ишемической болезнью сердца / Н. Б. Павлюк, Х. Х. Шарафетдинов // Вопросы питания. – 2015. – Т. 84. – №. 4. – С. 25-36. DOI: 10.24411/0042-8833-2015-00031

Патент № RU 2521404 C1 Российская Федерация, МПК A61K 31/195 (2006.01), B82B 3/00 (2006.01), B82Y 5/00 (2011.01) Средство, обладающее противоинсулитным действием, и способ его получения : № 2013103413/15 : заявл. 25.01.2013 : опубл. 27.06.2014 / Леонидов Н.Б., Яковлев Р.Ю., Ракита Д.Р., Лисичкин Г.В. – 25 с. : ил. – Текст : непосредственный.

Патент № RU 2107330 C1 Российская Федерация, МПК G09B23/28 (2006.01) Способ моделирования иммунодефицита по системе нейтрофильных гранулоцитов : № 93010299/14 : заявл. 26.02.1993 : опубл. 20.03.1998 / Колесникова Н.В., Нестерова И.В. ; заявитель Кубанский медицинский институт им. Красной Армии. – 5 с. : ил. – Текст : непосредственный.

Патент № RU 2327227 C2 Российская Федерация, МПК G09B 23/28 (2006.01) Способ определения неврологического дефицита у мелких лабораторных животных при поражении головного мозга : № 2005133748/14 : заявл. 01.11.2005 : опубл. 20.06.2008 . Кульчиков А.Е., Макаренко А.Н., Новикова Ю.Л., Добычина Е.Е. ; заявитель ГОУ ВПО Орловский государственный институт экономики и торговли. – 4 с. – Текст : непосредственный.

Патент № RUS 2524127 14.05.2013 Российская Федерация, МПК G09B 23/28 (2006.01). Способ моделирования атеросклероза : № 2013121753/14 : заявл. 14.05.2013 : опубл. 27.07.2014 / Лисицын А. Б., Чернуха И. М., Федулова Л. В., Котенкова Е. А. ; заявитель ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова РАН. – 9 с. – Текст : непосредственный.

Плотникова, Е. Ю. Роль омега-3 ненасыщенных кислот в профилактике и лечении различных заболеваний (часть 1) / Е. Ю. Плотникова, М. Н. Синькова, Л. К. Исаков // Лечащий врач. – 2018. – № 7. – С. 63-67

Погожева, А. В. Диетотерапия сердечно-сосудистых заболеваний / А. В. Погожева, С. А. Дербенева // Российский мед. журн. – 2009. – № 5. – С. 5153.

Покровский, А. А. О биологической и пищевой ценности продуктов питания // Вопросы питания. – 1975. – Т. 8. – №. 3. – С. 25-40.

Празднова, Е. В. Антимутагенное действие пробиотиков как основа их биологического эффекта [Текст] : специальность 03.01.03 : дисс… докт. биол. наук / Празднова Евгения Валерьевна ; ФГАОУ ВО «МФТИ (национальный исследовательский университет)». – Москва, 2020. – 266 с.

Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище : Р 4.1.1672-03 : разработан ГУ НИИ питания РАМН (В. А. Тутельян, К. И. Эллер, Ю. П. Алешко-Ожевский) : принят и одобрен Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 30 июня 2003 года

Селезнева, А. И. Комплексный подход к изучению фармакологических веществ in vitro, ex vivo, in vivo / А. И. Селезнева, А. В. Калатанова, О. В. Афонькина // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. – Т. 37. – №6. – С. 125-127.

Соколов, А. Ю. Новые способы переработки коллагенсодержащего сырья мясной промышленности [Текст] / А. Ю. Соколов, Л. Ф. Митасева, С. К. Апраксина // Все о мясе. – 2008 - № 6.-С. 38-41.

Топчян, А. В. Локальная ишемия мозга крыс, вызванная перевязкой средней мозговой артерии / А. В. Топчян, Р. С. Мирзоян, М. Г. Баласанян // Эксперим. и клин. фармакол. – 1996. – Т.59. – № 5. – С.62-64.

Торкова, А. А. Продукты быстрого приготовления на основе белковых гидролизатов животного происхождения / А. А. Торкова, И. В. Николаев, В. О. Попов, О. В. Королева // Пищевая промышленность. – 2012. – № 7. – С. 22–25.

Трахтенберг, И. М. Альтернативные методы и тест-системы. Лекарственная токсикология / И. М. Трахтенберг, В. М. Коваленко, Н. В. Кокшарёва и др.; Под ред. академика АМНУ ИМ Трахтенберга: М. Авиценна, 2008. – С. 272.

Тутельян, В. А. Применение растительного белка в диетотерапии сердечно-сосудистых заболеваний / В. А. Тутельян, А. В. Погожева, А. В. Васильев и др. // Метод, письмо. М., 2003. 28 с.

Тутельян, В. В. Принципы алиментарной профилактики инсульта / В. В. Тутельян, А. К. Батурин, А. В. Погожева // Неврология. Приложение к журналу Consilium Medicum. – 2011. – № 1. – С. 72-75.

Уразаева, С. И. Исследование биологических эффектов и механизмов действия глюконатов 3d-металлов при индуцированном иммунодефиците в эксперименте [Текст]: дис... канд. мед. наук:03.01.04 / С. И. Уразаева. – Уфа, 2018. – 167 с.

Федулова, Л. В. «Мясные» стереотипы // Все о мясе. – 2018. – № 3. – С. 4–7.

Федулова, Л. В. Разработка на принципах прижизненной модификации животных технологии мясных продуктов, обладающих нейрореабилитационным действием [Текст] : специальность 05.18.04 : дисс… канд. технич. наук / Федулова Лилия Вячеславовна ; ВНИИМП. – Москва, 2011. – 160 с.

Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев, О. Л. Верстакова, Е. В. Арзамасцев и др. Под общей редакцией Хабриева Р. У. – М. – 2005. – С. 832.

Ханды, М. Т. Образование изомеров протодиосцина и дельтозида в суспензионных культурах клеток диоскореи дельтовидной Dioscorea deltoidea Wall / М. Т. Ханды, М. В. Титова, С. В. Константинова, Д. В. Кочкин, И. М. Иванов, А. М. Носов // Прикладная биохимия и микробиология. - 2016. - Т. 52. – № 6. - С. 614-620. DOI: 10.7868/S0555109916060076

Ходько, С. В. Эффективность и механизмы действия пептида Lys-Glu-Trp на модели гиперлипидемии, вызванной введениемтвин-80 [Текст] / С. В. Ходько, М. Н. Макарова, А. И. Селезнева и др. // Атеросклероз и дислипидемии. – 2016. – Т. 22. – №. 1. – С. 40-47.

Хорошилов, И.Е. Клиническая нутрициология/ И.Е. Хорошилов, П.Б. Панов, А.В. Шабров. - Санкт-Петербург : ЭЛБИ-СПб, 2009. - 279 с.

Хучиева, М.А. Растительные стерины и станолы как пищевые факторы, снижающие гиперхолестеринемию путем ингибирования всасывания холестерина в кишечнике/ М.А. Хучиева, Н.В. Перова, Н.М. Ахмеджанов // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2011. – Т. 10. –№ 6. – С. 124-132.

Цымбалюк, В. И. Спинной мозг. Элегия надежды : [Текст] монография/ В. И. Цымбалюк, В. В. Медведев. – Винница; Киев : Нова книга, 2010 . – 940 с. ISBN 978-966-382-199-3

Цюпко, Т. Г. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP / Т. Г. Цюпко, И. С. Петракова, Н. С. Бриленок и др. // Аналитика и контроль. – 2011. – Т. 3. – № 15. – С. 287-298.

Черникевич, И. П. Иммобилизация тиаминкиназы из пивных дрожжей / И. П. Черникевич [Текст] // Журнал ГрГМУ. – 2010. – № 2 (30). - С. 31-34.

Чернуха И. М. Протеомика как инструмент для изучения качества мяса / И. М. Чернуха, Н. Л. Вострикова, Я. С. Манюхин // Все о мясе. – 2016. – № 2. – С. 3-8.

Чернуха, И. М. Влияние автолиза на протеомно-пептидный профиль сердечной мышцы и аорты Bos taurus и Sus scrofa / И. М. Чернуха, Л. В. Федулова, Е. А. Котенкова и др. // Теория и практика переработки мяса. – 2016. – Т. 1. – № 2. – С. 4-9.

Чернуха, И. М. Оптимизация электрофоретических исследований в полиакриламидном геле для мясных компонентов на примере bos grunniens / И. М. Чернуха, Л.В. Федулова, А.Г. Ахремко // Актуальная биотехнология. – 2016. – №. 3. – С. 134-137.

Чернуха, И. М. Применение инструментов протеомики на примере изучения автолитических изменений мышечной ткани свинины / И. М. Чернуха, А. Г. Ахремко // Теория и практика переработки мяса. – 2018. – Т. 3. – № 4. – С. 32-37.

Чернуха, И. М. Современные научные направления разработки специализированной пищевой продукции // Мясная индустрия. – 2019. – №. 2. – С. 31-34.

Чернуха, И.М. Изучение биологических эффектов ягод годжи различного географического происхождения на крысах с моделью алиментарной гиперлипидемии / И. М. Чернуха, Е. А. Котенкова, Е. Р. Василевская, А. Н. Иванкин, А. Б. Лисицын, Л. В.

Федулова // Вопросы питания. - 2020. - Т. 89. – № 1. – С. 37-45. DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10004

Чернуха, И.М. Сравнительная оценка основных диет мира/ И.М. Чернуха, А.И. Фокина // Мясная индустрия. – 2019. – № 10. – С. 18-24.

Шишкин, С. С. Протеомные базы данных в России. биотехнологические аспекты / С. С. Шишкин, Л. И. Ковалев, Н. В. Пашинцева и др. // Актуальная биотехнология. – 2016. – № 3(18). – С. 40-44.

Щеникова, Н. В. Питание россиян как фактор жизнеспособности нации / Н. В. Щеникова, Е. В. Шеметова // СоцИс : Социол. исслед. – 2007. – № 5. – С. 88-94.

Щепетева, О. К. Эффекты отсутствия и избытка витаминов А и Е на гемостаз порознь и в сочетании при воздействиях, вызывающих гиперкоагуляцию (экспериментальное исследование) [Текст] : специальность: 03.01.04 : автореф. дисс… канд. мед. наук / Ольга Константиновна Щепетева ; ГОУВПО "Тюменская государственная медицинская академия". – Тюмень, 2011. – С. 120.

Щипунов, Ю.А. Гомогенные альгинатные гели: фазовое поведение и реологические свойства / Ю. А. Щипунов, Е. Л. Конева, И. В. Постнова // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2002. – Т. 44. – № 7. – С. 1201-1211.

Эшгиниа, А. Изучение влияния фосфолипидов пищи в комплексной диетотерапии у больных с гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца [Текст] : специальность: 14.00.05 : автореф. дисс… канд. мед. Наук / Эшгиниа Самира ; Российская медицинская академия последипломного образования Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Москва, 2007. – С. 119.

Эшгиниа, С. Влияние фосфолипидов и аитиоксидантов на обмен липидов у больных гипертонической болезнью / С. Эшгиниа, М. М. Гаппаров // Вопросы питания. – 2006. – № 2. – С. 37-39.

Яковлев Р.Ю. Детонационный наноалмаз как перспективный носитель биологически активных веществ [Текст]: дис... канд. хим. наук: 14.00.13 / Руслан Юрьевич Яковлев. – Рязань, 2016. – 259 с.

Яковлева, А. Н. Обоснование раннего назначения энтерального питания у больных с ишемическим инсультом [Текст]: автореферат дис... канд. вет. наук: 14.00.13 / А. Н. Яковлева. – Иваново, 2007. – 25 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение А

СИСТЕМА СЕРТИФИКАЦИИ ГОСТ Р

СИСТЕМА АККРЕДИТАЦИИ ЛАБОРАТОРИЙ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР "ВНИИМП им. В.М. Горбатова"
Аттестат аккредитации № РОСС RU .0001.21 ПП69 (действителен до 12.10.2016)
Аттестат аккредитации № ГСЭН.RU.ЦОА.551 (действителен до 20.10.2015)
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 т. 676-91-26; e-mail: ispcentr@mail.ru;6769126@mail.ru

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 1847/10
номер заявки 1439А

Выполнение испытаний в рамках ГК 14.512.11.0038 от 20.03.2013

НАИМЕНОВАНИЕ ОБРАЗЦА ПРОДУКЦИИ	МЯСНОЙ ПРОДУКТ КМП	
НД (ТД) НА ПРОДУКЦИЮ	-	
ПРЕДЪЯВИТЕЛЬ/ЗАКАЗЧИК	ВНИИМП, Экспериментальная клиника-лаборатория	
ИЗГОТОВИТЕЛЬ	ВНИИМП, Стенд	
ЦЕЛЬ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ ТРЕБОВАНИЯМ СанПиН 2.3.2.1078-01 ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ БЕЗОПАСНОСТИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ «ЕДИНЫМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИМ И ГИГИЕНИЧЕСКИМ ТРЕБОВАНИЯМ К ТОВАРАМ, ПОДЛЕЖАЩИМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ НАДЗОРУ (КОНТРОЛЮ)» ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ ПРОГРАММЕ И МЕТОДИКАМ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИСПЫТАНИЙ БИОБЕЗОПАСНОСТИ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ, АМИНОКИСЛОТНОГО И БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОГО СОСТАВОВ ПО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ И ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ, ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА	
МЕСТО ОТБОРА ОБРАЗЦА	ВНИИМП, Стенд	
ДАТА ОТБОРА ОБРАЗЦА	22 апреля 2013 г.	
ОТБОР ПРОИЗВЕДЕН	Федуловой Л.В.	
ВЕТЕРИНАРНЫЙ СЕРТИФИКАТ/СВИДЕТЕЛЬСТВО	-	
НОМЕР ПАРТИИ ОБРАЗЦА	1	
МАССА ПАРТИИ/ РАЗМЕР ПАРТИИ/НОМЕР ПАРТИИ	5,1 кг.	
КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦА	1,0 кг	
НОМЕР (КОД) ОБРАЗЦА	КМП	
УПАКОВКА	13 г.	
ДАТА ИЗГОТОВЛЕНИЯ	22 апреля 20	
СРОК ГОДНОСТИ	-	
УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ	Хранить при температуре от 0 до +4˚С	
ШТРИХОВОЙ КОД	-	
ОПИСАНИЕ ЭТИКЕТКИ	Состав: свинина, крахмал, соль	
СПОСОБ ДОСТАВКИ ОБРАЗЦА	-	
ДАТА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ДАТА НАЧАЛА: 22.04.2013 г.	ДАТА ОКОНЧАНИЯ: 30.05.2013 г.
РАЗДЕЛ СанПиН 2.3.2.1078-01	п. 1.1.6	
РАЗДЕЛ ЕТ	п.1.6	

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

НАИМЕНОВАНИЕ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ	ЕДИНИЦА ИЗМЕРЕНИЯ	НД НА МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ	ГИГИЕНИЧЕСКИЙ НОРМАТИВ/ДОПУСТИМЫЙ УРОВЕНЬ
МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ:				
СВИНЕЦ	мг/кг	МУК 4.1.986-00	0.112 ± 0,009	НЕ БОЛЕЕ 0.5
КАДМИЙ	мг/кг	МУК 4.1.986-00	МЕНЕЕ 0.01	НЕ БОЛЕЕ 0.05
МЫШЬЯК	мг/кг	ГОСТ 26930-86	МЕНЕЕ 0.1	НЕ БОЛЕЕ 0.1
РТУТЬ	мг/кг	ГОСТ Р 53183-08	0.002± 0.001	НЕ БОЛЕЕ 0.03
АНТИБИОТИКИ:				
ГРУППА ТЕТРАЦИКЛИНА	мг/кг	МУ № 3049-84	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.01
ЛЕВОМИЦЕТИН	мг/кг	МУК 4.1.1912-04	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.0003
БАЦИТРАЦИН	мг/кг	МУ № 3049-84	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.02
ПЕСТИЦИДЫ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИЕ:		Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник, т. 1 / Сост. Клисенко М.А.		
ГХЦГ	мг/кг		МЕНЕЕ 0.01	НЕ БОЛЕЕ 0.1
ДДТ И ЕГО МЕТАБОЛИТЫ	мг/кг		МЕНЕЕ 0.01	НЕ БОЛЕЕ 0.1
РАДИОНУКЛИДЫ:				

Продолжение Приложения А

CS-137 Значение показателя соответствия В и его погрешности определения ΔВ: В ± ΔВ	Бк/кг	ГОСТ Р 54016-2010	4,5 ± 4 0.03 ± 0.09	НЕ БОЛЕЕ 200 < 1
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ: КМАФАнМ БГКП (колиформы) ПАТОГЕННЫЕ, В Т.Ч. САЛЬМОНЕЛЛЫ L.MONOCYTOGENES	 КОЕ/г В 0.0001 г В 25 г В 25 г	 ГОСТ 10444.15-94 ГОСТ Р 52816-07 ГОСТ Р 52814-07 (ИСО 6579-02) ГОСТ Р 51921-2002	 $1,3 \times 10^3$ НЕ ОБНАРУЖЕНО НЕ ОБНАРУЖЕНО НЕ ОБНАРУЖЕНО	 НЕ БОЛЕЕ 5.0×10^5 НЕ ДОПУСКАЕТСЯ НЕ ДОПУСКАЕТСЯ НЕ ДОПУСКАЕТСЯ
МАССОВАЯ ДОЛЯ СОЛИ	%	ГОСТ 9957-73	0.17 ± 0.0	НЕ БОЛЕЕ 1.8
МАССОВАЯ ДОЛЯ ЖИРА	%	ГОСТ 23042-86	9.6 ± 0.1	НЕ БОЛЕЕ 27.0
МАССОВАЯ ДОЛЯ БЕЛКА	%	ГОСТ 25011-81	11.4 ± 0.1	НЕ МЕНЕЕ 13.0
МАССОВАЯ ДОЛЯ ОБЩЕГО ФОСФОРА (P_2O_5)	%	ГОСТ Р 51482-99	0.161 ± 0.002	НЕ БОЛЕЕ 0.4
pH		ГОСТ Р 51478-99	5.34±0.06	

ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ (ГОСТ 9959-91):
ВНЕШНИЙ ВИД – ХОРОШО ПЕРЕМЕШАННАЯ МЯСНАЯ МАССА
ВИД НА РАЗРЕЗЕ, ЦВЕТ – ОДНОРОДНАЯ, РАВНОМЕРНО ПЕРЕМЕШАННАЯ МАССА БЕЗ КРУПНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ ЖИРОВОЙ И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ
ЗАПАХ И ВКУС — СВОЙСТВЕННЫЕ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОМУ ПРОДУКТУ, БЕЗ ПОСТОРОННЕГО ПРИВКУСА И ЗАПАХА
КОНСИСТЕНЦИЯ –ПЛОТНАЯ

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА

НАИМЕНОВАНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО ПАРАМЕТРА	МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ
ДНК КРС	ГОСТ Р 52723-2007 "ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА (МОЛЕКУЛЯРНЫЙ)" МР 4.2.0019-11 «ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ»	НЕ ОБНАРУЖЕНО
ДНК СВИНЬИ		**ОБНАРУЖЕНО**
ДНК ПТИЦЫ		НЕ ОБНАРУЖЕНО

*-предел обнаружения 0.01%

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ ОБРАЗЕЦ СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ СанПиН 2.3.2.1078-01 И ЕТ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ БЕЗОПАСНОСТИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ И СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ ПМ ПО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ. СООТВЕТСТВУЕТ РЕЦЕПТУРЕ ПО ВИДОВОМУ СОСТАВУ, СООТВЕТСТВУЕТ ПАШТЕТАМ ПО ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

ИСПОЛНИТЕЛИ: Краснова М.А.
Станкевич И.А.
Добрынина Д.В.
Вострикова Н.Л.
Иванкин А.Н.
Хвалл С.И.
Бушнева М.Ю.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ РУКОВОДИТЕЛЯ ИЦ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" Котенкова Т.А.

«30» МАЯ 2013 г.

ПЕРЕПЕЧАТКА И РАЗМНОЖЕНИЕ ПРОТОКОЛА ИСПЫТАНИЙ БЕЗ РАЗРЕШЕНИЯ ИЦ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" ЗАПРЕЩЕНЫ
РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ДЕЙСТВИТЕЛЬНЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ОБРАЗЦОВ ПРОВЕДЕННЫХ ИСПЫТАНИЙ

Продолжение Приложения А

СИСТЕМА СЕРТИФИКАЦИИ ГОСТ Р

СИСТЕМА АККРЕДИТАЦИИ ЛАБОРАТОРИЙ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР "ВНИИМП им. В.М. Горбатова"
Аттестат аккредитации № РОСС RU .0001.21 ПП69 (действителен до 12.10.2016)
Аттестат аккредитации № ГСЭН.RU.ЦОА.551 (действителен до 20.10.2015)
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 т. 676-91-26; e-mail: ispcentr@mail.ru;6769126@mail.ru

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 1847/12
номер заявки 1439А

Выполнение испытаний в рамках ГК 14.512.11.0038 от 20.03.2013

НАИМЕНОВАНИЕ ОБРАЗЦА ПРОДУКЦИИ	МЯСНОЙ ПРОДУКТ КМПФ	
НД (ТД) НА ПРОДУКЦИЮ	-	
ПРЕДЪЯВИТЕЛЬ/ЗАКАЗЧИК	ВНИИМП, Экспериментальная клиника-лаборатория	
ИЗГОТОВИТЕЛЬ		
ЦЕЛЬ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ ТРЕБОВАНИЯМ СанПиН 2.3.2.1078-01 ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ БЕЗОПАСНОСТИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ «ЕДИНЫМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИМ И ГИГИЕНИЧЕСКИМ ТРЕБОВАНИЯМ К ТОВАРАМ, ПОДЛЕЖАЩИМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ НАДЗОРУ (КОНТРОЛЮ)» ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ ПРОГРАММЕ И МЕТОДИКАМ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИСПЫТАНИЙ БИОБЕЗОПАСНОСТИ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ, АМИНОКИСЛОТНОГО И БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОГО СОСТАВОВ ПО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ И ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ, ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА	
МЕСТО ОТБОРА ОБРАЗЦА	ВНИИМП, Стенд	
ДАТА ОТБОРА ОБРАЗЦА	22 апреля 2013 г.	
ОТБОР ПРОИЗВЕДЕН	Федуловой Л.В.	
ВЕТЕРИНАРНЫЙ СЕРТИФИКАТ/СВИДЕТЕЛЬСТВО	-	
МАССА ПАРТИИ/ РАЗМЕР ПАРТИИ/НОМЕР ПАРТИИ	5,6 кг.	
КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦА	1,0 кг	
НОМЕР ПАРТИИ ОБРАЗЦА	**1**	
НОМЕР (КОД) ОБРАЗЦА	**КМП ф**	
УПАКОВКА		
ДАТА ИЗГОТОВЛЕНИЯ	22 апреля 2013 г.	
СРОК ГОДНОСТИ	-	
УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ	Хранить при температуре от 0 до +4°С	
ШТРИХОВОЙ КОД	-	
ОПИСАНИЕ ЭТИКЕТКИ	Состав: свинина, крахмал, гидролизат куриного белка, соль	
СПОСОБ ДОСТАВКИ ОБРАЗЦА	-	
ДАТА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ДАТА НАЧАЛА: 22.04.2013 г.	ДАТА ОКОНЧАНИЯ: 30.05.2013 г.
РАЗДЕЛ СанПиН 2.3.2.1078-01	п. 1.1.6	
РАЗДЕЛ ЕТ	п.1.6	

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

НАИМЕНОВАНИЕ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ	ЕДИНИЦА ИЗМЕРЕНИЯ	НД НА МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ	ГИГИЕНИЧЕСКИЙ НОРМАТИВ/ДОПУСТИМЫЙ УРОВЕНЬ
МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ:				
СВИНЕЦ	мг/кг	МУК 4.1.986-00	0,165±0,086	НЕ БОЛЕЕ 0.5
КАДМИЙ	мг/кг	МУК 4.1.986-00	МЕНЕЕ 0.01	НЕ БОЛЕЕ 0.05
МЫШЬЯК	мг/кг	ГОСТ 26930-86	МЕНЕЕ 0.1	НЕ БОЛЕЕ 0.1
РТУТЬ	мг/кг	ГОСТ Р 53183-08	МЕНЕЕ 0.1	НЕ БОЛЕЕ 0.03
АНТИБИОТИКИ:				
ГРУППА ТЕТРАЦИКЛИНА	мг/кг	МУ № 3049-84	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.01
ЛЕВОМИЦЕТИН	мг/кг	МУК 4.1.1912-04	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.0003
БАЦИТРАЦИН	мг/кг	МУ № 3049-84	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.02
ПЕСТИЦИДЫ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИЕ:		Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник, т. 1 / Сост. Клисенко М.А.		
ГХЦГ	мг/кг		0.03	НЕ БОЛЕЕ 0.1
ДДТ И ЕГО МЕТАБОЛИТЫ	мг/кг		0.03	НЕ БОЛЕЕ 0.1
РАДИОНУКЛИДЫ:				

Продолжение Приложения А

CS-137 Значение показателя соответствия В и его погрешности определения ΔВ: В ± ΔВ	Бк/кг	ГОСТ Р 54016-2010	4,20 ± 4 0.01 ± 0.01	НЕ БОЛЕЕ 200 < 1
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ: КМАФАнМ БГКП (колиформы) ПАТОГЕННЫЕ, В Т.Ч. САЛЬМОНЕЛЛЫ L.MONOCYTOGENES	 КОЕ/г В 0.0001 г В 25 г В 25 г	 ГОСТ 10444.15-94 ГОСТ Р 52816-07 ГОСТ Р 52814-07 (ИСО 6579-02) ГОСТ Р 51921-2002	 $3,5 \times 10^3$ НЕ ОБНАРУЖЕНО НЕ ОБНАРУЖЕНО НЕ ОБНАРУЖЕНО	 НЕ БОЛЕЕ 5.0×10^5 НЕ ДОПУСКАЕТСЯ НЕ ДОПУСКАЕТСЯ НЕ ДОПУСКАЕТСЯ
МАССОВАЯ ДОЛЯ СОЛИ	%	ГОСТ 9957-73	0.17 ± 0.0	НЕ БОЛЕЕ 1.8
МАССОВАЯ ДОЛЯ ЖИРА	%	ГОСТ 23042-86	9.4 ± 0.1	НЕ БОЛЕЕ 27.0
МАССОВАЯ ДОЛЯ БЕЛКА	%	ГОСТ 25011-81	13.1 ± 0.1	НЕ МЕНЕЕ 13.0
МАССОВАЯ ДОЛЯ ОБЩЕГО ФОСФОРА (P_2O_5)	%	ГОСТ Р 51482-99	0.161 ± 0.002	НЕ БОЛЕЕ 0.4
pH		ГОСТ Р 51478-99	5.40±0.04	

ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ (ГОСТ 9959-91):
ВНЕШНИЙ ВИД – ХОРОШО ПЕРЕМЕШАННАЯ МЯСНАЯ МАССА
ВИД НА РАЗРЕЗЕ, ЦВЕТ – ОДНОРОДНАЯ, РАВНОМЕРНО ПЕРЕМЕШАННАЯ МАССА БЕЗ КРУПНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ ЖИРОВОЙ И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ
ЗАПАХ И ВКУС — СВОЙСТВЕННЫЕ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОМУ ПРОДУКТУ, БЕЗ ПОСТОРОННЕГО ПРИВКУСА И ЗАПАХА
КОНСИСТЕНЦИЯ —ПЛОТНАЯ

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА

НАИМЕНОВАНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО ПАРАМЕТРА	МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ
ДНК КРС	ГОСТ Р 52723-2007 "ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА (МОЛЕКУЛЯРНЫЙ)" МР 4.2.0019-11 «ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ»	НЕ ОБНАРУЖЕНО
ДНК СВИНЬИ		**ОБНАРУЖЕНО**
ДНК ПТИЦЫ		**ОБНАРУЖЕНО**

*-предел обнаружения 0.01%

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ ОБРАЗЕЦ СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ СанПиН 2.3.2.1078-01 И ЕТ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ БЕЗОПАСНОСТИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ И СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ ПМ ПО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ. СООТВЕТСТВУЕТ РЕЦЕПТУРЕ ПО ВИДОВОМУ СОСТАВУ, СООТВЕТСТВУЕТ ПАШТЕТАМ ПО ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

ИСПОЛНИТЕЛИ: Красова М.А.
Станкова И.А.
Добрынина Д.В.
Воступкова Н.Л.
Иванкин А.Н.
Хыдз С.И.
Бушкова М.Ю.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ РУКОВОДИТЕЛЯ ВЦ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" Котенкова Т.А.

«30» МАЯ 2017 г.

ПЕРЕПЕЧАТКА И РАЗМНОЖЕНИЕ ПРОТОКОЛА ИСПЫТАНИЙ БЕЗ РАЗРЕШЕНИЯ ВЦ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" ЗАПРЕЩАЕТСЯ
РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ДЕЙСТВИТЕЛЬНЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ОБРАЗЦОВ ПРОВЕДЕННЫХ ИСПЫТАНИЙ

Продолжение Приложения А

СИСТЕМА СЕРТИФИКАЦИИ ГОСТ Р

СИСТЕМА АККРЕДИТАЦИИ ЛАБОРАТОРИЙ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР "ВНИИМП им. В.М. Горбатова"
Аттестат аккредитации № РОСС RU .0001.21 ПП69 (действителен до 12.10.2016)
Аттестат аккредитации № ГСЭН.RU.ЦОА.551 (действителен до 20.10.2015)
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 т. 676-91-26; e-mail: ispcentr@mail.ru;6769126@mail.ru

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 1847/1
номер заявки 1439А

Выполнение испытаний в рамках ГК 14.512.11.0038 от 20.03.2013

НАИМЕНОВАНИЕ ОБРАЗЦА ПРОДУКЦИИ	МЯСНОЙ ПРОДУКТ СПМ_2	
НД (ТД) НА ПРОДУКЦИЮ	-	
ПРЕДЪЯВИТЕЛЬ/ЗАКАЗЧИК	ВНИИМП, Экспериментальная клиника-лаборатория	
ИЗГОТОВИТЕЛЬ	ВНИИМП, Стенд	
ЦЕЛЬ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ ТРЕБОВАНИЯМ СанПиН 2.3.2.1078-01 ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ БЕЗОПАСНОСТИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ «ЕДИНЫМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИМ И ГИГИЕНИЧЕСКИМ ТРЕБОВАНИЯМ К ТОВАРАМ, ПОДЛЕЖАЩИМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ НАДЗОРУ (КОНТРОЛЮ)» ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ ПРОГРАММЕ И МЕТОДИКАМ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИСПЫТАНИЙ БИОБЕЗОПАСНОСТИ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ, АМИНОКИСЛОТНОГО И БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОГО СОСТАВОВ ПО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ И ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ, ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА	
МЕСТО ОТБОРА ОБРАЗЦА	ВНИИМП, Стенд	
ДАТА ОТБОРА ОБРАЗЦА	22 апреля 2013 г.	
ОТБОР ПРОИЗВЕДЕН	Федуловой Л.В.	
ВЕТЕРИНАРНЫЙ СЕРТИФИКАТ/СВИДЕТЕЛЬСТВО	-	
МАССА ПАРТИИ/ РАЗМЕР ПАРТИИ/НОМЕР ПАРТИИ	5,2 кг.	
КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦА	1,0 кг	
НОМЕР ПАРТИИ ОБРАЗЦА	**1**	
НОМЕР (КОД) ОБРАЗЦА	**СМП_2**	
УПАКОВКА		
ДАТА ИЗГОТОВЛЕНИЯ	22 апреля 2013 г.	
СРОК ГОДНОСТИ	-	
УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ	Хранить при температуре от 0 до +4°С	
ШТРИХОВОЙ КОД	-	
ОПИСАНИЕ ЭТИКЕТКИ	Состав: свинина, крахмал, соль	
СПОСОБ ДОСТАВКИ ОБРАЗЦА	-	
ДАТА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ДАТА НАЧАЛА: 22.04.2013 г.	ДАТА ОКОНЧАНИЯ: 30.05.2013 г.
РАЗДЕЛ СанПиН 2.3.2.1078-01	п. 1.1.6	
РАЗДЕЛ ЕТ	п.1.6	

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

НАИМЕНОВАНИЕ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ	ЕДИНИЦА ИЗМЕРЕНИЯ	НД НА МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ	ГИГИЕНИЧЕСКИЙ НОРМАТИВ/ДОПУСТИМЫЙ УРОВЕНЬ
МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ:				
СВИНЕЦ	мг/кг	МУК 4.1.986-00	0.086 ± 0.019	НЕ БОЛЕЕ 0.5
КАДМИЙ	мг/кг	МУК 4.1.986-00	МЕНЕЕ 0.01	НЕ БОЛЕЕ 0.05
МЫШЬЯК	мг/кг	ГОСТ 26930-86	МЕНЕЕ 0.1	НЕ БОЛЕЕ 0.1
РТУТЬ	мг/кг	ГОСТ Р 53183-08	МЕНЕЕ 0.002	НЕ БОЛЕЕ 0.03
АНТИБИОТИКИ:				
ГРУППА ТЕТРАЦИКЛИНА	мг/кг	МУ № 3049-84	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.01
ЛЕВОМИЦЕТИН	мг/кг	МУК 4.1.1912-04	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.0003
БАЦИТРАЦИН	мг/кг	МУ № 3049-84	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.02
ПЕСТИЦИДЫ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИЕ:		Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник, т. 1 / Сост. Клисенко М.А.		
ГХЦГ	мг/кг		0.02	НЕ БОЛЕЕ 0.1
ДДТ И ЕГО МЕТАБОЛИТЫ	мг/кг		0.03	НЕ БОЛЕЕ 0.1
РАДИОНУКЛИДЫ:				

Продолжение Приложения А

CS-137 Значение показателя соответствия В и его погрешности определения ΔВ: В ± ΔВ	Бк/кг	ГОСТ Р 54016-2010	2.30 ± 4 0.01 ± 0.14	НЕ БОЛЕЕ 200 < 1
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ: КМАФАнМ БГКП (колиформы) ПАТОГЕННЫЕ, В Т.Ч. САЛЬМОНЕЛЛЫ L.MONOCYTOGENES	 КОЕ/г В 0.0001 г В 25 г В 25 г	 ГОСТ 10444.15-94 ГОСТ Р 52816-07 ГОСТ Р 52814-07 (ИСО 6579-02) ГОСТ Р 51921-2002	 5.0×10^3 НЕ ОБНАРУЖЕНО НЕ ОБНАРУЖЕНО НЕ ОБНАРУЖЕНО	 НЕ БОЛЕЕ 5.0×10^6 НЕ ДОПУСКАЕТСЯ НЕ ДОПУСКАЕТСЯ НЕ ДОПУСКАЕТСЯ
МАССОВАЯ ДОЛЯ СОЛИ	%	ГОСТ 9957-73	0.13 ± 0.01	НЕ БОЛЕЕ 1.8
МАССОВАЯ ДОЛЯ ЖИРА	%	ГОСТ 23042-86	7.5 ± 0.1	НЕ БОЛЕЕ 27.0
МАССОВАЯ ДОЛЯ БЕЛКА	%	ГОСТ 25011-81	12.9 ± 0.1	НЕ МЕНЕЕ 13.0
МАССОВАЯ ДОЛЯ ОБЩЕГО ФОСФОРА (P_2O_5)	%	ГОСТ Р 51482-99	0.151 ± 0.002	НЕ БОЛЕЕ 0.4
pH		ГОСТ Р 51478-99	5,4 ±0,08	

ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ (ГОСТ 9959-91):
ВНЕШНИЙ ВИД – ХОРОШО ПЕРЕМЕШАННАЯ МЯСНАЯ МАССА
ВИД НА РАЗРЕЗЕ, ЦВЕТ – ОДНОРОДНАЯ, РАВНОМЕРНО ПЕРЕМЕШАННАЯ МАССА БЕЗ КРУПНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ ЖИРОВОЙ И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ
ЗАПАХ И ВКУС — СВОЙСТВЕННЫЕ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОМУ ПРОДУКТУ, БЕЗ ПОСТОРОННЕГО ПРИВКУСА И ЗАПАХА
КОНСИСТЕНЦИЯ —ПЛОТНАЯ

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА

НАИМЕНОВАНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО ПАРАМЕТРА	МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ
ДНК КРС	ГОСТ Р 52723-2007 "ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА (МОЛЕКУЛЯРНЫЙ)" МР 4.2.0019-11 «ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ»	НЕ ОБНАРУЖЕНО
ДНК СВИНЬИ		**ОБНАРУЖЕНО**
ДНК ПТИЦЫ		НЕ ОБНАРУЖЕНО

*-предел обнаружения 0.01%

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ ОБРАЗЕЦ СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ СанПиН 2.3.2.1078-01 И ЕТ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ БЕЗОПАСНОСТИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ И СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ ПМ ПО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ. СООТВЕТСТВУЕТ РЕЦЕПТУРЕ ПО ВИДОВОМУ СОСТАВУ, СООТВЕТСТВУЕТ ПАШТЕТАМ ПО ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

ИСПОЛНИТЕЛИ: Краснова М.А.
Станкова И.А.
Добрынина Д.В.
Вострикова Н.Л.
Надеин А.Н.
Хвала С.И.
Буланова М.Ю.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ РУКОВОДИТЕЛЯ НЦ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" Котенкова Т.А.

«30» МАЯ 2013 г.

ПЕРЕПЕЧАТКА И РАЗМНОЖЕНИЕ ПРОТОКОЛА ИСПЫТАНИЙ БЕЗ РАЗРЕШЕНИЯ НЦ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" ЗАПРЕЩЕНО!
РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ДЕЙСТВИТЕЛЬНЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ОБРАЗЦОВ ПРОВЕДЕННЫХ ИСПЫТАНИЙ

Продолжение Приложения А

СИСТЕМА СЕРТИФИКАЦИИ ГОСТ Р

СИСТЕМА АККРЕДИТАЦИИ ЛАБОРАТОРИЙ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР "ВНИИМП им. В.М. Горбатова"
Аттестат аккредитации № РОСС RU .0001.21 ПП69 (действителен до 12.10.2016)
Аттестат аккредитации № ГСЭН.RU.ЦОА.551 (действителен до 20.10.2015)
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 т. 676-91-26; e-mail: ispcentr@mail.ru;6769126@mail.ru

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 1847/11
номер заявки 1439А

Выполнение испытаний в рамках ГК 14.512.11.0038 от 20.03.2013

НАИМЕНОВАНИЕ ОБРАЗЦА ПРОДУКЦИИ	МЯСНОЙ ПРОДУКТ СМП_2Ф	
НД (ТД) НА ПРОДУКЦИЮ	-	
ПРЕДЪЯВИТЕЛЬ/ЗАКАЗЧИК	ВНИИМП, Экспериментальная клиника-лаборатория	
ИЗГОТОВИТЕЛЬ	ВНИИМП, Стенд	
ЦЕЛЬ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ ТРЕБОВАНИЯМ СанПиН 2.3.2.1078-01 ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ БЕЗОПАСНОСТИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ «ЕДИНЫМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИМ И ГИГИЕНИЧЕСКИМ ТРЕБОВАНИЯМ К ТОВАРАМ, ПОДЛЕЖАЩИМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ НАДЗОРУ (КОНТРОЛЮ)» ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ПРОВЕРКА НА СООТВЕТСТВИЕ ПРОГРАММЕ И МЕТОДИКАМ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИСПЫТАНИЙ БИОБЕЗОПАСНОСТИ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ, АМИНОКИСЛОТНОГО И БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОГО СОСТАВОВ ПО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ И ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ, ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ, ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА	
МЕСТО ОТБОРА ОБРАЗЦА	ВНИИМП, Стенд	
ДАТА ОТБОРА ОБРАЗЦА	22 апреля 2013 г.	
ОТБОР ПРОИЗВЕДЕН	Федуловой Л.В.	
ВЕТЕРИНАРНЫЙ СЕРТИФИКАТ/СВИДЕТЕЛЬСТВО	-	
МАССА ПАРТИИ/ РАЗМЕР ПАРТИИ/НОМЕР ПАРТИИ	5,3 кг.	
КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦА	1,0 кг	
НОМЕР ПАРТИИ ОБРАЗЦА	1	
НОМЕР (КОД) ОБРАЗЦА	СМП_2Ф	
УПАКОВКА		
ДАТА ИЗГОТОВЛЕНИЯ	22 апреля 2013 г.	
СРОК ГОДНОСТИ	-	
УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ	Хранить при температуре от 0 до +4°С	
ШТРИХОВОЙ КОД	-	
ОПИСАНИЕ ЭТИКЕТКИ	Состав: свинина, крахмал, гидролизат куриного белка, соль	
СПОСОБ ДОСТАВКИ ОБРАЗЦА	-	
ДАТА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ	ДАТА НАЧАЛА: 22.04.2013 г.	ДАТА ОКОНЧАНИЯ: 30.05.2013 г.
РАЗДЕЛ СанПиН 2.3.2.1078-01	п. 1.1.6	
РАЗДЕЛ ЕТ	п.1,6	

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

НАИМЕНОВАНИЕ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ	ЕДИНИЦА ИЗМЕРЕНИЯ	НД НА МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ	ГИГИЕНИЧЕСКИЙ НОРМАТИВ/ДОПУСТИМЫЙ УРОВЕНЬ
МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ:				
СВИНЕЦ	мг/кг	МУК 4.1.986-00	МЕНЕЕ 0.1	НЕ БОЛЕЕ 0.5
КАДМИЙ	мг/кг	МУК 4.1.986-00	МЕНЕЕ 0.01	НЕ БОЛЕЕ 0.05
МЫШЬЯК	мг/кг	ГОСТ 26930-86	МЕНЕЕ 0.1	НЕ БОЛЕЕ 0.1
РТУТЬ	мг/кг	ГОСТ Р 53183-08	МЕНЕЕ 0.1	НЕ БОЛЕЕ 0.03
АНТИБИОТИКИ:				
ГРУППА ТЕТРАЦИКЛИНА	мг/кг	МУ № 3049-84	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.01
ЛЕВОМИЦЕТИН	мг/кг	МУК 4.1.1912-04	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.0003
БАЦИТРАЦИН	мг/кг	МУ № 3049-84	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ БОЛЕЕ 0.02
ПЕСТИЦИДЫ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИЕ:		Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник, т. 1 / Сост. Клисенко М.А.		
ГХЦГ	мг/кг		МЕНЕЕ 0.01	НЕ БОЛЕЕ 0.1
ДДТ И ЕГО МЕТАБОЛИТЫ	мг/кг		МЕНЕЕ 0.01	НЕ БОЛЕЕ 0.1
РАДИОНУКЛИДЫ:				

Продолжение Приложения А

CS-137 Значение показателя соответствия В и его погрешности определения ΔВ: В ± ΔВ	Бк/кг	ГОСТ Р 54016-2010	3.15 ± 4 0.01 ± 0.11	НЕ БОЛЕЕ 200 < 1
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ: КМАФАнМ БГКП (колиформы) ПАТОГЕННЫЕ, В Т.Ч. САЛЬМОНЕЛЛЫ L.MONOCYTOGENES	 КОЕ/г В 0.0001 г В 25 г В 25 г	 ГОСТ 10444.15-94 ГОСТ Р 52816-07 ГОСТ Р 52814-07 (ИСО 6579-02) ГОСТ Р 51921-2002	 $1{,}0 \times 10^4$ НЕ ОБНАРУЖЕНО НЕ ОБНАРУЖЕНО НЕ ОБНАРУЖЕНО	 НЕ БОЛЕЕ 5.0×10^5 НЕ ДОПУСКАЕТСЯ НЕ ДОПУСКАЕТСЯ НЕ ДОПУСКАЕТСЯ
МАССОВАЯ ДОЛЯ СОЛИ	%	ГОСТ 9957-73	0.17 ± 0.0	НЕ БОЛЕЕ 1.8
МАССОВАЯ ДОЛЯ ЖИРА	%	ГОСТ 23042-86	7.3 ± 0.1	НЕ БОЛЕЕ 27.0
МАССОВАЯ ДОЛЯ БЕЛКА	%	ГОСТ 25011-81	14.1 ± 0.1	НЕ МЕНЕЕ 13.0
МАССОВАЯ ДОЛЯ ОБЩЕГО ФОСФОРА (P_2O_5)	%	ГОСТ Р 51482-99	0.161 ± 0.002	НЕ БОЛЕЕ 0.4
pH		ГОСТ Р 51478-99	5.71±0.03	

ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ (ГОСТ 9959-91):
ВНЕШНИЙ ВИД – ХОРОШО ПЕРЕМЕШАННАЯ МЯСНАЯ МАССА
ВИД НА РАЗРЕЗЕ, ЦВЕТ – ОДНОРОДНАЯ, РАВНОМЕРНО ПЕРЕМЕШАННАЯ МАССА БЕЗ КРУПНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ ЖИРОВОЙ И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ
ЗАПАХ И ВКУС — СВОЙСТВЕННЫЕ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОМУ ПРОДУКТУ, БЕЗ ПОСТОРОННЕГО ПРИВКУСА И ЗАПАХА
КОНСИСТЕНЦИЯ —ПЛОТНАЯ

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА

НАИМЕНОВАНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО ПАРАМЕТРА	МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ
ДНК КРС	ГОСТ Р 52723-2007 "ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА (МОЛЕКУЛЯРНЫЙ)" МР 4.2.0019-11 «ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ»	НЕ ОБНАРУЖЕНО
ДНК СВИНЬИ		**ОБНАРУЖЕНО**
ДНК ПТИЦЫ		**ОБНАРУЖЕНО**

*-предел обнаружения 0.01%

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ ОБРАЗЕЦ СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ СанПиН 2.3.2.1078-01 И ЕТ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ БЕЗОПАСНОСТИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ И СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ ПМ ПО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ. СООТВЕТСТВУЕТ РЕЦЕПТУРЕ ПО ВИДОВОМУ СОСТАВУ, СООТВЕТСТВУЕТ ПАШТЕТАМ ПО ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

ИСПОЛНИТЕЛИ: Краснова М.А.
Станкова И.А.
Добрынина Д.В.
Быстрякова Н.Л.
Иванова А.Н.
Хамдя С.Н.
Бушуева М.Ю.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ РУКОВОДИТЕЛЯ ИЛЦ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" Катенкова Т.А.

«03» ИЮНЯ 2013 г.

ПЕРЕПЕЧАТКА И РАЗМНОЖЕНИЕ ПРОТОКОЛА ИСПЫТАНИЙ БЕЗ РАЗРЕШЕНИЯ ИЛЦ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова" ЗАПРЕЩЕНО.
РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ДЕЙСТВИТЕЛЬНЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ОБРАЗЦОВ, ПРОШЕДШИХ ИСПЫТАНИЯ.

Приложение Б

Идентифицированные белки, присутствующие в тканях головного мозга свиней

№	Название белка	Название гена	Мм, кДа
1	Ryanodine receptor 1 (RYR-1) (RyR1) (Skeletal muscle calcium release channel) (Skeletal muscle ryanodine receptor) (Skeletal muscle-type ryanodine receptor) (Type 1 ryanodine receptor)	RYR1 CRC	565,332
2	Tenascin (TN) (Cytotactin) (GMEM) (GP 150-225) (Glioma-associated-extracellular matrix antigen) (Hexabrachion) (JI) (Myotendinous antigen) (Neuronectin) (P230) (Tenascin-C) (TN-C)	TNC HXB	191,400
3	Unconventional myosin-VI (Unconventional myosin-6)	MYO6	144,859
4	Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein (SCAP) (SREBP cleavage-activating protein)	SCAP	140,058
5	Leptin receptor (LEP-R) (OB receptor) (OB-R) (CD antigen CD295)	LEPR OBR	132,523
6	Deleted in malignant brain tumors 1 protein (Hensin)	DMBT1	132,225
7	Protocadherin-11 X-linked (Protocadherin-11) (Protocadherin on the X chromosome) (PCDH-X)	PCDH11X PCDH11 PCDHX	123,364
8	Large proline-rich protein BAG6 (BCL2-associated athanogene 6) (HLA-B-associated transcript 3)	BAG6 BAT3	118,627
9	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1 (Delayed rectifier potassium channel 1) (DRK1) (Voltage-gated potassium channel subunit Kv2.1)	KCNB1	96,118
10	Dystroglycan (Dystrophin-associated glycoprotein 1) [Cleaved into: Alpha-dystroglycan (Alpha-DG); Beta-dystroglycan (Beta-DG)]	DAG1	95,431
11	NT-3 growth factor receptor (EC 2.7.10.1) (GP145-TrkC) (Trk-C) (Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3) (TrkC tyrosine kinase)	NTRK3 TRKC	93,130
12	Endoplasmin (94 kDa glucose-regulated protein) (GRP-94) (98 kDa protein kinase) (PPK 98) (ppk98) (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (gp96 homolog)	HSP90B1 GRP94 TRA1	92,471

Продолжение таблицы приложения Б

13	Amyloid-beta A4 protein (ABPP) (APP) (Alzheimer disease amyloid A4 protein homolog) (Amyloid precursor protein)	APP	86,961
14	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1 HSP90A HSPCA	84,775
15	Glutamate carboxypeptidase 2 (EC 3.4.17.21) (Folate hydrolase 1) (Folylpoly-gamma-glutamate carboxypeptidase) (FGCP) (Glutamate carboxypeptidase II) (GCPII) (Membrane glutamate carboxypeptidase) (mGCP) (N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase I) (NAALADase I) (Prostate-specific membrane antigen homolog) (Pteroylpoly-gamma-glutamate carboxypeptidase)	FOLH1 NAALAD1	84,524
16	Prolyl endopeptidase (PE) (EC 3.4.21.26) (Post-proline cleaving enzyme)	PREP	80,770
17	NAD(+) hydrolase SARM1 (NADase SARM1) (EC 3.2.2.6) (NADP(+) hydrolase SARM1) (EC 3.2.2.-) (Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1)	SARM1	79,792
18	POU domain, class 2, transcription factor 1 (NF-A1) (Octamer-binding protein 1) (Oct-1) (Octamer-binding transcription factor 1) (OTF-1)	POU2F1 OTF1	76,596
19	Macoilin (Macoilin-1) (Transmembrane protein 57)	MACO1 TMEM57	76,148
20	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 (Beta ig-h3) (Kerato-epithelin) (RGD-containing collagen-associated protein) (RGD-CAP)	TGFBI	74,462
21	Broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2 (EC 7.6.2.2) (ATP-binding cassette sub-family G member 2) (Brain multidrug resistance protein) (Urate exporter) (CD antigen CD338)	ABCG2 BMDP	72,392
22	Choline O-acetyltransferase (CHOACTase) (ChAT) (Choline acetylase) (EC 2.3.1.6)	CHAT	71,731
23	Glutamate decarboxylase 1 (EC 4.1.1.15) (67 kDa glutamic acid decarboxylase) (GAD-67) (Glutamate decarboxylase 67 kDa isoform)	GAD1 GAD67	66,895
24	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase (Alpha1-6FucT) (EC 2.4.1.68) (Fucosyltransferase 8) (GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha1,6-fucosyltransferase) (GDP-fucose--glycoprotein fucosyltransferase) (Glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase)	FUT8	66,229

Продолжение таблицы приложения Б

25	Glutamate decarboxylase 2 (EC 4.1.1.15) (65 kDa glutamic acid decarboxylase) (GAD-65) (Glutamate decarboxylase 65 kDa isoform)	GAD2 GAD65	65,388
26	Fatty-acid amide hydrolase 1 (EC 3.5.1.99) (Anandamide amidohydrolase 1) (Oleamide hydrolase1)	FAAH FAAH1	62,857
27	Palmdelphin	PALMD	62,308
28	SRSF protein kinase 3 (EC 2.7.11.1) (Muscle-specific serine kinase 1) (MSSK-1) (Serine/arginine-rich protein-specific kinase 3) (SR-protein-specific kinase 3) (Serine/threonine-protein kinase 23)	SRPK3 MSSK1 STK23	61,905
29	Glutathione hydrolase 1 proenzyme (EC 3.4.19.13) (Gamma-glutamyltransferase 1) (Gamma-glutamyltranspeptidase 1) (GGT 1) (EC 2.3.2.2) (Leukotriene-C4 hydrolase) (EC 3.4.19.14) (CD antigen CD224) [Cleaved into: Glutathione hydrolase 1 heavy chain; Glutathione hydrolase 1 light chain]	GGT1 GGT	61,316
30	Beta-hexosaminidase subunit beta (EC 3.2.1.52) (65 kDa epididymal boar protein) (Beta-N-acetylhexosaminidase subunit beta) (Hexosaminidase subunit B) (N-acetyl-beta-glucosaminidase subunit beta)	HEXB	61,050
31	Solute carrier family 22 member 8 (Organic anion transporter 3) (pOAT3)	SLC22A8 OAT3	59,387
32	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial (EC 2.6.1.19) ((S)-3-amino-2-methylpropionate transaminase) (EC 2.6.1.22) (GABA aminotransferase) (GABA-AT) (Gamma-amino-N-butyrate transaminase) (GABA transaminase) (GABA-T) (L-AIBAT)	ABAT GABAT	56,620
33	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta (CaM kinase II subunit delta) (CaMK-II subunit delta) (EC 2.7.11.17)	CAMK2D	56,389
34	Thyroid hormone receptor alpha (Nuclear receptor subfamily 1 group A member 1) (c-erbA-1) (c-erbA-alpha)	THRA NR1A1	56,265
35	Erythropoietin receptor (EPO-R)	EPOR	55,184
36	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 (Glucose transporter type 1, erythrocyte/brain) (GLUT-1)	SLC2A1 GLUT1	54,036
37	Kynurenine 3-monooxygenase (EC 1.14.13.9) (Fpk) (Kynurenine 3-hydroxylase)	KMO	53,998
38	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3 (Glucose transporter type 3, brain) (GLUT-3)	SLC2A3 GLUT3	53,963

Продолжение таблицы приложения Б

39	Clusterin (CP40) (Complement cytolysis inhibitor) (CLI) [Cleaved into: Clusterin beta chain; Clusterin alpha chain]	CLU	51,775
40	Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase (EC 2.4.1.143) (Beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II) (GlcNAc-T II) (GNT-II) (Mannoside acetylglucosaminyltransferase 2) (N-glycosyl-oligosaccharide-glycoprotein N-acetylglucosaminyltransferase II)	MGAT2 GNT2	51,527
41	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B beta isoform (PP2A subunit B isoform B55-beta) (PP2A subunit B isoform PR55-beta) (PP2A subunit B isoform R2-beta) (PP2A subunit B isoform beta)	PPP2R2B	51,460
42	Muscarinic acetylcholine receptor M1	CHRM1	51,419
43	Presenilin-2 (PS-2) (EC 3.4.23.-) [Cleaved into: Presenilin-2 NTF subunit; Presenilin-2 CTF subunit]	PSEN2	50,138
44	Tubulin alpha-1A chain (Alpha-tubulin 1) (Tubulin alpha-1 chain) [Cleaved into: Detyrosinated tubulin alpha-1A chain]	TUBA1A	50,068
45	E3 SUMO-protein ligase EGR2 (EC 2.3.2.-) (E3 SUMO-protein transferase ERG2) (Early growth response protein 2) (EGR-2)	EGR2	49,911
46	Tubulin beta chain (Beta-tubulin)		49,861
47	Endothelin receptor type B (ET-B) (ET-BR) (Endothelin receptor non-selective type)	EDNRB	49,595
48	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial (EC 2.3.1.61) (2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E2) (OGDC-E2) (Dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex) (E2K) (E2o) (PE2o)	DLST	48,977
49	Mothers against decapentaplegic homolog 3 (MAD homolog 3) (Mad3) (Mothers against DPP homolog 3) (SMAD family member 3) (SMAD 3) (Smad3)	SMAD3 MADH3	48,081
50	Creatine kinase U-type, mitochondrial (EC 2.7.3.2) (Acidic-type mitochondrial creatine kinase) (Mia-CK) (Ubiquitous mitochondrial creatine kinase) (U-MtCK)	CKMT1	46,950

Продолжение таблицы приложения Б

51	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha (Lissencephaly-1 protein) (LIS-1) (PAF acetylhydrolase 45 kDa subunit) (PAF-AH 45 kDa subunit) (PAF-AH alpha) (PAFAH alpha)	PAFAH1B1 LIS1 PAFAHA	46,654
52	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic (cAspAT) (EC 2.6.1.1) (EC 2.6.1.3) (Cysteine aminotransferase, cytoplasmic) (Cysteine transaminase, cytoplasmic) (cCAT) (Glutamate oxaloacetate transaminase 1) (Transaminase A)	GOT1	46,475
53	Lactadherin (MFGM) (Milk fat globule-EGF factor 8) (MFG-E8) (SED1) (Sperm surface protein SP47) (PP47)	MFGE8	45,725
54	26S proteasome regulatory subunit 8 (26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT6) (Proteasome 26S subunit ATPase 5) (Proteasome subunit p45) (Tat-binding protein homolog 10) (TBP10) (p45/SUG)	PSMC5	45,626
55	Mu-type opioid receptor (M-OR-1) (MOR-1)	OPRM1	45,099
56	Lactosylceramide 1,3-N-acetyl-beta-D-glucosaminyltransferase (EC 2.4.1.206) (Lactotriaosylceramide synthase) (Lc(3)Cer synthase) (Lc3 synthase) (UDP-GlcNAc:beta-Gal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5) (BGnT-5) (Beta-1,3-Gn-T5) (Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5) (Beta3Gn-T5)	B3GNT5	43,971
57	Tubulin--tyrosine ligase (TTL) (EC 6.3.2.25)	TTL	43,510
58	Creatine kinase M-type (EC 2.7.3.2) (Creatine kinase M chain) (Creatine phosphokinase M-type) (CPK-M) (M-CK)	CKM	43,059
59	Creatine kinase B-type (EC 2.7.3.2) (B-CK) (Creatine kinase B chain) (Creatine phosphokinase M-type) (CPK-B)	CKB	42,657
60	Paralemmin-1 (Paralemmin)	PALM	42,380
61	Glutamine synthetase (GS) (EC6.3.1.2) (Glutamate--ammonia ligase) (Palmitoyltransferase GLUL) (EC 2.3.1.225)	GLUL GLNS	42,030
62	Stimulator of interferon genes protein (poSTING) (Transmembrane protein 173)	STING1 TMEM173	41,881
63	Somatostatin receptor type 2 (SS-2-R) (SS2-R) (SS2R) (SRIF-1)	SSTR2	41,219
64	Nociceptin receptor (K3 opiate receptor) (Kappa-type 3 opioid receptor) (KOR-3) (ORGC)	OPRL1	40,610
65	C-X-C chemokine receptor type 4 (CXC-R4) (CXCR-4) (CD antigen CD184)	CXCR4	39,945

Продолжение таблицы приложения Б

66	D-amino-acid oxidase (DAAO) (DAMOX) (DAO) (EC 1.4.3.3)	DAO	39,336
67	Secretory carrier-associated membrane protein 1 (Secretory carrier membrane protein 1)	SCAMP1	37,919
68	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit (PP-1B) (EC 3.1.3.16) (EC 3.1.3.53)	PPP1CB	37,187
69	Aldo-keto reductase family 1 member A1 (EC 1.1.1.2) (EC 1.1.1.33) (EC 1.1.1.372) (EC 1.1.1.54) (Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]) (Aldehyde reductase) (Glucuronate reductase) (EC 1.1.1.19) (Glucuronolactone reductase) (EC 1.1.1.20)	AKR1A1 ALR ALR1	36,582
70	Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial (EC 6.2.1.4) (EC 6.2.1.5) (Succinyl-CoA synthetase subunit alpha) (SCS-alpha)	SUCLG1	36,117
71	Aldo-keto reductase family 1 member B1 (EC 1.1.1.300) (EC 1.1.1.372) (EC 1.1.1.54) (Aldehyde reductase) (Aldose reductase) (AR) (EC 1.1.1.21)	AKR1B1 ALR2	35,868
72	Pyridoxal kinase (EC 2.7.1.35) (Pyridoxine kinase)	PDXK PKH	35,614
73	Aspartoacylase (EC 3.5.1.15) (Aminoacylase-2) (ACY-2)	ASPA	35,605
74	Receptor of activated protein C kinase 1 (Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1) (Receptor for activated C kinase) (Receptor of activated protein kinase C 1) [Cleaved into: Receptor of activated protein C kinase 1, N-terminally processed]	RACK1 GNB2L1	35,077
75	Thyroxine 5-deiodinase (EC 1.21.99.3) (5DIII) (DIOIII) (Type 3 DI) (Type III iodothyronine deiodinase)	DIO3	34,042
76	Pituitary-specific positive transcription factor 1 (PIT-1) (Growth hormone factor 1) (GHF-1)	POU1F1 PIT-1 PIT1	33,033
77	5-hydroxytryptamine receptor 1D (5-HT-1D) (5-HT1D) (Serotonin receptor 1D) (Fragment)	HTR1D	32,669
78	Type II iodothyronine deiodinase (EC 1.21.99.4) (5DII) (DIOII) (Type 2 DI) (Type-II 5'-deiodinase)	DIO2	30,376
79	Apolipoprotein A-I (Apo-AI) (ApoA-I) (Apolipoprotein A1) [Cleaved into: Proapolipoprotein A-I (ProapoA-I); Truncated apolipoprotein A-I]	APOA1	30,325
80	Inositol monophosphatase 1 (IMP 1) (IMPase 1) (EC 3.1.3.25) (D-galactose 1-phosphate phosphatase) (EC 3.1.3.94) (Inositol-1(or 4)-monophosphatase 1) (Lithium-sensitive myo-inositol monophosphatase A1)	IMPA1	30,133

Продолжение таблицы приложения Б

81	Myelin proteolipid protein (PLP) (Lipophilin)	PLP1 PLP	30,077
82	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4 (EC 1.1.1.184) (NADPH-dependent carbonyl reductase/NADP-retinol dehydrogenase) (CR) (PHCR) (NADPH-dependent retinol dehydrogenase/reductase) (NDRD) (Peroxisomal short-chain alcohol dehydrogenase) (PSCD)	DHRS4	29,919
83	Pro-opiomelanocortin (POMC) (Corticotropin-lipotropin) [Cleaved into: NPP; Melanotropin gamma (Gamma-MSH); Corticotropin (Adrenocorticotropic hormone) (ACTH); Melanocyte-stimulating hormone alpha (Alpha-MSH) (Melanotropin alpha); Corticotropin-like intermediary peptide (CLIP); Lipotropin beta (Beta-LPH); Lipotropin gamma (Gamma-LPH); Melanocyte-stimulating hormone beta (Beta-MSH) (Melanotropin beta); Beta-endorphin; Met-enkephalin]	POMC	28,895
84	Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [Cleaved into: BDNF precursor form (ProBDNF)]	BDNF	28,287
85	Major prion protein (PrP) (CD antigen CD230)	PRNP PRP	27,727
86	Mannose-binding protein A (MBP-A) (28 kDa mannan-binding protein monomeric subunit) (pMBP-28) (Mannan-binding lectin A) (MBL-A) (Mannose-binding lectin A)	MBL1 MBL-A	26,489
87	Delta-type opioid receptor (D-OR-1) (DOR-1) (Fragment)	OPRD1	25,725
88	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase (PIMT) (EC 2.1.1.77) (L-isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase) (Protein L-isoaspartyl/D-aspartyl methyltransferase) (Protein-beta-aspartate methyltransferase)	PCMT1	24,646
89	60S ribosomal protein L10 (Protein QM homolog) (Ribosomal protein L10)	RPL10 QM	24,603
90	Glycolipid transfer protein (GLTP)	GLTP	23,922
91	Fibroblast growth factor 9 (FGF-9) (Glia-activating factor) (GAF) (HBGF-9)	FGF9	23,455
92	UMP-CMP kinase (EC 2.7.4.14) (Deoxycytidylate kinase) (CK) (dCMP kinase) (Nucleoside-diphosphate kinase) (EC 2.7.4.6) (Uridine monophosphate/cytidine monophosphate kinase) (UMP/CMP kinase) (UMP/CMPK)	CMPK1 CMPK UCK	22,279
93	Syndecan-4 (SYND4)	SDC4	22,081

Продолжение таблицы приложения Б

94	Dermatopontin (22 kDa extracellular matrix protein) (Dermatan sulfate proteoglycan-associated protein 22K) (Tyrosine-rich acidic matrix protein) (TRAMP)	DPT	21,994
95	Guanylate kinase (EC 2.7.4.8) (GMP kinase)	GUK1 GUK	21,921
96	Selenoprotein S (SelS)	SELENOS SELS	21,279
97	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase (EC 2.3.1.43) (Lecithin-cholesterol acyltransferase) (Phospholipid-cholesterol acyltransferase) (Fragments)	LCAT	21,238
98	Calcium load-activated calcium channel (CLAC channel) (Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1)	TMCO1	21,175
99	Glucagon [Cleaved into: Glicentin; Glicentin-related polypeptide (GRPP); Oxyntomodulin (OXM) (OXY); Glucagon; Glucagon-like peptide 1 (GLP-1); Glucagon-like peptide 1(7-37) (GLP-1(7-37)); Glucagon-like peptide 1(7-36) (GLP-1(7-36)); Glucagon-like peptide 2 (GLP-2)]	GCG	21,029
100	Prostaglandin-H2 D-isomerase (EC 5.3.99.2) (Glutathione-independent PGD synthase) (Lipocalin-type prostaglandin-D synthase) (Prostaglandin-D2 synthase) (PGD2 synthase) (PGDS) (PGDS2)	PTGDS	20,568
101	Pleiotrophin (PTN) (Pleiotrophic factor beta) (PTF-beta)	PTN	18,910
102	Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform)	CFL1	18,519
103	Destrin (Actin-depolymerizing factor) (ADF)	DSTN DSN	18,506
104	Myelin basic protein (MBP)	MBP	18,487
105	Neuroglobin	NGB	16,986
106	5-hydroxytryptamine receptor 1B (5-HT-1B) (5-HT1B) (Serotonin receptor 1B) (Fragment)	HTR1B	16,941
107	Trafficking protein particle complex subunit 2	TRAPPC2	16,415
108	Transthyretin (Prealbumin)	TTR	16,081
109	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B (Phosphatase holoenzyme inhibitor 1) (PHI-1) (Ubiquitous PKC-potentiated PP1 inhibitor)	PPP1R14B PHI1	15,911

Продолжение таблицы приложения Б

110	Opalin (Oligodendrocytic myelin paranodal and inner loop protein) (Transmembrane protein 10) (Transmembrane protein sp83.5)	OPALIN SP83.5 TMEM10	15,771
111	2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase (EC 4.1.1.45) (Picolinate carboxylase) (Fragments)	ACMSD	15,679
112	5-hydroxytryptamine receptor 4 (5-HT-4) (5-HT4) (Serotonin receptor 4) (Fragment)	HTR4	15,622
113	Brain and acute leukemia cytoplasmic protein	BAALC	15,401
114	POU domain, class 3, transcription factor 3 (Brain-specific homeobox/POU domain protein 1) (Brain-1) (Brn-1) (Fragment)	POU3F3 BRN1	14,724
115	Secretin	SCT	14,581
116	40S ribosomal protein S12	RPS12	14,515
117	Natriuretic peptides B (Gamma-brain natriuretic peptide) [Cleaved into: Brain natriuretic peptide 32 (BNP-32); Brain natriuretic peptide 26 (BNP-26)]	NPPB	14,512
118	Calcitonin receptor-stimulating peptide 1 (CRSP-1)	CRSP1 CRSP	14,240
119	Calcitonin receptor-stimulating peptide 3 (CRSP-3)	CRSP3	14,036
120	Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1 (BM88 antigen)	CEND1 BM88	13,968
121	Alpha-endosulfine (ARPP-19e)	ENSA	13,361
122	C-type natriuretic peptide [Cleaved into: CNP-22; CNP-29; CNP-53]	NPPC CNP	13,243
123	Calcitonin receptor-stimulating peptide 2 (CRSP-2)	CRSP2	12,969
124	Cholecystokinin (CCK) [Cleaved into: Cholecystokinin-58 (CCK58); Cholecystokinin-58 desnonopeptide ((1-49)-CCK58); Cholecystokinin-39 (CCK39); Cholecystokinin-33 (CCK33); Cholecystokinin-25 (CCK25); Cholecystokinin-18 (CCK18); Cholecystokinin-12 (CCK12); Cholecystokinin-8 (CCK8); Cholecystokinin-7 (CCK7); Cholecystokinin-5 (CCK5)]	CCK	12,526

Продолжение таблицы приложения Б

125	ADM5 [Cleaved into: Adrenomedullin-5 (AM5)]	ADM5	12,507
126	TYRO protein tyrosine kinase-binding protein (DNAX-activation protein 12)	TYROBP DAP12	11,617
127	Acylphosphatase-1 (EC 3.6.1.7) (Acylphosphatase, organ-common type isozyme) (Acylphosphate phosphohydrolase 1)	ACYP1 ACYPE	11,427
128	C-C motif chemokine 2 (Monocyte chemoattractant protein 1) (Monocyte chemotactic protein 1) (MCP-1) (Small-inducible cytokine A2)	CCL2 SCYA2	10,976
129	Phospholemman (FXYD domain-containing ion transport regulator 1) (Sodium/potassium-transporting ATPase subunit FXYD1)	FXYD1 PLM	9,672
130	Small muscular protein	SMPX	9,346
131	Neuronatin	NNAT	9,246
132	TSC22 domain family protein 3 (DSIP-immunoreactive peptide) (DIP protein) (Delta sleep-inducing peptide immunoreactor) (Glucocorticoid-induced leucine zipper protein)	TSC22D3 DSIPI GILZ	8,713
133	Pro-neuropeptide Y [Cleaved into: Neuropeptide Y (Neuropeptide tyrosine) (NPY); C-flanking peptide of NPY (CPON)] (Fragment)	NPY	8,596
134	Metallothionein-3 (MT-3) (Growth inhibitory factor) (GIF) (Metallothionein-III) (MT-III)	MT3	6,927
135	Neuronal protein NP-190 (Fragments)		6,010
136	Neuromedin-B [Cleaved into: Neuromedin-B-32; Neuromedin-B-30; Neuromedin-B]	NMB	3,654
137	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (GDH 1) (EC 1.4.1.3) (Membrane protein 50) (MP50) (Fragments)	GLUD1 GLUD	3,624
138	Nociceptin (Orphanin FQ)	PNOC	1,809
139	Cerebellin-1 (Precerebellin) [Cleaved into: Cerebellin (CER); [des-Ser1]-cerebellin] (Fragment)	Cbln1	1,633

Приложение В

Результаты биоинформационной обработки данных, полученных по технологии iTRAQ

ID белка//белков	Ген-кодирующий белок	Мм, кДа	Относительная интенсивность
tr|K7GL83|K7GL83_PIG Interleukin enhancer binding factor 3	ILF3		
tr|K7GP99|K7GP99_PIG Interleukin enhancer binding factor 3		76,366	1,833864888
tr|F1RK02|F1RK02_PIG Lymphocyte cytosolic protein 1	LCP1		
tr|A0A287ANV7|A0A287ANV7_PIG Lymphocyte cytosolic protein 1		70,203	1,880314021
tr|A0A287B4N2|A0A287B4N2_PIG Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	HCLS1		
tr|F1SPE8|F1SPE8_PIG Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1		54,828	1,520771789
tr|Q19AZ5|Q19AZ5_PIG Antithrombin protein			
tr|F2Z5E2|F2Z5E2_PIG Uncharacterized protein	SERPINC1 AT3		
tr|Q9GMD6|Q9GMD6_PIG Antithrombin III (Fragment)		52,385	1,638178449
tr|L8B0X5|L8B0X5_PIG IgG heavy chain	IGHG		
tr|L8B0W5|L8B0W5_PIG IgG heavy chain OS=Sus scrofa			
tr|L8AXL3|L8AXL3_PIG IgG heavy chain			
tr|L8B0U1|L8B0U1_PIG IgG		52,337	1,885580726
tr|L8B0W9|L8B0W9_PIG IgG heavy chain	IGHG		
tr|K7ZPU9|K7ZPU9_PIG IgG heavy chian constant region (Fragment)	IGHG6-1	51,129	3,435179338
tr|L8B0U3|L8B0U3_PIG IgG heavy chain OS=Sus scrofa	IGHG		
tr|L8B165|L8B165_PIG IgG heavy			
tr|L8B139|L8B139_PIG IgG heavy chain		51,125	1,429988514
tr|L8B0U8|L8B0U8_PIG IgG heavy chain	IGHG		
tr|L8AXK3|L8AXK3_PIG IgG heavy chain	IGHG1		
tr|K7ZLA7|K7ZLA7_PIG IgG heavy chian constant region (Fragment)		50,917	1,645942237
tr|A0A286ZRR3|A0A286ZRR3_PIG Selenium binding protein 1	SELENBP1		
tr|A0A286ZVY0|A0A286ZVY0_PIG Selenium binding protein 1			
tr|F1ST01|F1ST01_PIG Selenium binding protein 1		50,728	1,467322539
tr|L8B0R9|L8B0R9_PIG IgG heavy chain	IGHG		
tr|K7ZMG0|K7ZMG0_PIG IgG heavy chian constant region (Fragment)	IGHG6-2	49,533	1,810790776
tr|A0A287B9X9|A0A287B9X9_PIG Uncharacterized protein			

Продолжение таблицы приложения В

tr|K7GR37|K7GR37_PIG Septin 6 tr|K7GQ44|K7GQ44_PIG Septin 6 tr|K7GKL7|K7GKL7_PIG Septin 6 tr|F1RUA1|F1RUA1_PIG Septin 6	SEPT6	48,02	1,662848997
tr|K7GS49|K7GS49_PIG Interleukin enhancer binding factor 2	ILF2	43,05	1,930824972
tr|F2Z5B1|F2Z5B1_PIG Leukocyte elastase inhibitor tr|A0A287B7P2|A0A287B7P2_PIG Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1	42,57	1,717433844
tr|F1RTY6|F1RTY6_PIG Peptidylprolyl isomerase D	PPID	40,75	1,739715142
tr|F1SJ07|F1SJ07_PIG Pleckstrin	PLEK	40,066	2,476275924
tr|K7ZRK0|K7ZRK0_PIG IgA heavy chian constant region (Fragment) tr|A0A287B249|A0A287B249_PIG Uncharacterized protein OS	IGHA	36,614	1,690874438
tr|A4ZVH0|A4ZVH0_PIG MHC class I antigen tr|A4ZVH2|A4ZVH2_PIG MHC class I antigen tr|A4ZVH3|A4ZVH3_PIG MHC class I antigen OS=Sus scrofa	SLA	34,952	1,548794936
tr|A0A287AQE1|A0A287AQE1_PIG SUMO1 activating enzyme subunit 1 tr|F1RM03|F1RM03_PIG SUMO1 activating enzyme subunit 1	SAE1	31,893	1,8948432
tr|A0A2C9F365|A0A2C9F365_PIG Osteoclast-stimulating factor 1	OSTF1	26,251	2,038012646
tr|B6E241|B6E241_PIG Growth factor receptor bound protein 2	GRB2	25,206	1,780457962
tr|E7EI20|E7EI20_PIG Rho GDP dissociation inhibitor alpha	ARHGDIA	23,394	1,804885889
tr|F1RGI2|F1RGI2_PIG Platelet activating factor acetylhydrolase 1b catalytic subunit 3 tr|A0A286ZVJ9|A0A286ZVJ9_PIG Platelet activating factor acetylhydrolase 1b catalytic subunit 3	PAFAH1B3 PAFAH	22,565	
tr|F1S2E3|F1S2E3_PIG Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIF	22,022	1,514923662
tr|F2Z5V4|F2Z5V4_PIG Platelet activating factor acetylhydrolase 1b catalytic subunit 2 tr|A0A287ALL0|A0A287ALL0_PIG Platelet activating factor acetylhydrolase 1b catalytic subunit 2	PAFAH1B2 PAFAH	22,002	2,632429455
tr|K7GQI7|K7GQI7_PIG Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD OS=Sus scrofa	ASC	21,929	8,519924798
tr|F1RGG8|F1RGG8_PIG Marginal zone B and B1 cell specific protein OS=Sus scrofa	MZB1	21,573	1,644761361
tr|F1S0V6|F1S0V6_PIG GM2 ganglioside activator OS=Sus scrofa	GM2A	20,876	2,753721641
tr|A0A287A9S3|A0A287A9S3_PIG Tumor protein D52 tr|A0A286ZLX7|A0A286ZLX7_PIG Tumor protein D52 tr|F1RX99|F1RX99_PIG Tumor protein D52 OS=Sus scrofa	TPD52	19,902	4,789510849

Продолжение таблицы приложения В

tr|A0A287ANZ8|A0A287ANZ8_PIG Thy-1 cell surface antigen tr|A0A1V0CLY1|A0A1V0CLY1_PIG Membrane glycoprotein (Fragment) tr|B9ZSM8|B9ZSM8_PIG CD90 protein	THY1 thy-1	17,2	1,630831879
tr|A0A287B024|A0A287B024_PIG Glia maturation factor gamma tr|F1SEH2|F1SEH2_PIG Glia maturation factor gamma OS=Sus scrofa tr|A0A287AU23|A0A287AU23_PIG Glia maturation factor gamma	GMFG	16,784	2,0716473
tr|A5D9N3|A5D9N3_PIG Allograft inflammatory factor 1 OS=Sus scrofa tr|Q9GK83|Q9GK83_PIG Allograft inflammatory factor-1 (Fragment)	AIF1	16,695	1,510293764
tr|A0A287AC69|A0A287AC69_PIG Proliferation and apoptosis adaptor protein 15	PEA15	15,04	1,612838516
tr|D0G778|D0G778_PIG Macrophage migration inhibitory factor (Fragment)	MIF	11,874	2,47818209
tr|Q29286|Q29286_PIG Prothymosin alpha (Fragment) tr|C3VVV8|C3VVV8_PIG Prothymosin alpha OS=Sus scrofa tr|A0A287AUS8|A0A287AUS8_PIG Uncharacterized protein OS	PTMA	11,683	1,699616313
tr|Q6WSP6|Q6WSP6_PIG Chaperonin 10 tr|F1SMZ6|F1SMZ6_PIG Uncharacterized protein	HSPE1	10,932	1,854754893
tr|I3L5R6|I3L5R6_PIG Protein S100 OS=Sus scrofa tr|A0A286ZP11|A0A286ZP11_PIG Protein S100 OS=Sus scrofa	S100B LOC110258323	10,627	1,916906252
tr|K7GQ50|K7GQ50_PIG Protein S100 OS=Sus scrofa	S100A1	10,518	1,556733893
tr|I3L7Z6|I3L7Z6_PIG Protein S100 OS=Sus scrofa	S100A6	10,088	1,77956295
tr|L7WWF1|L7WWF1_PIG Gamma-inducible interferon 30 (Fragment)		7,6068	1,688445667
tr|L7X1L8|L7X1L8_PIG Cell division cycle 42 (Fragment) tr|F2Z5W2|F2Z5W2_PIG Cell division control protein 42 homolog	CDC42	7,5176	1,865980422
tr|D0G0C7|D0G0C7_PIG Antioxidant protein 1 homolog (Yeast) tr|I3L7P7|I3L7P7_PIG Uncharacterized protein OS=Sus scrofa	ATOX1	7,3664	1,538961508
tr|B3XXC3|B3XXC3_PIG Thymosin beta tr|A0A286ZVG3|A0A286ZVG3_PIG Thymosin beta	TMSB4X LOC110257905	5,0526	1,972442071

Приложение Г

АКТ
апробации технологии

На базе производственных помещений ОАО «Московского завода сычужного фермента» 14 ноября 2018 года при участии начальника производственно-испытательной лаборатории Н.К. Гринь, мастера по ферментному производству Устиновой Г.М. и Федуловой Л.В. была проведена апробация технологии и экспериментальная выработка образцов инкапсулированного экстракта иммуных органов свиней с применением лиофильной сушки.

Продукт был выработан в виде сухих капсул в количестве: 1,5 кг

Продукт был расфасован в стеклянные банки объемом 500 мл.

Подписи:

Н.К. Гринь

Г.М. Устинова

Л.В. Федулова

Руководитель _____ Корох Андрей Дмитриевич
(подпись) (расшифровка подписи)

"Московский завод сычужного фермента" МОСКВА

Приложение Д

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 524 127** (13) **C1**

(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2013121753/14, 14.05.2013**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.05.2013

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **14.05.2013**

(45) Опубликовано: **27.07.2014** Бюл. № **21**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2033646 C1, 20.04.1995. RU 2192048 C2, 27.10.2002. US 20060141493 A1, 29.06.2006. US 20100138939 A1, 03.06.2010. ДОЛГОВ В. В. Моделирование и количественная оценка действия риск-факторов атеросклероза на перфузируемых артериях кролика.Атеросклероз человека, 1989, С. 55-70. БОБКОВА А. С. Комбинированное действие инфракрасного излучения,** (см. прод.)

Адрес для переписки:
109316, Москва, ул. Талалихина, 26, ВНИИМП им. В.М. Горбатова, Центр интеллектуальной собственности, Трифонову М.В.

(72) Автор(ы):
Лисицын Андрей Борисович (RU),
Чернуха Ирина Михайловна (RU),
Федулова Лилия Вячеславовна (RU),
Котенкова Елена Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова Российской академии сельскохозяйственных наук (RU)

RU 2524127 C1

(54) СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА

(57) Реферат:

Изобретение относится к экспериментальной медицине и касается моделирования атеросклероза. Для этого крысам самцам, возраст которых превышает 1 год, скармливают сбалансированный рацион, который поэтапно частично заменяют на холестерин и свиной жир. Перорально вводят витамин D2 в количестве от 35000 МЕ/кг до 60000 МЕ/кг массы тела. Указанные манипуляции осуществляют на фоне воздействия стрессовых факторов: шума, варьировании длины светового дня и периодической гипоксии. Способ обеспечивает индуцирование патолого-анатомических, гематологических, биохимических и гистологических изменений, характерных для атеросклероза и приближенных к таковым у человека. 4 пр., 2 табл.

(56) (продолжение):
постоянного и переменного магнитных полей при экспериментальном атеросклерозе. Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физ. Культуры. 1998, N4, С. 31-36. СОБЕНИН И. А. Принципы патогенетической терапии атеросклероза, использование клеточных моделей. автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук, 2006, с.3-25. TIAN J et al. A novel model of atherosclerosis in rabbits using injury to arterial walls induced by ferric chloride as evaluated by optical coherence

Приложение Е

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
(ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН
(ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

УТВЕРЖДАЮ
Врио директора ФГБНУ
«ФНЦ пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН,
д-р техн. наук
_____ Кузнецова О.А.
«___» _____ 2018 г.
М.П.

И.М. Чернуха, Л.В. Федулова, Э.Б. Кашинова, Е.А. Котенкова

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по экспериментальному моделированию сердечно-сосудистых заболеваний
у лабораторных животных

МОСКВА, 2018

Приложение Ж

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН
(ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ
«ФНЦ пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН,
д-р техн. наук
_____ Кузнецова О.А.
«__» _____ 2020 г.
М.П.

Л.В. Федулова, Э.Б. Кашинова, Е.А. Котенкова, Е.Р. Василевская, А.Г. Ахремко

ПРОГРАММА И МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И МЯСНЫХ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ

Москва, 2020 г

Приложение 3

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57622— 2017

Продукция пищевая специализированная

КОНСЕРВЫ МЯСНЫЕ СТЕРИЛИЗОВАННЫЕ ФАРШЕВЫЕ БИОКОРРИГИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

Технические условия

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2017

продолжение Приложения 3

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова» (ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 36

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 августа 2017 г. № 942-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (www.gost.ru)

© Стандартинформ, 2017

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

продолжение Приложения З

Разработчики стандарта:
ФГБНУ «ВНИИМП им. В. М. Горбатова»

Директор	Лисицын А. Б
Заместитель директора	Кузнецова О.А.
Руководитель отдела «Технического регулирования и систем управления качеством»	Юрчак З.А.
Заведующий Экспериментальной Клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения	Федулова Л.В.
Главный научный сотрудник Экспериментальной Клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения	Чернуха И.М.
Научный сотрудник Экспериментальной Клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения	Котенкова Е.А.
Главный научный сотрудник, руководитель направления технологии консервного производства	Крылова В.Б.

Приложение И

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 550 649** (13) **C2**

(51) МПК
A23L 1/31 (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01)
A23B 4/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2013125885/13, 05.06.2013**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.06.2013

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **05.06.2013**

(43) Дата публикации заявки: **10.12.2014** Бюл. № **34**

(45) Опубликовано: **10.05.2015** Бюл. № **13**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2385651 C2, 10.04.2010. RU 2368383 C1, 27.09.2009. RU 2338396 C2, 20.11.2008**

Адрес для переписки:
109316, Москва, ул. Талалихина, 26, ФГБНУ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова", Центр интеллектуальной собственности, Трифонову М.В.

(72) Автор(ы):
Лисицын Андрей Борисович (RU),
Чернуха Ирина Михайловна (RU),
Федулова Лилия Вячеславовна (RU),
Котенкова Елена Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова" (RU)

RU 2550649 C2

(54) ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ МЯСНОЙ ПРОДУКТ И СПОСОБ ЕГО ПРОИЗВОДСТВА

(57) Реферат:

Изобретение относится к пищевой, в частности мясной промышленности, а также к области медицины, в частности к диетологии, нейрореабилитологии. Способ включает заморозку сырья, размораживание, измельчение и тепловую обработку. Берут свинину полужирную или нежирную, полученную от животных, перенесших аутогеморрагический инсульт, или свиные сердца, или свиные аорты, или говяжьи сердца, или говяжьи аорты, или любые их сочетания, замораживают до температуры в толще сырья от минус 15 до минус 30°С, хранят при температуре от минус 15 до минус 30°С в течение 6-24 месяцев. По окончании хранения измельчают сырье до размера сторон мясного сырья от 2 до 50 мм, полученную массу бланшируют при температуре от 60 до 80°С, добавляют поваренную соль, в количестве 0,1% до 0,3% к массе исходного сырья, крахмал картофельный или кукурузный или любые их сочетания, в количестве от 0,5% до 3% к массе исходного сырья, тонко измельчают до гомогенного состояния. Полученную массу фасуют в консервные банки, стерилизуют или пастеризуют и охлаждают. Обеспечивается увеличение в готовом продукте низкомолекулярных белковых фракций в два раза по сравнению с мясными продуктами, выработанными из мясного сырья без замораживания. 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 1 табл., 8 пр.

RU 2550649 C2

Приложение К

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ ГОСТ 21192 –2019

ЖЕЛЕЗЫ ЗОБНЫЕ ЗАМОРОЖЕННЫЕ

Технические условия

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

продолжение Приложения К

УТВЕРЖДЕН
Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии
Начальник Управления_____

ГОСТ 21192–

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ЖЕЛЕЗЫ ЗОБНЫЕ ЗАМОРОЖЕННЫЕ

Технические условия

Frozen goitre glands.
Specifications

Дата введения –

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на замороженные зобные железы свиней-молодняка, телят и молодняка крупного рогатого скота (далее – железы), предназначенные для производства медицинских и ветеринарных препаратов.

Зобные железы в качестве продукта убоя могут быть использованы на пищевые цели, в том числе для поставки на экспорт.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 8.579 Государственная система обеспечения единства измерений. Требования к количеству фасованных товаров в упаковках любого вида при их производстве, расфасовке, продаже и импорте

ГОСТ 7269 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести

ГОСТ 7730 Пленка целлюлозная. Технические условия

ГОСТ 9142 Ящики из гофрированного картона. Общие технические условия

ГОСТ 10354 Пленка полиэтиленовая. Технические условия

ГОСТ 12302 Пакеты из полимерных пленок и комбинированных материалов. Общие технические условия

ГОСТ 13511 Ящики из гофрированного картона для пищевых продуктов, спичек, табачных изделий и моющих средств. Технические условия

ГОСТ 14192 Маркировка грузов

ГОСТ 15846 Продукция, отправляемая в районы Крайнего Севера и приравненные к ним местности. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» № 14
В НАБОР

Издание официальное

продолжение Приложения К

Разработчики стандарта:

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Врио директора	О.А. Кузнецова
Научный руководитель	А.Б. Лисицын
Заместитель директора по научной работе	А.А. Семенова
Руководитель Отдела технического регулирования и систем управления качеством	З.А. Юрчак
Заведующий Экспериментальной клиникой-лабораторией биологически активных веществ животного происхождения	Л.В. Федулова
Научн. сотр. Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения	Е.Р. Василевская
Научный сотрудник, руководитель направления	И.В. Козырев

МИНИСТЕРСТВО ПРОМЫШЛЕННОСТИ И ТОРГОВЛИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ
(Росстандарт)**

ПРИКАЗ

27 августа 2019 г. № 540-ст

Москва

О введении в действие межгосударственного стандарта

В соответствии со статьей 9 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации», а также с учетом протокола Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации от 30 июля 2019 г. № 120-П п р и к а з ы в а ю:

1. Ввести в действие с 1 июля 2020 г. в качестве национального стандарта Российской Федерации межгосударственный стандарт ГОСТ 21192-2019 «Железы зобные замороженные. Технические условия» взамен ГОСТ 21192-75.

2. Управлению технического регулирования и стандартизации (И.А. Киреева) обеспечить размещение информации о введенном в действие настоящим приказом стандарте на официальном сайте Росстандарта в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» (далее – официальный сайт) с учетом действующего законодательства о стандартизации.

3. Федеральному государственному унитарному предприятию «Российский научно-технический центр информации по стандартизации, метрологии и оценке соответствия» (В.А. Витушкин) разместить настоящий приказ и введенный в действие им стандарт на официальном сайте в установленном порядке.

4. Закрепить введенный в действие настоящим приказом стандарт за Управлением технического регулирования и стандартизации.

Заместитель Руководителя А.П.Шалаев

ДЛЯ ЗАВЕРЕНИЯ КОПИЙ ЭЛЕКТРОННЫХ ДОКУМЕНТОВ № 9

Подлинник электронного документа, подписанного ЭП, хранится в системе электронного документооборота Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии.

СВЕДЕНИЯ О СЕРТИФИКАТЕ ЭП

Сертификат: 00E1036EE32C11E880E9E0071881968057
Кому выдан: Шалаев Антон Павлович
Действителен: с 08.11.2018 до 08.11.2019

Приложение Л

РАСПОРЯЖЕНИЕМ ПРАВИТЕЛЬСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

от 5 октября 2016 г. № 2088-р

ПРИСУЖДЕНА

ПРЕМИЯ ПРАВИТЕЛЬСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
В ОБЛАСТИ НАУКИ И ТЕХНИКИ
ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

ФЕДУЛОВОЙ
Лилии Вячеславовне –

за высокоэффективные подходы к реализации молекулярно-генетических методов и повышению уровня биоконверсии кормов в производстве социально значимой продукции животноводства

Председатель Правительства Российской Федерации

Д.А.Медведев

№ 11449

МОСКВА

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РАСПОРЯЖЕНИЕ

от 5 октября 2016 г. № 2088-р

МОСКВА

О присуждении премий Правительства Российской Федерации 2016 года в области науки и техники для молодых ученых

Присудить премии Правительства Российской Федерации 2016 года в области науки и техники для молодых ученых и присвоить звание "Лауреат премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники для молодых ученых (лауреат премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники для молодых ученых - научный руководитель авторского коллектива)":

1) Стенникову Валерию Алексеевичу, доктору технических наук, профессору, заместителю директора, заведующему отделом, заведующему лабораторией федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт систем энергетики им. Л.А. Мелентьева Сибирского отделения Российской академии наук, научному руководителю авторского коллектива, Барахтенко Евгению Алексеевичу, Соколову Дмитрию Витальевичу, кандидатам технических наук, старшим научным сотрудникам, - работникам того же учреждения, - за разработку методов инновационного развития теплоснабжающих систем и их практическую реализацию;

2) Ткачеву Алексею Григорьевичу, доктору технических наук, профессору, заведующему кафедрой федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Тамбовский государственный технический университет", научному руководителю авторского коллектива, Блохину Александру Николаевичу, кандидату технических наук, старшему преподавателю кафедры, Буракову Александру Евгеньевичу, Щеголькову Александру Викторовичу, кандидатам технических наук, доцентам кафедры, - работникам того же

учреждения, - за разработку научных основ и создание отечественного производства углеродных наноструктур серии "Таунит" - модификаторов конструкционных и функциональных материалов специального назначения;

3) Мосоловой Наталье Ивановне, доктору биологических наук, главному научному сотруднику федерального государственного бюджетного научного учреждения "Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции", научному руководителю авторского коллектива, Злобиной Елене Юрьевне, кандидату биологических наук, ведущему научному сотруднику того же учреждения; Иванову Сергею Михайловичу, кандидату биологических наук, главному специалисту общества с ограниченной ответственностью "МегаМикс"; Пряничниковой Наталии Сергеевне, кандидату технических наук, старшему научному сотруднику федерального государственного бюджетного научного учреждения "Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности"; Федуловой Лилии Вячеславовне, кандидату технических наук, заведующей клиникой-лабораторией федерального государственного бюджетного научного учреждения "Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова", - за высокоэффективные подходы к реализации молекулярно-генетических методов и повышению уровня биоконверсии кормов в производстве социально значимой продукции животноводства;

4) Остерману Илье Андреевичу, кандидату химических наук, научному сотруднику федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", - за высокопроизводительную систему для поиска новых антибактериальных препаратов;

5) Фролову Алексею Андреевичу, кандидату физико-математических наук, старшему научному сотруднику федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт проблем передачи информации им. А.А.Харкевича Российской академии наук, Хорову Евгению Михайловичу, кандидату технических наук, старшему научному сотруднику того же учреждения, - за исследование и разработку протоколов для перспективных беспроводных сетей;

6) Романову Виталию Васильевичу, старшему научному сотруднику Института лазерно-физических исследований федерального

продолжение Приложения Л

государственного унитарного предприятия "Российский федеральный ядерный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики", научному руководителю авторского коллектива; Чижикову Александру Ильичу, инженеру 1 категории федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Национальный исследовательский технологический университет "МИСиС", Юшкову Константину Борисовичу, кандидату физико-математических наук, ведущему научному сотруднику того же учреждения, - за создание комплекса акустооптического дисперсионного управления субпикосекундными импульсами для мощной лазерной установки инерциального термоядерного синтеза нового поколения.

Председатель Правительства
Российской Федерации Д.Медведев