

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Кемеровский государственный университет»

На правах рукописи

ВЕСНИНА АННА ДМИТРИЕВНА

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ
ИЗ МЕТАБОЛИТОВ HAIRY ROOTS РАСТЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ
АНТИАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ**

4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Просеков Александр Юрьевич

Кемерово 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	9
1.1 Актуальность персонального питания для профилактики атеросклероза.....	9
1.2 Анализ рынка и патентной информации по функциональным пищевым ингредиентам с антиатеросклеротическим потенциалом.....	12
1.3 Генетика и атеросклероз, функциональные пищевые ингредиенты с антиатеросклеротическим потенциалом.....	14
1.3.1 Гены, влияющие на развитие атеросклероза.....	14
1.3.2 Пробиотические компоненты с антиатеросклеротическим потенциалом.....	18
1.3.3 Биологически активные вещества с антиатеросклеротическим потенциалом, растительные источники (hairу roots) для их выделения.....	22
1.4 Заключение по литературному обзору.....	36
ГЛАВА 2 ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1 Организация выполнения работы и схема эксперимента.....	38
2.2 Объекты исследования.....	40
2.3 Характеристика исследуемой группы.....	42
2.4 Материалы и методы исследования.....	43
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	62
3.1 Анализ факторов риска развития атеросклероза у потребителей.....	62
3.2 Параметры культивирования и анализ роста hairу roots растений.....	70
3.3 Получение экстрактов hairу roots растений, изучение их биологических свойств.....	73
3.4 Выделение и очистка целевых БАВ с ААЗ из экстрактов hairу roots растений, изучение их биофункциональных свойств.....	83

ГЛАВА 4 ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	94
4.1 Формирование пробиотических консорциумов с антиатеросклеротическим потенциалом.....	94
4.2 Формирование синбиотических добавок с антиатеросклеротическим потенциалом.....	108
4.3 Формирование функциональных пищевых добавок с антиатеросклеротическим потенциалом.....	114
4.4 Принципиальная схема получения и рекомендации по применению разработанных ФПД.....	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	127
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	160

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. По данным Всемирной организации здравоохранения сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности населения во всем мире (из всех смертельных случаев на их долю приходится 52,0–55,0 %) [8; 13; 50]. В России ССЗ составляют более трети всех смертей, имеется тенденция к «омоложению» больных, приводящему к потере трудоспособного населения, и сверхсмертности мужчин. Уровень смертности мужчин превышает уровень смертности среди женщин от болезней системы кровообращения в целом в 4,7 раза, от ишемической болезни сердца (ИБС) – в 7,2 раза, от инфаркта миокарда (ИМ) – в 9,1 раза, от цереброваскулярных болезней – в 3,4 раза [56]. Хроническое воспалительное заболевание крупных и средних артерий (атеросклероз – АЗ) является одним из распространённых ССЗ. Несмотря на возможности современной медицины и доступность высокотехнологичной медицинской помощи уровень смертности от АЗ остается высоким [60]. Известно, что развитие АЗ на 60,0 % зависит от образа жизни: неправильного питания, вредных привычек, низкой физической активности, индекса массы тела (ИМТ) и т. п. [264]. Вклад вносят и генетические особенности, состояние микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), воздействие окружающей среды.

Сбалансированное питание является относительно простым и доступным профилактическим средством как для первичной, так и для вторичной профилактики АЗ [59; 115]. Универсальные диетические подходы (рационы) чаще всего не оказывают, оказывают слабое и/или непродолжительное воздействие, не проявляя кардиопротекторное действие на организм потребителя. Следовательно, важен персонализированный подход в формировании диетических рекомендаций, направленных на профилактику АЗ [50]. Для полноценного профилактического воздействия на организм с помощью персонального питания (ПП) актуален прием индивидуально подобранных пробиотических, пребиотических, синбиотических препаратов, биологически активных веществ (БАВ), то есть функциональных пищевых ингредиентов (ФПИ).

Перспективным источником ФПИ традиционно являются растительные объекты. Для сохранения биоразнообразия перспективно применение биотехнологических методов культивирования *in vitro*, например, выращивание hairy roots – сырья, богатого ценными первичными и вторичными метаболитами. Результаты ранее проведенных исследований в рамках государственного задания FZSR-2020-0006 показали, что hairy roots шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi.), левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides* Pjin.), копеечника забытого (*Hedysarum neglectum* Ledeb) целесообразно использовать в качестве источника потенциальных кардиопротекторов – байкалина, хлорогеновой кислоты и кверцетина, соответственно.

Степень разработанности темы исследования. Вклад в развитие науки о питании отражен в трудах В. А. Тутельяна, И. М. Чернухи, А. А. Кочетковой, С. А. Дербеневой, А. В. Погожева, О. А. Вржесинской, J. A. Marcum, I. Vazquez-Vidal, L. R. Ferguson, J. M. Ordovas, J. R. Horne, E. A. Nagwa и др. Вклад в развитие методов культивирования *in vitro* в биотехнологии растений отражен в трудах А. Ю. Степановой, А. И. Соловьевой, E. Skala, A. Stojakowska и др.

Отдельные этапы работы выполнены в рамках государственного задания FZSR-2023-0002 и FZSR-2020-0006.

Цель и задачи работы. Разработка состава функциональных пищевых добавок персонализированного действия для профилактики атеросклероза с использованием метаболитов hairy roots.

Для реализации поставленной цели сформулированы следующие задачи:

- проанализировать современное состояние персонализированного питания для профилактики АЗ, выделить ФПИ с антиатеросклеротическим (ААЗ) потенциалом;
- изучить отдельные факторы риска развития АЗ (генетические особенности – однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), состояние здоровья и микробиоты ЖКТ, вредные привычки) у жителей Кузбасса для разработки персонализированного подхода в профилактике АЗ с использованием ФПД;
- подобрать качественный и количественный состав питательных сред (ПС) для выращивания hairy roots – сырья богатого БАВ с ААЗ потенциалом;

- получить экстракты hairy roots с ААЗ потенциалом, изучить их антиоксидантные свойства, качественный и количественный состав;
- извлечь целевые БАВ с ААЗ потенциалом из биомассы hairy roots, изучить их биофункциональные свойства;
- сформировать пробиотические композиции из молочнокислых бактерий, синбиотические добавки на их основе с ААЗ потенциалом;
- разработать на основе синбиотиков и БАВ из экстрактов hairy roots смеси функциональных пищевых ингредиентов (ФПИ) с ААЗ действием;
- разработать рекомендации по применению функциональных пищевых добавок (ФПД) на основе ФПИ в группах людей с повышенным риском развития АЗ;
- провести промышленную апробацию разработанной биотехнологии получения индивидуальных ФПД.

Научная новизна работы заключается в следующем:

- сформулированы рекомендации по обогащению сбалансированного рациона индивидуально подобранными ФПД на основе учета факторов риска развития АЗ у жителей Кемеровской области-Кузбасса;
- подобран качественный и количественный состав ПС для накопления значительного количества биомассы hairy roots в процессе культивирования;
- подтверждено наличие перспективного БАВ с ААЗ потенциалом, содержащимся в экстракте, полученном из биомассы hairy roots шлемника байкальского;
- определен ААЗ потенциал *in vitro* и *in vivo* БАВ-метаболитов (кверцетина, байкалина, хлорогеновой кислоты) hairy roots растений.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в обосновании использования байкалина, хлорогеновой кислоты, кверцетина в составе ФПД на основе синбиотиков профилактической направленности. Рассмотрены перспективы изготовления индивидуальных ФПД профилактической направленности.

Практическая значимость. Подобран качественный и количественный гормональный состав ПС для культивирования hairy roots шлемника байкальского,

левзеи сафлоровидной, копеечника забытого, позволяющий повысить индекс роста культур в среднем на 5,2 единицы. Представлен анализ ААЗ потенциала байкалина, кверцетина и хлорогеновой кислоты *in vitro* и *in vivo* на *Caenorhabditis elegans*; пробиотического потенциала молочнокислых бактерий, консорциумов, синбиотиков и ФПИ на их основе, и их способности снижать уровень холестерина.

Методология и методы исследования. Для реализации данной работы использовались общенаучные методы исследования: методы анализа и синтеза информации, биотехнологическое культивирование *in vitro* hairy roots; методы аналитической химии; микробиологические методы анализа; методы молекулярной биологии.

Положения, выносимые на защиту:

- качественный и количественный состав ПС для культивирования hairy roots;
- использование байкалина, кверцетина и хлорогеновой кислоты в составе ФПД профилактической направленности;
- перечень пробиотических штаммов, консорциумов, синбиотиков на их основе проявляющих ААЗ потенциал *in vitro*;
- биотехнология получения индивидуальных ФПИ, проявляющих ААЗ потенциал.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения и результаты исследований диссертационной работы были предметом докладов и обсуждений на мероприятиях различного уровня: международной научной и научно-практической конференции «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2019–2022); «Образование, наука, инновации: вклад молодых исследователей» (Кемерово, 2020, 2022); «Современные достижения биотехнологии. Техника, технологии и упаковка для реализации инновационных проектов на предприятиях пищевой и биотехнологической промышленности» (Ставрополь-Пятигорск, 2020); «Современные пищевые тенденции глазами молодых ученых: перспективы, инновации и прогрессивные технологии» (Санкт-Петербург, 2021); «Молодые ученые в аграрной науке» (Луганск, 2022); международный молодежный конкурс научных проектов «Стираем границы» (Москва, 2021); всероссийской конференции молодых ученых, посвященной году науки и технологий в

Российской Федерации (Казань, 2021); форуме «Наука будущего–наука молодых» (Новосибирск, 2022); AIP Conference Proceedings (Калининград, 2022).

Публикации. Основные материалы диссертации опубликованы в двадцати научных работах, в том числе в семи материалах конференции; в семи научных изданиях Scopus и Web of Science: «Genes», «Foods and raw materials», «International Journal of Pharmaceutical Research», «Journal of Personalized Medicine», «Brazilian Journal of Biology», «International Journal of Molecular Sciences», «Theory and practice of meat processing»; в шести статьях в журналах ВАК: «Техника и технология пищевых производств», «Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий», «Молочнохозяйственный вестник», «Пищевые системы», «Российская сельскохозяйственная наука», «Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует п. 1, 3, 9, 10, 13, 16, 21, 25 паспорта научной специальности ВАК РФ 4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологических веществ.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, результатов и выводов, списка использованных литературных источников (313 наименований), и приложений. Основной текст изложен на 121 странице, содержит 63 таблицы, 46 рисунков, 6 формул.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В данной главе отражена актуальность использования персонализированного подхода в питании для формирования профилактических ФПИ, проявляющих ААЗ потенциал. Рассмотрена важность учета генетических особенностей и оценки состояния микробиоты ЖКТ потребителей для формирования персонализированных рекомендаций. Проанализирован отечественный и мировой опыт создания ФПИ с ААЗ эффектом. Проведен обзор растительного сырья (полученного с помощью методов биотехнологического культивирования *in vitro*) – перспективного источника полифенолов с ААЗ потенциалом. Изучены гены, принимающие участие в развитии АЗ.

1.1 Актуальность персонального питания для профилактики атеросклероза

АЗ – хроническое воспалительное заболевание, связанное с накоплением липидов в стенке аорты, образованием пенистых клеток, приводящее к закупориванию сосудов, являющееся причиной развития ССЗ [210]. ССЗ являются серьезной проблемой современного общества, так как относятся к основным причинам смертности населения. Профилактика АЗ через контроль за основными факторами риска его развития – важный шаг в современном здравоохранении [279]. Здоровый образ жизни, а именно отказ от курения, малоподвижного образа жизни и соблюдение правильного питания, является эффективным профилактическим мероприятием. Питание является эффективным средством, влияющим на состояние здоровья; это фактор окружающей среды, постоянно воздействующий на организм потребителя, который способен его модулировать (изменять качество и количество употребляемой пищи). Здоровое питание (а именно биоактивность нутриентов) способно защитить организм-потребителя от развития, патогенеза социально значимых заболеваний, например, ССЗ, сахарного диабета, ожирения и прочих рас-

пространенных метаболических заболеваний, связанных с ухудшением образа жизни и экологической обстановки. Для разработки профилактических/лечебных диет необходимо не только придерживаться принципов сбалансированности рациона и концепции оптимального питания, но и опираться на достижения «omics» технологий (геномики, протеомики, транскриптомики, метаболомики, микробиомики и т.п.). Так как данные технологии способствуют пониманию и изучению того, как определенные компоненты пищи (ФПИ) влияют/оказывают профилактическое действие на организм потребителя [19; 28; 55; 61].

В работе L. R. Ferguson [155] представлена классификация питания. Так питание в работе подразделяется на:

- обычное питание, опирающееся на общие рекомендации, характерные для определенного пола, возраста, условиям труда и прочим факторам потребителя;
- генотип-ориентированное питание, формирующееся с учетом редких генетических заболеваний, связанных с питанием (например, фенилкетонурией);
- ПП, опирающееся на индивидуальную информацию о потребителе: на его генетические, диетические данные, фенотипические особенности и т.п. [247; 263].

Преимущество ПП заключается в том, что индивидуальные рекомендации являются более эффективными средствами профилактики, оздоровления организма, чем общие, универсальные подходы, которые не оказывают / оказывают негативное действие на организм потребителя [233; 271]. Составляющие ПП описаны в работе J. R. Horne [156]:

- общие рекомендации по питанию, составленные на основании проведенных исследований для различных групп людей – по возрасту, полу, детерминантам здоровья;
- индивидуальные рекомендации по питанию, основанные на фенотипических данных (например, антропометрических, биохимических, данных клинического обследования) потребителя;
- индивидуальные рекомендации по питанию, основанные на генетических особенностях потребителя;
- личные предпочтения потребителя (вкусовые привычки).

Для составления индивидуальных рекомендаций необходимы результаты исследования в области генетики питания (нутригенетики и нутригеномики) [147; 293].

Генетика питания или пищевая геномика – это наука, изучающая взаимодействие компонентов пищи с экспрессией генов. Наука подразделяется на нутригенетику – изучающую влияние генетических особенностей на метаболизм определенных веществ и реакцию организма на них, и нутригеномику – изучающую как определенные метаболиты (питательные вещества) влияют на экспрессию генов [122; 141]. Иными словами, исследования в области нутригенетики и нутригеномики способны спрогнозировать наличие предрасположенности к различным заболеваниям, в частности АЗ, определить какие компоненты пищи исключить, минимизировать или наоборот увеличить в рационе для поддержания здорового состояния организма. Особую роль в генетике питания играют SNP – это мутации, выражающиеся в виде замены одного нуклеотида на другой, в результате чего происходит замена одной аминокислоты на другую. Оценка данных мутаций позволяет изучить особенности метаболизма организма, спрогнозировать предрасположенности к развитию различных заболеваний [10; 268; 283].

Анализ научной литературы выявил два существующих подхода по формированию персонализированных диет, опирающихся на данные нутригенетики. Это работа В. В. Волобуева [37], в которой подбирается ПП для профилактики избыточного веса и / или пищевой непереносимости за счет назначения низкожирового / низкоуглеводного рациона. Для составления диет используются: общепринятая информация по низкожировой и низкоуглеводной диете (ограничение потребления жиров, углеводов, перечень продуктов, разрешенных к употреблению), нутригенетическая информация (рассматривались гены *TCF7L2*, *ADRB2*, *FABP2*, *PPRAG*, *LCT* и *HLA-DQ*), антропометрические показатели потребителей. И работа В. Н. Ивановой [51], в которой для назначения диеты использовалась балльная шкала оценки риск развития заболеваний, связанных с аллелью исследуемых генов. Так наличие полиморфизма в двух копиях генов оценивалось в 2 балла (максимальный риск), наличие полиморфизма в одной копии генов – 1 балл (средний риск), отсутствие полиморфизма – 0 бал-

лов (риск отсутствовал). На основании балльной оценки подбирался рацион, необходимое содержание БАВ в продуктах.

Здоровое состояние организма зависит от функционирования микробиоты ЖКТ потребителя, следовательно, развитие АЗ связано микробиотой ЖКТ [97; 210; 213]. В результате перспективен поиск веществ, обладающих ААЗ действием и способностью нормализовать работу микробиоты ЖКТ. Данные вещества могут попадать в организм с пищей [174], например, за счет употребления специализированных ФПИ.

1.2 Анализ рынка и патентной информации по функциональным пищевым ингредиентам с антиатеросклеротическим потенциалом

Информация об имеющихся российских и отечественных изобретениях, статьях, направленных на разработку ФПИ для профилактики АЗ, представлена в таблице 1.2.1.

Таблица 1.2.1 – Перечень изобретений, публикаций, в которых описываются ФПИ, ФПД с ААЗ потенциалом

№	Суть изобретения	Источник
1	Способ производства специализированного продукта для профилактики АЗ, ССЗ и коррекции метаболических нарушений. Продукт содержит глюкозу, корень солодки, пантогематоген сухой и витамин С	[38]
2	Создание композиции, содержащей пробиотические (<i>Bifidobacterium longum</i> R175, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R11, <i>L. helveticus</i> R52 и <i>L. plantarum</i> R1012, <i>Saccharomyces boulardii</i>) и пробиотические компоненты (лактоферрин, инулин, фруктоза), проявляющей иммуномодулирующее и противовоспалительное действие	[32]
3	Создание композиции для предотвращения закупорки кровеносных сосудов. Композиция состоит из кефира, карбоната магния, фолиевой кислоты, антоцианов, экстрактов растений (шафрана, женьшеня, корня кудзу, портулака, пории, дягиля и ядер персика), порошка коллагена кальция, дрожжей, обогащенных селеном, порошка ямса и черной сои, подсластителя, глиданта	[226]
4	Создание композиции из пробиотика (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>) и пребиотиков (лизозима, инулина, холина, йода, эйкозапентеновой и докозагесаеновой кислот) для нормализации работы микробиоты ЖКТ	[40]
5	Создание пробиотического препарата <i>Lactobacillus gasseri</i> , обладающего гипохолестеринемической, противовоспалительной и иммуномодулирующей активностью	[36]

Продолжение таблицы 1.2.1

№	Суть изобретения	Источник
6	Создание полибактериального препарата из <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>L. plantarum</i> и <i>L. helveticus</i> , обладающего противовоспалительной, иммуномодулирующей, гипохолестеринемической, антиоксидантной (АОА) и антигипертензивной активностью	[35]
7	Создание добавки из <i>Lactobacillus rhamnosus</i> для нормализации патологического липидного профиля	[31]
8	Создание пробиотической композиции из штаммов бактерий <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> для снижения уровня холестерина	[34]
9	Создание пробиотика из <i>Lactobacillus reuteri</i> и <i>Bifidobacterium breve</i> для снижения уровня холестерина	[41]
10	Применение штамма <i>Pediococcus acidilactici</i> для приготовления ФПД для профилактики АЗ	[224]
11	Выделение штамма <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , обладающего эффектом снижения уровня холестерина, формирование ФПД на его основе	[222]
12	Создание лекарственного средства, содержащего экстракт куркумы, для снижения образования атеросклеротических бляшек	[229]
13	Создание ААЗ композиции из американского женьшеня, сырой пиявки, многоцветкового горца, шалфея краснокорневищного, женьшеня ложного, трихозанта и гастродии высокой	[228]
14	Создание композиции для профилактики и лечения АЗ, состоящей из растительных компонентов (<i>Cyrtomium</i> , <i>Rhizoma polygoni cuspidata</i> , <i>Fallopia multiflora</i> , <i>Salvia miltiorrhiza</i> , <i>Angelica sinensis</i> , <i>Astragalus</i> , <i>Ginseng radix</i> , <i>Punica granatum</i> , <i>herba Cuspidra</i>)	[227]
15	Создание лекарственного препарата для профилактики и лечения АЗ путем регулирования баланса кишечной биоты. В состав препарата входят антоцианы черного кукурузного початка, флавоны <i>Mimosa pudica</i> , лоропетала китайского, танины листьев, куркумин	[225]
16	Изготовление препаратов с родиолой розовой для лечения АЗ	[223]
17	Создание СД, содержащей пробиотики (<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. rhamnosus</i>) и черноплодную рябину, для профилактики гипертонии, АЗ, капиллярного токсикоза, воспалений почек, заболеваний щитовидной железы и радиоактивного воздействия	[221]
18	Создание композиции, содержащей штамм <i>Lactobacillus reuteri</i> , для снижения уровня холестерина в крови	[33]
19	Сырная сыворотка, содержащая пробиотики (лактобактерии и дрожжи), регулирующих уровень липидов в крови	[81]
20	Использование <i>Bifidobacterium longum</i> АН 1362, созданных на его основе композиций, содержащих пребиотики в виде капсул, таблеток, порошка. Данные продукты используются для профилактики метаболического синдрома	[45]
21	Создание ФПД, состоящих из <i>L. fermentum</i> , кверцетина и ресвератрола, проявляющих способность нормализовать работу микробиоты ЖКТ и АОА	[207]

Представленные в таблице 1.2.1 объекты интеллектуальной собственности описывают композиции, содержащие пребиотики и/или пробиотики, и/или экстракты травяных растений (традиционно используемых в народной медицине). Следовательно, данные компоненты, проявляющие способность к снижению уровня холестерина, АОА, нормализации микробиоты ЖКТ, актуально использовать в качестве компонентов индивидуальных ФПД профилактической направленности.

1.3 Генетика и атеросклероз, функциональные пищевые ингредиенты с антиатеросклеротическим потенциалом

1.3.1 Гены, влияющие на развитие атеросклероза

Генетика питания – наука, которая изучает взаимосвязь питания и генетических особенностей, влияющую на здоровье потребителей [208]. Генетика питания подразделяется на нутригенетику, нутригеномику и эпигенетику [148; 209], то есть включает в себя классические исследования питания человека, взаимодействия генов и диеты, исследования на модели *in vitro* и *in vivo* с применением «omics» технологий [209]. В работе Е. А. Nagwa [144] выделены основные составляющие генетики питания: диета – важный фактор риска развития многих заболеваний; компоненты пищи прямо или косвенно влияют на геном (экспрессию генов, белков); от генетических особенностей потребителя зависит то, как влияет на его здоровье диета (определенные компоненты пищи); гены, на функционирование которых влияют компоненты пищи, – фактор риска возникновения, прогрессирования, тяжести ряда хронических заболеваний; ПП имеет профилактическую, лечебную направленность.

На метаболизм питательных веществ и реакцию организма на них, на развитие ряда заболеваний [122; 141; 142] оказывают влияние генетические особенности потребителя, в частности SNP генов [137; 195; 208].

Актуальны работы по полногеномному поиску ассоциаций (GWAS), связанных с поиском генов-кандидатов, участвующих в развитии АЗ, ИБС, ИМ. В работе J. Erdmann [308] показано, что 163 локуса связаны с ИБС на уровне полногеномной значимости после поправки Бонферрони. В работе Z. Chen [309] представлена информация о сопоставлении 321 генов с риском развития ИБС. В исследовании А. Н. Мешкова [16] секвенировали экзомы 58 пациентов, имеющих диагноз ИБС, острого нарушения мозгового кровообращения, с выраженным каротидным АЗ (стеноз более 50,0 %), с выраженным АЗ артерий нижних конечностей (стеноз более 50,0 %). Результаты показали, что в среднем у каждого участника исследования было выявлено ≥ 40 тыс. различных мутаций, но только около 10,0 % мутаций могут использоваться в качестве маркеров развития АЗ. В работе И. А. Скрипникова [57] представлены данные, полученные с помощью GWAS, о связи 163 локусов с ИБС, и факторами риска – сахарным диабетом, артериальной гипертензии, дислипидемия, абдоминального ожирения и т.п. Выявлены гены, связанные с дислипидемией, которые ассоциированы с повышением уровня холестерина в плазме крови. В работе И. А. Гончаровой [54] представлены гены, влияющие на предрасположенность к возникновению АЗ коронарных артерий – это гены, участвующие в метаболизме внеклеточного матрикса и процессах фиброгенеза, липидном обмене, функционировании иммунной системы и репарации ДНК.

На рисунке 1.3.1.1 представлен перечень генов, которые являются факторами риска развития АЗ [192; 264]. АЗ – мультифакториальное заболевание, в его развитии принимают участие гены, влияющие на воспалительные процессы (например, интерлейкины: *IL-1*, *IL-1Ra*, *IL-6*, *IL-10*; цитокины: *TNF- α* , *TNF-receptor*, *LTA*; молекулы адгезии: селектины, ICAM-I, VCAM-I, PECAM; хемокины: *CX3CR1*, *CCR5*, *CCR2*, *CXCL12*, *RANTES*, *MCP-1*, и т.д. [47; 78]), на образование пенистых клеток (*SR-A*, *PCSK9*, *LOX-1*, *ALDH2* и т.д. [23; 70]), на накопление холестерина макрофагами (*IL7R*, *IL7*, *TIGIT*, *CXCL8*, *F2RL1*, *EIF2AK3*, *TSPYL2*, *ANXA1*, *DUSP1* и *IL15* [39]), на накопление белка MMP12 (SNP рядом с геном *MMP12* на хромосоме 11q22.3) [166] на систему антиоксидантной защиты организма (*SOD*, *CAT*, *GPXI* и т.д. [53]), на метаболизм холестерина (*ABCA1*, *ABCG1*, *APOA*, *APOB*, *APOE*, *CETP*, *LIPC* и т.д.) и т. д. [69].



Рисунок 1.3.1.1 – Перечень генов, влияющих на развитие АЗ (ЛПНП – липопротеины низкой плотности, ЛПВП – липопротеины высокой плотности, ТГ – триглицериды, АРОА – липопротеин А)

Перспективно рассматривать гены, влияющие на пищевое поведение (пищевые привычки) человека, например, гены [5; 148; 189]:

– *CD36*, полиморфизмы (rs1761667, rs1049654, rs10499859, rs1527483, rs3211956) которого влияют на вкусовое восприятие (чувствительность) к жирам в пище [103; 194; 216; 265; 301];

– *FTO* (rs9939609), *GHRL* (rs34911341), *LEPR* (rs1137101), полиморфизмы которых влияют на чувство насыщения [7; 26; 48; 66; 116; 151; 236; 262];

– *MC4R*, полиморфизм rs17782313 которого влияет на регуляцию аппетита и чувство насыщения [93; 119; 134; 262];

– *GLUT2* (rs5400) и *TAS1R2* (rs12033832), полиморфизмы которых влияют на вкусовое восприятие сладкого [149; 150; 203; 272];

– *TAS2R38*, полиморфизм rs1726866 которого влияет на вкусовое восприятие горького [92; 267];

– *ADD1* (rs4961) и *CYP11B2* (rs1799998), полиморфизмы которых влияют на потребление поваренной соли [198; 234; 255; 266];

– *DRD2*, полиморфизм rs1800497 которого влияет на синтез дофамина и развитие зависимости к «заеданию» стресса [94; 153; 212];

– *CYP1A2* на потребление кофеина [117; 148].

Особую роль в метаболических нарушениях играют гены, участвующие в регуляции метаболизма ферментов первичной антиоксидантной защиты организма, и гены, принимающие участие в метаболизме липидов (холестерина) [240]. Так как избыточное содержание активных форм кислорода (АФК) является одной из причин развития АЗ [90].

Ген *GPx1* кодирует фермент глутатионпероксидазу 1 – GPx1, который является одним из важных антиоксидантов в организме – маркером защиты от окислительного стресса и развития ССЗ [154]. Активность GPx1 – сильный предиктор риска ССЗ [280]. Мутация в гене rs105045 приводит к замене пролина на лейцин, что снижает активность фермента, в результате чего возрастет риск развития ССЗ [143].

Ген *CAT* кодирует фермент каталазу – CAT, который участвует в детоксикации перекиси водорода. Известно, что мутация rs1001179 приводит к снижению активности фермента, следовательно, к увеличению риска окислительного стресса, развития АЗ [63].

Ген *MnSOD* кодирует фермент супероксиддисмутазу – MnSOD, который разлагает токсичные АФК до перекиси водорода, которую затем разлагает до воды и кислорода с помощью ферментов GPx1 и CAT в митохондриях [240]. Мутация в гене rs4880 приводит к замене аланина на валин, что способствует снижению активности фермента, следовательно, к риску развития АЗ [90; 199; 280].

Ген *ADRB3* кодирует β3-адренергический рецептор – ADRB3, расположенный в жировой ткани и участвующий в регуляции липолиза [277]. Известно, что замена триптофана на аргинин в ходе мутации rs4994 приводит к снижению экспрессии рецептора, в результате к потере сократительной способности рецептора с последующим усилением миокардиального фиброза и сердечной недостаточности [270].

Ген *PPARG* кодирует рецептор, индуцирующий пролиферацию клеточных органелл – пероксисом (PPARG), регулирующих транскрипцию различных генов, участвующих в обмене липидов, липопротеинов, углеводов и в воспалительных процессах организма [292]. Известно, что мутация rs1801282, приводящая к замене пролина на аланин, является маркером возникновения атеросклеротических бляшек [21; 91; 95; 185; 242; 243]. Так как ген связан с увеличением экспрессии

рецептора-мусорщика, который передает ЛПНП из крови в макрофаги, которые затем дифференцируются в пенистые клетки [243].

Ген *FABP2* кодирует белок, который обладает высоким сродством к насыщенным и ненасыщенным длинноцепочечным жирным кислотам (*FABP2*), то есть связывает жирные кислоты в кишечнике и способствует их активному транспорту через мембрану кишечной стенки [76]. Белок влияет на проницаемость кишечника и может стимулировать развитие АЗ. Полиморфизм rs1799883, связанный с заменой аланина на треонин, приводит к повышенному усваиванию жиров из пищи, к замедленному их метаболизму, следовательно, к риску развития ССЗ [1; 75; 146; 168; 241].

Отечественные и зарубежные исследования показали, что потребители с определенными генотипами (SNP) лучше/хуже реагируют на диету, что объясняет важность генетического тестирования для формирования персонализированных диетических рекомендаций [69; 148]. Проведенный обзор научных данных показал, что чаще всего гены, влияющие на развитие АЗ связаны с липидным фенотипом (с уровнями холестерина) и с антиоксидантной активностью.

1.3.2 Пробиотические компоненты с антиатеросклеротическим потенциалом

Микробиота ЖКТ – сообщество микроорганизмов, обитающих в ЖКТ, способных регулировать основные биологические процессы организма-хозяина за счет продуцирования БАВ. Так, метаболит N-оксид триметиламин (ТМАО) участвует в развитии АЗ за счет превращения макрофагов в пенистые клетки, следовательно, чем больше уровень ТМАО, тем выше риск развития ССЗ [210]. Снижение уровней ТМАО возможно за счет регулирования состава микробиоты, реализуемого путем систематического употребления пробиотиков и пребиотиков.

В ряде клинических исследований было выдвинуто положение о том, что изменения микробиоты кишечника играют важную роль в развитии ССЗ. Следовательно, положительное влияние пробиотиков на микробиоту, будет оказывать

профилактическое действие [20; 288]. Ученые доказали, что правильно подобранный пробиотический штамм снижает уровень холестерина в крови, за счет увеличения участия микроорганизмов кишечника в энтерогепатической циркуляции желчных кислот, снижения всасывания жиров из кишечника, ингибирования окисления ЛПНП и адсорбции холестерина в кишечнике. Пробиотики, проявляющие ААЗ действие, представлены в таблице 1.3.2.1.

Таблица 1.3.2.1 – Пробиотики, проявляющие АОА потенциал

Микроорганизм	Функция	Форма ПК	Модельный объект	Источник
<i>Akkermansia muciniphila</i>	Снижает воспалительные реакции, ингибирует пролиферацию и миграцию макрофагов, снижает уровень холестерина в крови	Биомасса пробиотика	Мыши с дефицитом аполипопротеина Е (АРОЕ)	[74]
	Снижение массы тела, снижение уровней общего холестерина и ТГ. Увеличение общей популяции В-клеток	Суспензия микроорганизмов	Самцы мышей E3L. СЕТР	[73]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Снижение кишечно-печеночной циркуляции солей желчных кислот, снижение биодоступности холестерина из рациона; снижение уровня, циркулирующего холестерина, ингибирование образования атеросклеротических бляшек	Пищевая добавка	Человек	[108]
	Снижение уровня холестерина ЛПНП	Пробиотик в капсуле	Человек	[77]
	Снижение уровня циркулирующего холестерина ЛПНП	Суспензия пробиотика	Крысы	[181]
	Улучшение функции эндотелия сосудов, уменьшение системного воспаления, снижение уровней общего холестерина и ЛПНП	Пробиотик в пищевой добавке «GoodBelly StraightShot» (NextFoods, Inc., США)	Человек	[180]

Продолжение таблицы 1.3.2.1

Микроорганизм	Функция	Форма ПК	Модельный объект	Источник
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Снижение уровня холестерина ЛПНП	Синбиотическая капсула, содержащая пробиотик и инулин	Человек	[179]
	Снижение уровня холестерина	Биомасса пробиотика	Мыши с нокаутом АРОЕ	[178]
<i>Lactobacillus rhamnosus, L. plantarum</i>	Снижение уровня циркулирующего холестерина ЛПНП	Суспензия пробиотика	Клетки Сасо-2 человека	[182]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Уменьшение размера атеросклеротических бляшек. Снижение уровня общего холестерина	Лиофилизированный порошок	Мыши	[158]
	Снижение концентрации провоспалительного цитокина IL1 β и уровней холестерина	Пробиотик в капсуле	Человек	[126]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Снижение уровня циркулирующего холестерина ЛПНП	Пробиотик в капсуле	Человек	[172]
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Положительное влияние на работу иммунной системы хозяина, изменение содержания АФК в сосудах, снижение уровня ТГ в крови	Суспензия пробиотика	Крысы	[292]
	Снижение уровня общего холестерина и ТГ в сыворотке крови	Обезжиренное молоко, ферментированное пробиотиком	Крысы	[218]
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Снижение уровня холестерина; снижение уровня провоспалительного цитокина IL-8	Пробиотический препарат	Клеточные линии Сасо-2 и НТ-29	[36]
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	Снижение уровня ТМАО	Биомасса клеток	Мыши	[253]
	Снижение уровня триметиламина толстой кишки	Пищевая добавка (пробиотик + глюкоза + инулин + декстрин + диоксид кремния)	Человек	[100]

Продолжение таблицы 1.3.2.1

Микроорганизм	Функция	Форма ПК	Модельный объект	Источник
<i>Enterococcus faecium</i>	Предотвращение снижения уровня ЛПВП	Суспензия пробиотика	Кролики	[129]
<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>	Снижение уровня общего холестерина в сыворотке, ЛПНП и ТГ; регулирование экспрессии генов <i>CYP8B1</i> , <i>CYP7A1</i> , <i>SREBP-1</i> , <i>SCD1</i> и <i>LDL-R</i>	Биомасса пробиотика	Крысы	[135]
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Регулирование метаболизма липидов, воспалительных процессов	Суспензия пробиотика	Крысы	[231]
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Снижение общего уровня холестерина	Пробиотики использовали при ферментации соевого молока	Эндотелиальные клетки пупочной вены человека	[285]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Снижение уровня глюкозы в плазме крови, инсулина в сыворотке крови, изменение уровней ЛПВП	Пробиотики входили в состав синбиотика, содержащего инулин	Человек	[68]
		Пробиотик в капсуле	Человек	[287]
<i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. helveticus</i>	Противовоспалительная, иммуномодулирующая, гипохолестеринемическая активность	Пробиотический препарат	Клеточные линии Сасо-2 и НТ-29	[35]
<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. kefirifaciens</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. kefirii</i> и <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Is-satchenkia orientalis</i>	Снижение экспрессии <i>CRP</i> , <i>VCAM-1</i> и <i>ICAM-1</i> , модулирование метаболизма липидов	Биомасса пробиотика	Кролики	[81]

ААЗ действие пробиотиков обусловлено поддержанием оптимального количества полезных представителей микробиоты в ЖКТ (модуляцией состава микробиоты), регуляцией микробных метаболитов, снижением уровня противовоспалительных цитокинов, общего холестерина, ЛПНП, уровня ТМАО и т.д. [128].

Для стимулирования жизнедеятельности пробиотиков используют пребиотики – вещества, представляющие собой перевариваемые и неперевариваемые углеводы, пищевые волокна. После перорального приема эти вещества проходят почти все верхние отделы ЖКТ интактными, не подвергаясь какому-либо процессу пищеварения. При достижении толстой кишки они становятся основным питательным субстратом для представителей нормальной микробиоты [32].

Важность нормального функционирования микробиоты ЖКТ, регулирующей общее здоровое состояние организма, способствует включению в ПП пробиотические, пребиотические компоненты, нормализующие качественный и количественный состав микробиоты.

1.3.3 Биологически активные вещества с антиатеросклеротическим потенциалом, растительные источники (hairy roots) для их выделения

К перечню продуктов, рекомендованных для профилактики ССЗ, относят фрукты и овощи, оливковое масло, орехи и т. д. Польза от употребления данных продуктов обусловлена содержанием в них биоактивных соединений: антиоксидантов (полифенолов, витаминов), пищевых волокон, микроэлементов, жирных кислот (омега-3) и т. п. [46; 211]. Среди перечисленных продуктов (помимо овощей и фруктов) перспективными источниками БАВ являются растительные объекты (лекарственные растения, растения, используемые в традиционной медицине и т. п.). В таблице 1.3.3.1 представлен перечень БАВ-кардиопротекторов растительного происхождения [294].

Таблица 1.3.3.1 – Перечень БАВ с АОА потенциалом

Вещество	Модельный объект	Функция	Источник
Байкалин	Клетки моноцитов человека THP-1	Влияние на накопление внутриклеточных липидов	[82; 254]

Продолжение таблицы 1.3.3.1

Вещество	Модельный объект	Функция	Источник
Байкалин	Самцы новозеландских кроликов	Лечение кроликов привело к уменьшению размеров атеросклеротических поражений и накоплению липидов в сонных артериях. Байкалин увеличивал экспрессию <i>PPARγ</i> и <i>LXRα</i> , влияя на сигнальный путь <i>PPARγ-LXRα</i> , который стимулирует экспрессию <i>ABCA1</i> и <i>ABCG1</i>	[82; 254]
Ресвератрол	Клетки моноцитов человека THP-1	Подавление экспрессии генов <i>LPL</i> и <i>SR-AII</i> в макрофагах, следовательно, повышение регуляции генов <i>ABCG1</i> и <i>ABCA1</i>	[98; 109; 191; 244; 258; 269; 296]
	Мыши с дефицитом APOE	Стимулирование утолщения стенки коронарных артерий и уменьшение участков атеросклеротического поражения аорты. Снижение количества CD4 ⁺ T-клеток в периферической крови, уменьшение экспрессии <i>CD25</i> и <i>CD44</i> . Повышение секреции IL-2, IL-10 и GF- β 1, снижение IL-6. Снижение уровня мРНК, белка Dnmt1 и Dnmt3b в CD4 ⁺ T-клетках	[257]
Экстракт виноградных косточек	Крысы с диабетом	Увеличение активности параоксоназы (PON1), защищающей ЛПНП от окисления	[284; 294]
Экстракты полифенолов красного вина (катехины)	Мыши с дефицитом Cbs	Снижение уровня гомоцистеина, повышение активности PON1	[130]
Куркумин	Клеточная линия гепатоцита Huh7	Индуктирование трансактивации PON1 в клетках Huh7	[114]
Липосомы, инкапсулирующие аторвастатин кальция и куркумин	Эндотелиальные клетки аорты человека (HAECs). Мыши с дефицитом APOE	Уменьшение атеросклеротического поражения. Подавление молекул адгезии (E-селектин и ICAM-1) и уровня липидов в плазме. Уменьшение образования пенистых клеток и секреция воспалительных факторов	[276]
Кверцетин	Мыши APOE3 И APOE4	Кормление обогащенными кверцетином диетами индуцировало экспрессию гена <i>PON1</i> в печени	[160]
	Макрофаги RAW264.7	Стимулирование аутофагии (снижение экспрессии <i>LC3-II/I</i> и <i>Beclin1</i>), ингибирование образования пенистых клеток	[250]

Продолжение таблицы 1.3.3.1

Вещество	Модельный объект	Функция	Источник
Кверцетин	Мыши с дефицитом АРОЕ	Регуляция экспрессии <i>PCSK9</i> , <i>CD36</i> , <i>PPARγ</i> , <i>LXRα</i> и <i>ABCA1</i>	[249]
	Мыши с дефицитом АРОЕ, мыши C57BL/6J	Снижение уровня общего холестерина, ТГ, ЛПНП. Снижение воспалительных факторов (TNF- α и IL-6)	[196]
Экстракт лука	Крысы линии Wistar	Повышение активности <i>PON1</i>	[171]
<i>Allium sativum</i> (чеснок)	Клеточная линия мышинных макрофагов RAW264.7	Сильная АОА	[111]
Экстракт чеснока	Самцы мышей с дефицитом АРОЕ	Уменьшение атеросклеротического поражения аорты, снижение концентрации общего холестерина и ТГ	[71]
Таншинон ПА (выделен из <i>Salvia miltiorrhiza</i> . Bunge (Danshen))	Мыши с дефицитом АРОЕ, которых кормили атерогенной (с высоким содержанием жиров) диетой, вводили таншинон ПА (90–120 мг/кг в день) через питьевую воду в течение 8 недель	Ингибирование атерогенеза (экспрессии молекул адгезии в эндотелии сосудов и пролиферацию гладкой мускулатуры)	[67]
Астрагалозид IV, содержащийся в <i>Astragalus membranaceus</i>	Крысы Sprague-Dawley с персистирующей ИМ	Уменьшение окислительного стресса за счет снижения уровня малонового диальдегида в крови, поддержание супероксиддисмутазы и снижения повреждения клеток миокарда	[136]
Экстракт черники	Мыши с дефицитом АРОЕ	Модулирование экспрессии генов, связанных с окислительным стрессом, воспалительными процессами, кодированием молекул адгезии, регуляцией ангиогенеза	[101]
Ягоды (черника, смородина, брусника, арония, малина)	Люди с факторами риска ССЗ	Снижение артериального давления, увеличение уровня ЛПВП, ингибирование функции тромбоцитов	[138]
Изолят рисового белка	Мыши с дефицитом АРОЕ	Увеличение экспрессии антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы	[120]

Продолжение таблицы 1.3.3.1

Вещество	Модельный объект	Функция	Источник
Брусника	Мыши с дефицитом АРОЕ	Снижение уровня ТГ и количества атеросклеротических бляшек. Усиление экспрессии <i>Cyp7a1</i> . Увеличение численности бактерий родов <i>Bacteroides</i> , <i>Parabacteroides</i> и <i>Clostridium</i> в слепой кишке	[186]
Пигментная фракция черного риса	Мыши с дефицитом АРОЕ	Снижение площади атеросклеротических поражений, уменьшение концентрации общего холестерина в сыворотке крови, в печени и аорте, увеличение содержания ЛПВП. Снижение уровня титр антител против OxLDL и уровень CD4 + Т-лимфоцитов, более низкая экспрессия белка iNOS и mPHK	[275]
Экстракты листьев шелковицы	Лимфоциты. Эндотелиальные клетки аорты человека	Ингибирование окислительного повреждения ДНК лимфоцитов. Ингибирование TNF- α -индуцированную адгезию моноцитов-эндотелиальных клеток. Снижение связывания моноцитов с клетками эндотелия аорты. Снижение экспрессии NF- κ B	[164]
Дельфинидин	Линия эндотелиальных клеток сосудов человека EA.hy926 и моноцитоподобные клетки человека (THP-1)	Ослабление индуцированной ox-LDL экспрессии молекул адгезии (P-селектин и ICAM-1) и адгезии моноцитов к эндотелиальным клеткам путем ингибирования пути ROS/p38MAPK/NF- κ B	[165]
Инулин	Самцы мышей с дефицитом АРОЕ	Уменьшение площади атеросклеротического поражения: снижение концентрации общего холестерина в плазме и содержания ТГ	[169]
	Пациенты с ХБП (хронической болезнью почек)	Снижение сывороточного инсулина, уровня глюкозы натощак, общего холестерина, триглицеридов, С-реактивного белка, гомоцистеина. Высокий уровень ЛПВП	[245]
	Самцы сирийского хомяка	Снижение общего холестерина в крови, уровня триацилглицерина. Изменения в профиле желчных кислот желчи желчного пузыря, стимуляция синтеза желчных кислот в печени	[298]
	Здоровые добровольцы	Снижение концентрации ТГ в плазме и печеночного липогенеза	[183]

Продолжение таблицы 1.3.3.1

Вещество	Модельный объект	Функция	Источник
Инулин, обогащенный олигофруктозой	Женщины с диабетом 2 типа	Снижение уровня общего холестерина, триглицеридов. Повышение уровня ЛПВП	[62]
Олигофруктоза	Самцы крыс Wistar	Снижение систолического артериального давления. Улучшение структуры и функции ЖКТ	[176]
Маннан	Самки мышей E3L.CETP	Уменьшение атеросклеротического поражения в области клапана корня аорты. Увеличение численности <i>Bacteroides ovatus</i> слепой кишки	[118]
Витамин А	Мыши с дефицитом APOE	Уменьшение концентрации холестерина в плазме, площади атеросклеротического поражения в синусе аорты	[302]
β -каротин, витамин А	Мыши с гомозиготным генетическим нарушением CMO1	Прием витамина А и каротиноидов минимизирует последствия нарушения метаболизма β -каротина, возникновения липидного гомеостаза	[110]
Ликопин	Крысы Sprague-Dawley	Снижение уровня общего холестерина, ЛПНП, ТГ. Повышение уровней ЛПВП	[175]
Витамин С	Мыши с дефицитом APOE	Хронический дефицит витамина С способствует возникновению и развитию атеросклероза (стимулирует развитие бляшек)	[202]
Ниацин (В3)	Самцы мышей с дефицитом APOE	Снижение уровня сывороточных воспалительных цитокинов. Подавление активности NF- κ B и апоптоза гладкомышечных клеток сосудов	[204]
Фолиевая кислота (В9) и В12	Люди с артериальной гипертензией	Прием фолиевой кислоты уменьшал риск ИС, не влияя на геморрагический инсульт	[167]
Порошок водоросли <i>Dunaliella</i> (богатый 9-цис- β -каротином)	Мыши с дефицитом APOE	Ингибирование прогрессирования АЗ (снижение уровня общего холестерина)	[246]
α -циклодекстрин	Мыши с дефицитом APOE	Изменение кишечной микробиоты (снижение количества бактерий <i>Clostridium</i> и <i>Turicibacterium</i> и увеличение <i>Dehalobacteriaceae</i>), влияющей на увеличение массы слепой кишки и снижение уровня холестерина	[121]
Белок люпина	Мыши с дефицитом APOE	Снижение кальцификации аорты	[190]

Продолжение таблицы 1.3.3.1

Вещество	Модельный объект	Функция	Источник
Экстракт имбиря	Мыши с дефицитом АРОЕ	Снижение уровня общего холестерина, ТГ, липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), ЛПНП. Снижение скорости биосинтеза клеточного холестерина в перитонеальных макрофагах	[152]
Экстракт <i>Humulus japonicus</i>	Клетки RAW 264.7. Мыши с дефицитом АРОЕ	Подавление экспрессии провоспалительных цитокинов (<i>TNF-α</i> , <i>IL-1β</i> и <i>IL-6</i>). Ингибирование инфильтрации моноцитов и макрофагов	[80]
Хлорогеновая кислота	Мыши с нокаутом АРОЕ	Уменьшение площади атеросклеротического поражения и расширения сосудов в корне аорты. Снижение уровня общего холестерина, ТГ и ЛПНП. Увеличение уровней экспрессии <i>PPARγ</i> , <i>LXRα</i> , <i>ABCA1</i> и <i>ABCG1</i>	[106]
Масло периллы (<i>Perilla frutescens</i>)	Мыши с нокаутом АРОЕ	Наблюдалось уменьшение размера поражения жировой полоски в синусе аорты. Усиление экспрессии <i>eNOS</i> и снижение экспрессии <i>iNOS</i> , <i>ICAM-1</i> и <i>VCAM-1</i>	[232]
Экстракта прополиса	Мыши с нокаутом АРОЕ	Уменьшение уровня общего холестерина, ТГ. Снижение уровня <i>IL-6</i> , <i>ET</i> (эндотелина), <i>VEGF</i> , <i>iNOS</i> , и повышение уровня <i>IL-17</i> , <i>eNO</i>	[133]
Глюкозид <i>Polygoni Multiflori Radix</i>	Мыши с нокаутом АРОЕ	Ингибирование образования бляшек. Подавления экспрессии <i>IL-6</i> , <i>TNF-α</i> , <i>VCAM-1</i> и <i>MCP-1</i> в сыворотке крови. Регуляция состава общей кишечной микробиоты	[162]
Берберин	Мыши с нокаутом АРОЕ	Уменьшение атеросклеротических поражений. Снижение общего уровня холестерина, ЛПНП, уровня провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли-альфа, интерлейкина <i>IL-1β</i> , <i>IL-6</i> и повышение уровня провоспалительного <i>IL-10</i> и адипонектина. Изменение структуры микробиоты кишечника. Сниженный потенциал продукции ТМАО	[123]
	Макрофаги THP-1	Способствует оттоку холестерина за счет увеличения образования АФК, что впоследствии вызывает аутофагию через сигнальный путь <i>PI3K/AKT/mTOR</i>	[99]

Часть вышеперечисленных БАВ является метаболитами растений, традиционно используемых в народной медицине различных стран. Кардиопротекторное действие данных веществ обусловлено их АОА (защищают ЛПНП от окисления), способностью подавлять экспрессию ряда генов (адгезии, воспаления и т. д.), регулировать состав, увеличивая количество полезных микроорганизмов и уменьшая количество патогенных видов микробиоты ЖКТ (востребованными являются инулин и фруктоолигосахариды) [14]. Особый интерес проявляют флавоноиды – полифенольные соединения, являющиеся вторичными метаболитами растений [286]. Большинство полифенолов проходит через тонкий кишечник, не всасываясь, следовательно, кишечная микробиота толстой кишки катализирует гидролиз гликозилированных флавоноидов в соответствующие агликаны, которые затем переносятся в эпителиальные клетки кишечника посредством пассивной диффузии, т.е. микробиота повышает биодоступность полифенолов. Часть флавоноидов обладает способностью модулировать состав микробиоты кишечника, т.е. проявлять пребиотические свойства [286].

Перспективными БАВ, проявляющих кардиопротекторные свойства, являются фенолы флавоноидного типа – байкалин и кверцетин, и фенол нефлавоноидного типа – хлорогеновая кислота.

Растения в качестве сырья для извлечения БАВ выбраны на основании данных полученных исследователями ФГБОУ ВО «КемГУ» в рамках выполнения ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» и государственного задания FZSR-2020-0006 «Скрининг биологически активных веществ растительного происхождения, обладающих геропротекторными свойствами, и разработка технологии получения нутрицевтиков, замедляющих старение». Полученные результаты показали, что: шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi.) оптимально использовать в качестве источника байкалина, левзею сафлоровидную (*Rhaponticum carthamoides* Пjin.) – хлорогеновой кислоты, копеечник забытый (*Hedysarum neglectum* Ledeb) – кверцетина [2; 15].

Шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi) – многолетняя трава, используемая в традиционной медицине Китая [64]. Основными флавоноидами растения являются байкалин, вогонозид и их агликоны (байкалеин, вогонин). Биосинтез флавоноидов в шлемнике байкальском отражен на рисунке 1.3.3.1 [64].

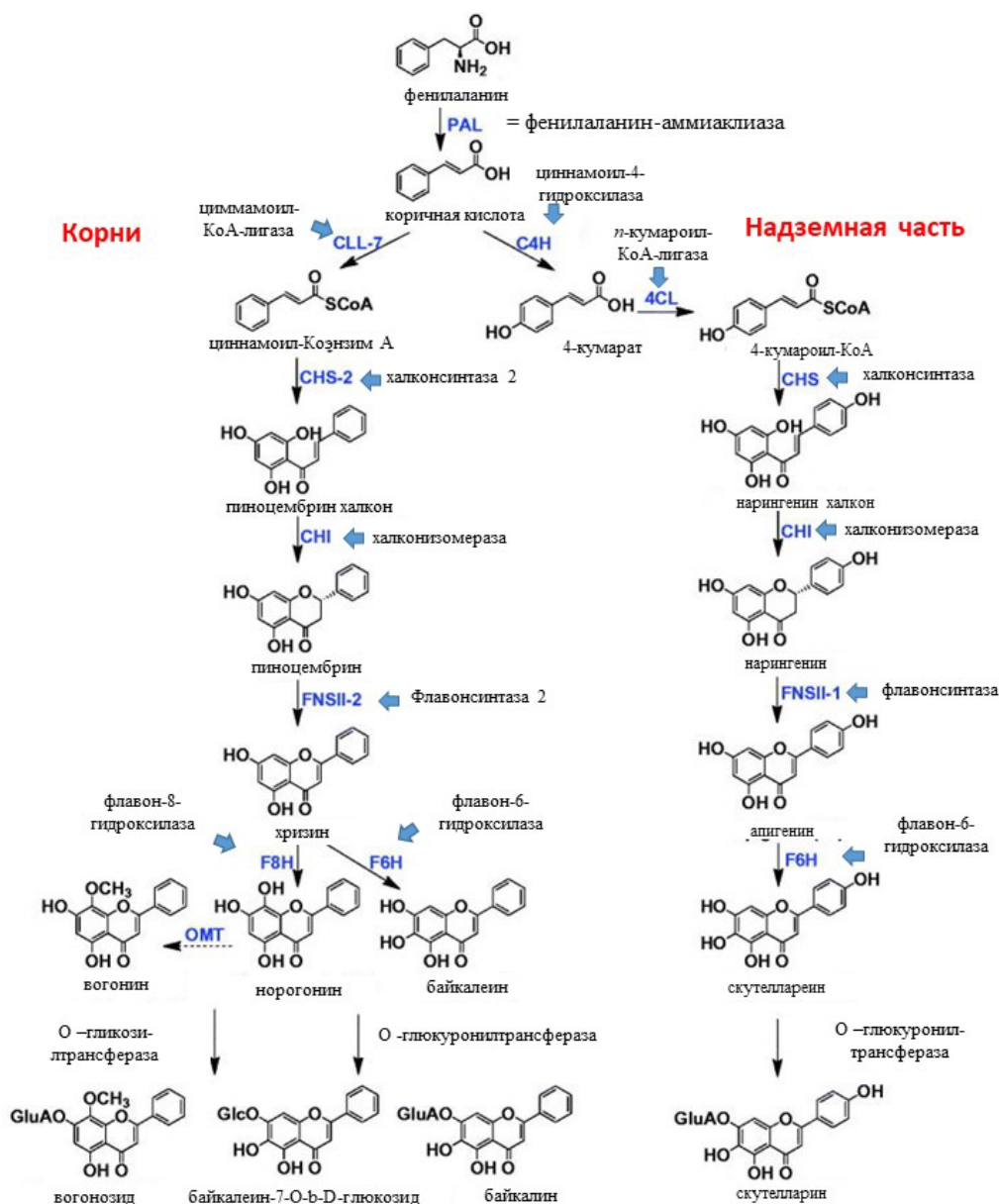


Рисунок 1.3.3.1 – Пути биосинтеза БАВ в корнях и надземных частях шлемника байкальского

Данные БАВ обладают широким спектром фармакологических свойств: антибактериальными, противовирусными, антиоксидантными, кардиопротекторными, нейропротекторными и т. д. [96; 200; 306]. Антимикробная активность водного экс-

тракта шлемника байкальского выражается в подавлении роста и жизнедеятельности *Streptococcus sanguis* II, *S. salivarius*, *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *Capnocytophaga*, *Bacteroides melaninogenicus* ss *intermedius*, *B. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* и *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [124], в способности ингибировать рост *Candida albicans* на 90,0 % при концентрации 2,5 мг/см³ [304]. Байкалин (5,6,7-тригидроксифлавоон, C₁₅H₁₀O₅) – наиболее распространенное соединение шлемника байкальского [64]. Байкалин проявляет антиоксидантную активность в отношении гидроксильного радикала, радикала DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) и алкильного радикала [140].

Левзея сафлоровидная (маралий корень, *Rhaponticum carthamoides* Пjin.) – многолетнее травянистое растение, широко использующееся в народной медицине России, Китая и Монголии. В 1969 г данное растение отнесли к адаптогенам, активным соединениям, повышающим устойчивость организма к физическим нагрузкам без увеличения потребления кислорода. БАВ растения проявляют нейропротекторное, гипохолестеринемическое, антидиабетическое, АОА, кардиопротекторное и прочие действия [127; 173; 238]. Основными БАВ растения являются фитостероиды, флавоноиды, фенольные кислоты и эфирные масла [297]. В работе E. Skała [260] показано, что hairy roots левзеи сафлоровидной содержат большее количество БАВ, в сравнении с корнями традиционного растения [289], например, хлорогеновой кислоты и 3,5-о-дикафеоилхиновой кислоты.

Хлорогеновая кислота (3-кофеилхинная кислота) – водорастворимое полифенольное соединение (фенольная кислота), вырабатываемое растениями посредством пути шикимовой кислоты во время аэробного дыхания. Биосинтез хлорогеновой кислоты зависит от трех ключевых ферментов: фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) / шикимовой кислоты / гидроксилцинамилтрансферазы хинной кислоты (HCT) и гидроксилтрансферазы циннамата хинной кислоты (HQT), пути синтеза хлорогеновой кислоты отражены на рисунке 1.3.3.2 [281].

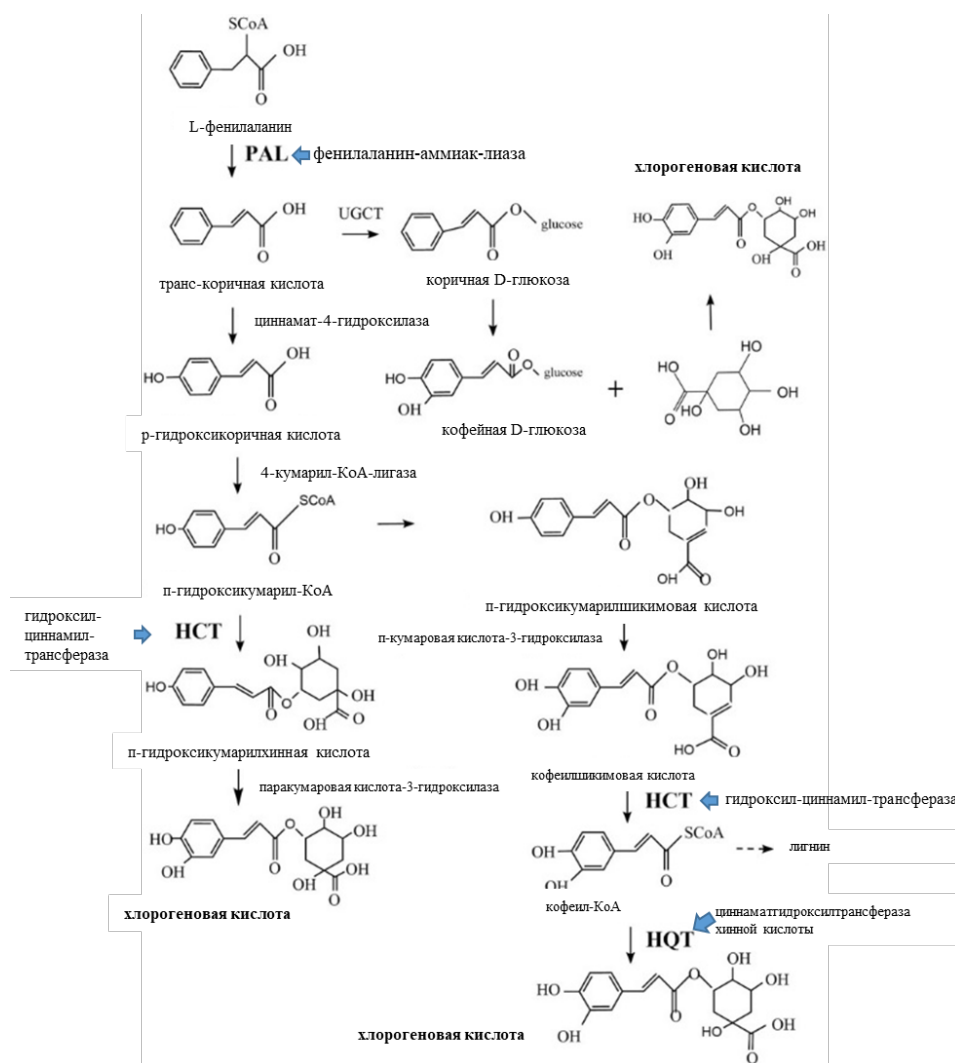


Рисунок 1.3.3.2 – Пути синтеза хлорогеновой кислоты из фенилаланина

Известно, что хлорогеновая кислота проявляет АОА, антибактериальную, противоопухолевую активность, способна регулировать метаболизм глюкозы и липидный обмен и т. д. Оказывает ингибирующее действие по отношению к пищевым возбудителям заболеваний *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* [281]. Воздействует на экспрессию ферментов и генов, связанных с метаболизмом глюкозы, улучшает чувствительность к инсулину; воздействует на гены и белки, связанные с метаболизмом жирных кислот, т. е. уменьшает отложение жирных кислот [107]. Оказывает прямое сосудорасширяющее действие через эндотелий-зависимый эффект, а основные задействованные пути включают синтазу оксида

азота (NOS), циклооксигеназу (COX) и супернатант эндотелиального происхождения. Проявляет пробиотические свойства [131].

Копеечник забытый (*Hedysarum neglectum* Ledeb.) относится к семейству Бобовые (включающему около 300 видов однолетних и многолетних трав [237]). В народной медицине известен как «красный корень», использующийся в качестве общеукрепляющего, противовоспалительного средства, для лечения заболеваний ЖКТ, ССЗ и т.п. Фармакологическая активность обусловлена содержанием полисахаридов, флавоноидов, катехинов, дубильных веществ, алкалоидов и т. д. [43; 58]. Перспективным метаболитом данного растения является флавоноид – кверцетин. В кишечнике кверцетин может расщепляться некоторыми кишечными бактериями (например, *Eubacterium oxidoreducens*, *Clostridium orbiscindens* и *Eubacterium ramulus*) [295]. Известно, что АОА и противовоспалительные свойства кверцетина тесно связаны с профилактикой и лечением ССЗ, ожирения и рака [4]. Кверцетин проявляет ингибирующее действие на рост условно-патогенных бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* [251].

Для сохранения биоразнообразия, экологической обстановки в качестве сырья для извлечения БАВ целесообразно использовать корневые культуры *in vitro* (бородатые / волосатые / косматые корни, генетически трансформированные корни или hairy roots) растений [22]. Hairy roots представляют собой дифференцированные культуры корней, полученные путем трансформации растения грамотрицательной палочковидной почвенной фитопатогенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes*. Генетическая трансформация клеток растений происходит из-за введения агробактерией транспортной ДНК (Ri (root-induced) T-DNA), кодирующей гены *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD* в геном растения. Данные гены модулируют гомеостаз ауксина, тем самым вызывают инициацию и пролиферацию hairy roots *in vitro* [239].

Методика получения hairy roots отражена в работе А.У. Stepanova [157]. Основные этапы получения hairy roots представлены на рисунке 1.3.3.3.

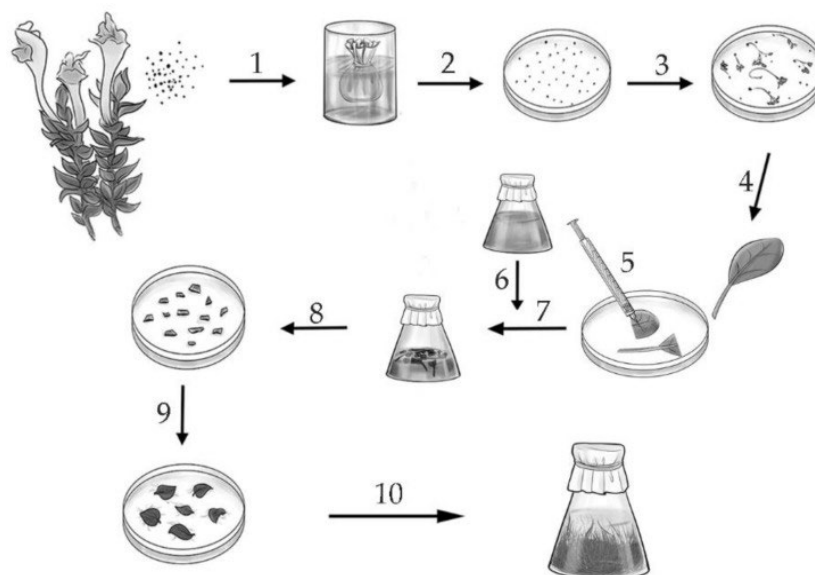


Рисунок 1.3.3.3 – Основные этапы выращивания hairy roots с помощью трансформации *Agrobacterium rhizogenes* (или *Rhizobium rhizogenes*): (1) – получение биоматериала; (2) – стерилизация семян; (3, 4) – проращивание семян на плотной питательной среде; (5) – повреждение эксплантов; (6) – приготовление суточной культуры *A. rhizogenes*; (7) – совместная инкубация эксплантов (семядолей) с суспензией *A. rhizogenes* в течение 12 ч; (8) – перенос эксплантов на твердую среду с цефотаксимом; (9) – образование волосовидных корней; (10) – рост волосовидных корней на жидкой питательной среде [157]

К преимуществам выращивания hairy roots относят: стабильность синтеза вторичных соединений; высокую скорость роста [22; 157]; генетическую стабильность, связанную с большей дифференциацией тканей и клеток, в сравнении с каллусными и суспензионными культурами [30].

Эффективным методом извлечения БАВ из hairy roots является экстракция [206]. Параметры экстрагирования целевых БАВ из корня и hairy roots шлемника байкальского отражены в таблице 1.3.3.2., для левзеи сафлоровидной в таблице 1.3.3.3, для копеечника забытого в таблице 1.3.3.4. В качестве экстрагента рассматривались нетоксичные, безопасные экстрагенты, в связи с этим предпочтение отдавалось водным растворам этанола, подходящих для целей пищевой промышленности [252].

Таблица 1.3.3.2 – Параметры экстракции сырья шлемника байкальского

№	Экстрагент	Гидромо- дуль	Температура	Продолжи- тельность	Дополнительно	Источ- ник	
1	метанол	10:1	23,0±2,0 °С	2,0 ч	Ультразвуковая обработка (УЗ) – 15,0 мин	[183]	
2	метанол	100:1	23,0±2,0 °С	3,0 ч		[157]	
3	водно-этанольный раствор	70,0 %	60,0±2,0 °С	1,0 ч		[2]	
4		70,0–80,0 %	10:1	23,0±2,0 °С	1,0–2,0 ч	Экстракции с об- ратным холо- дильником	[274]
5		60,0 %	30:1	60,0±2,0 °С	2,0 ч	[188]	

Таблица 1.3.3.3 – Параметры экстракции сырья левзеи сафлоровидной

№	Экстрагент	Гидромо- дуль	Температура	Продолжи- тельность	Дополнительно	Источ- ник	
1	метанол 80,0 %	30:1	35,0±2,0 °С	15,0 мин	УЗ – 15,0 мин	[87]	
2	водно-этанольный раствор	40,0 %	23,0±2,0 °С	1,5 ч	В аппарате Сокс- лета	[3]	
3		50,0 %		5:1		35,0 мин	[193]
4		50,0 %	20:1	70,0±2,0 °С	1,5 ч	УЗ – 15,0 мин	[215]
5		вода (70,0–85,0 °С)	100:1	75,0±2,0 °С	15,0 мин		[248]
6	вода (23,0±2,0 °С)	30:1	70,0±2,0 °С	УЗ – 15,0 мин, пе- ремешивание 120 об/мин		[105]	

Таблица 1.3.3.4 – Параметры экстракции сырья копеечника забытого

№	Экстрагент	Гидромо- дуль	Температура	Продолжи- тельность	Дополнительно	Источ- ник
1	водно-этанольный рас- твор	100:1	23,0±2,0 °С	2,0 ч	–	[12]
2				50,0 %		1,0 ч
3		20:1	60,0±2,0 °С	35,0 мин		
4		40:1	50,0±2,0 °С	1,0 ч		[305]

Установлено, что УЗ обработка является относительно простым методом «зеленой химии», механическое воздействие которого способствует диффузии (проникновения экстрагента в клетки сырья), разрушению клеточных стенок и ускорению вы-

хода их содержимого. То есть метод позволяет снизить продолжительность и температуру процесса экстракции БАВ (не изменяя / увеличивая выход экстракта) из растительного сырья, в сравнении с обработкой без УЗ [312; 313].

Для экстракции байкалина из шлемника байкальского целесообразно использовать следующие параметры экстракции: 70,0 %, 75,0 %, 80,0 % водно-этанольный раствор, гидромодуль 10:1, при температуре $23,0 \pm 2,0$ °С, продолжительностью 1,5 ч. Для экстракции хлорогеновой кислоты из левзеи сафлоровидной оптимально использовать – 40,0 % и 50,0 % водно-этанольный раствор, воду ($70,0 \pm 2,0$ °С), гидромодуль 30:1, при температуре $70,0 \pm 2,0$ °С, продолжительностью 1,5 ч. Для экстракции кверцетина из копеечника забытого – 50,0 %, 60,0 % и 70,0 % водно-этанольный раствор, гидромодуль – 40:1, при температуре $60,0 \pm 2,0$ °С, продолжительностью 1,0 ч. Сырье перед экстракцией необходимо обработать УЗ в течение 15 мин.

Для оценки биоактивности ФПИ необходимы доклинические и клинические исследования. На начальных этапах доклинические исследования можно проводить на различных модельных объектах *in vivo*. Результаты проведенного обзора научной литературы, посвященного модельным организмам, использующимся для оценки ААЗ потенциала, представлены в публикации [278]. На сегодняшний день перспективными модельными организмами являются нематоды. *Caenorhabditis elegans* – многоклеточный организм (свободноживущий безвредный круглый червь – нематода), обладающий рядом преимуществ [205; 219; 282]:

- расшифрованный геномом;
- схожие с человеком изменения в поведении и физиологических показателях здоровья (стрессоустойчивость, дегенерация нервной системы, изменения в структуре мышечной ткани);
- небольшой размер (около 1 мм) и прозрачное тело;
- простота культивирования и размножения;
- короткий жизненный цикл (около 3 недель).

Известно, что *C. elegans* используют для оценки метаболических заболеваний *in vivo*. Модельный организм применяли для оценки наличия/отсутствия гипергликемического эффекта через оценку накопления жира в теле [125; 187]; для

оценки антиоксидантного потенциала через оценку экспрессии генов антиоксидантной системы защиты организма [88; 89]. Следовательно, *C. elegans* актуальный модельный объект для оценки биоактивности ФПИ.

1.4 Заключение по литературному обзору

Контроль факторов риска – это основная, доступная экономически эффективная мера предотвращения развития ряда хронических заболеваний, а персонализация рациона – эффективная профилактическая мера. Одним из способов персонализации является разработка индивидуальных ФПИ и ФПД на их основе.

Для разработки персонализированного подхода в профилактике АЗ с использованием ФПД важно изучить отдельные факторы риска развития АЗ (генетические особенности – SNP, состояние здоровья и микробиоты ЖКТ).

Обзор литературных данных позволил выявить полиморфизмы генов, участвующих в развитии АЗ, таблица 1.4.1.

Таблица 1.4.1 – Полиморфизмы генов, влияющие на развитие АЗ

Ген (полиморфизм)		Генотип		
		norm/norm	norm/mut	norm/mut
Метаболизм липидов	<i>ADRB3</i> (rs4994) кодирует рецептор, влияющий на липолиз	ТТ (Trp/Trp)	ТС (Trp/Arg)	СС (Arg/Arg)
		норма	средняя активность рецептора, средний риск развития ССЗ	низкая активность рецептора, высокий риск развития ССЗ
	<i>PPARG</i> (rs1801282) кодирует рецептор, участвующих в обмене липидов, углеводов и в воспалительных процессах	СС (Pro/Pro)	СG (Pro/Ala)	GG (Ala/Ala)
		норма	средняя активность рецептора, средний риск развития ССЗ	низкая активность рецептора, высокий риск развития ССЗ
	<i>FABP2</i> (rs1799883) кодирует белок, связывающий липиды	GG (Ala/Ala)	GA (Ala/Thr)	AA (Thr/Thr)
		норма	средняя активность белка, средний риск развития ССЗ	низкая активность белка, высокий риск развития ССЗ

Продолжение таблицы 1.4.1

Ген (полиморфизм)		Генотип		
		norm/norm	norm/mut	norm/mut
Метаболизм ферментов антиоксидантной системы	<i>CAT</i> (rs1001179) вызывает снижение активности каталазы	СС	СТ	ТТ
		норма	средняя активность фермента	низкая активность фермента
	<i>MnSOD</i> (rs4880) связан с пониженной активностью супероксиддисмутазы	СС (Ala/Ala)	СТ (Ala/Val)	ТТ (Val/Val)
		норма	средняя активность фермента	низкая активность фермента
	<i>GPx1</i> (rs1050450) связан с пониженной активностью глутатионпероксидазы	СС (Pro/Pro)	СТ (Pro/Leu)	ТТ (Leu/Leu)
		норма	средняя активность фермента, средний риск развития ССЗ	низкая активность фермента, высокий риск развития ССЗ

Для обеспечения нормального функционирования микробиоты ЖКТ, для снижения негативных факторов, связанных с окислительным стрессом, с избыточным содержанием холестерина в крови перспективно использование следующих ФПИ:

- пробиотиков (*Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. helveticus*, *L. brevis*, *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium freudenreichii*, *P. troenii*, *P. shermanii*, *P. jensenii*, *S. thermophilus*);
- пребиотиков для стимулирования роста пробиотической составляющей (инулина, фруктоолигосахаридов);
- БАВ (полифенолов – байкалина, хлорогеновой кислоты, кверцетина).

Вышепредставленные ингредиенты проявляют ААЗ потенциал (снижают уровень холестерина, проявляют АОА, подавляют развитие патогенной и условно-патогенной микробиоты, стимулируют рост нормальной микробиоты ЖКТ и т. п.). В качестве сырья для извлечения целевых полифенолов актуально использовать биомассу hairy roots, выращиваемую с помощью биотехнологических методов *in vitro*: биомасса hairy roots шлемника байкальского для извлечения байкалина, hairy roots левзеи сафлоровидной – хлорогеновой кислоты и hairy roots копеечника забытого – кверцетина. Биоактивность ФПИ на начальных этапах доклинических исследований оптимально оценить с помощью исследований *in vitro* и *in vivo* (используя модельный организм *C. elegans*).

ГЛАВА 2 ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Организация выполнения работы и схема эксперимента

Реализация данной диссертационной работы проводилась на базе Лаборатории биотестирования природных нутрицевтиков ФГБОУ ВО «КемГУ». Общая схема исследования представлена на рисунке 2.1.1.

На первом этапе работы проведен анализ отечественных и зарубежных научных источников, посвященных ПП, поиску ФПИ с ААЗ потенциалом, биотехнологическим методам *in vitro* для получения hairy roots. Осуществлена приоритизация SNP генов, ассоциированных с АЗ. Выбраны ФПИ потенциально проявляющие ААЗ свойства. Сформулирована цель и задачи исследования. Выбрано растительное сырье, прорастающее на территории Сибирского федерального округа, которое трансформировалось агробактериями для получения hairy roots, содержащих значимое количество целевых метаболитов.

Экспериментальная часть работы состояла из пяти последовательных этапов. На втором этапе проведено изучение отдельных факторов риска развития АЗ (генетические особенности – SNP, состояние здоровья и микробиоты ЖКТ, вредные привычки) у жителей Кузбасса. Выделены группы повышенного риска развития АЗ для разработки персонализированного подхода в профилактике данного заболевания с использованием ФПИ. На третьем этапе подобраны параметры культивирования биомассы hairy roots. На четвертом этапе получены экстракты из биомассы hairy roots, проведена оценка их антиоксидантной активности (АОА), качественного и количественного состава полифенолов. На пятом этапе проводили выделение и очистку целевых БАВ из экстрактов, изучали их биофункциональные свойства *in vitro*, *in vivo*. На шестом этапе изучали пробиотические и ААЗ свойства молочнокислых бак-

терий, на основании которых формировались пробиотические консорциумы (ПК), синбиотические добавки (СД), ФПД с ААЗ потенциалом.

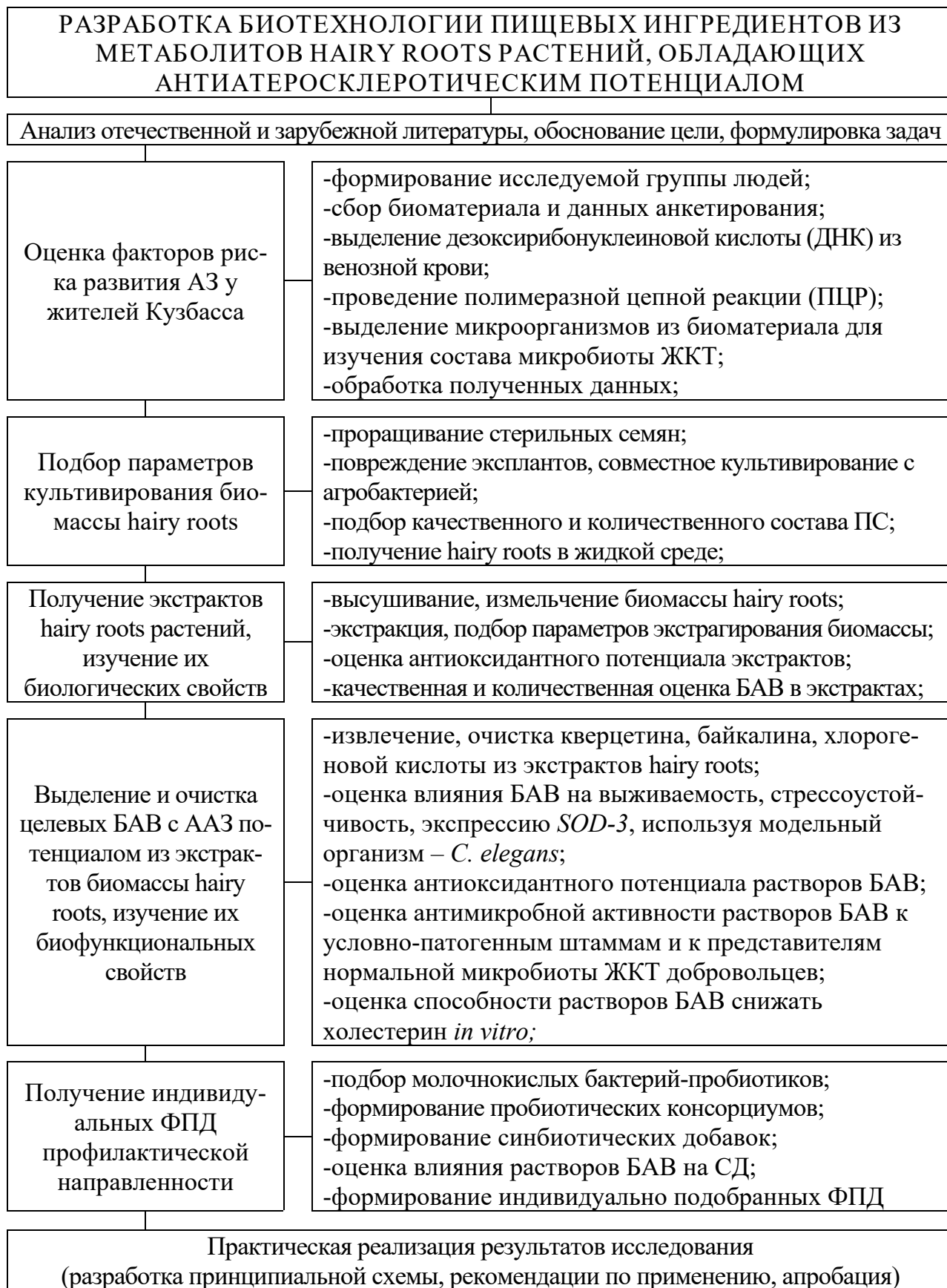


Рисунок 2.1.1 – Схема исследования данной работы

Проведенные исследования позволили разработать принципиальную схему получения индивидуальных ФПИ, ФПД профилактической направленности; сформировать рекомендации по применению разработанных ФПД в группах людей с повышенным риском развития АЗ.

Практическая реализация выражена в рецептурах и принципиальной схеме получения индивидуальных ФПД на основе комплекса биологически активных веществ, выделенных из экстрактов hairy roots растений. Технология получения индивидуальных ФПД апробирована промышленными предприятиями АО «Кемеровская фармацевтическая фабрика» (г. Кемерово), ООО НПО «Здоровое питание» (г. Кемерово).

2.2 Объекты исследования

Объектами исследования являлись:

- ДНК и представители микробиоты ЖКТ, выделенные из венозной периферической крови и фекалий, соответственно;
- штаммы молочнокислых бактерий коллекции ФГБУ «ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», таблица 2.2.1.

Таблица 2.2.1 – Перечень молочнокислых бактерий, выбранных для оценки пробиотических и ААЗ свойств, и их параметры культивирования

№	Название	Номер ВКПМ	Параметры культивирования (ПС, температура)
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	В-8634	MRS, 39–40 °С
2		В-3190	MRS, 37 °С
3		В-12025	MRS, 37 °С
4	<i>L. plantarum</i>	В-11007	MRS, 37 °С
5		В-5772	В-5772
6		В-2353	MRS, 30–37 °С
7	<i>L. fermentum</i>	В-7574	MRS, от 30 °С
8	<i>L. casei</i>	В-9227	MRS, от 30 °С
9	<i>L. paracasei</i>	В-6253	MRS, 37–39 °С

Продолжение таблицы 2.2.1

№	Название	Номер ВКПМ	Параметры культивирования (ПС, температура)
10	<i>L. helveticus</i>	В-8636	MRS, 39–41 °С
11	<i>L. brevis</i>	В-6338	MRS, 28–30 °С
12		В-2429	MRS, 37 °С
13		В-10903	MRS, от 30 °С
14	<i>Bifidobacterium animalis</i>	АС-1560	Бифидум-среда, 37 °С
15	<i>B. bifidum</i>	АС-1779	Бифидум-среда, 37 °С
16		АС-1579	Бифидум-среда, 37 °С
17	<i>Enterococcus faecium</i>	В-5000	MRS, от 37 до 44°С
18	<i>Propionibacterium freudenreichi</i>	В-9653	Бифидум-среда, от 30 °С
19		В-9654	Бифидум-среда, от 30 °С
20		В-5592	Бифидум-среда, от 37 °С
21	<i>P. troenii</i>	В-6083	Бифидум-среда, 28–30 °С
22		В-6080	Бифидум-среда, 28–30 °С
23	<i>P. shermanii</i>	В-4891	Бифидум-среда, 29–30 °С
24	<i>P. jensenii</i>	В-6085	Бифидум-среда, 28–30 °С
25	<i>Streptococcus thermophilus</i>	В-2011	M17, 40–43 °С
26		В-5392	Среда 229, от 37 °С

– штамм *Caenorhabditis elegans* N2 Bristol, предоставленный «Лаборатория разработки инновационных лекарственных средств и агробиотехнологий» ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»;

– пребиотики: фруктоолигосахариды – ФОС (Sigma F8052, ООО «КомплектСнаб», Россия), инулин (MP Biomedicals, ООО «Диаэм»);

– семена шлемника байкальского, левзеи сафлоровидной, копеечника забытого, из НПО «Сады России» (Челябинская область, Россия);

– полученная в ходе работы биомасса и экстракты на основе биомассы hairy roots шлемника байкальского, левзеи сафлоровидной, копеечника забытого;

– байкалин, хлорогеновая кислота и кверцетин, выделенные из экстрактов hairy roots шлемника байкальского, левзеи сафлоровидной и копеечника забытого, соответственно;

– разработанные ПК из молочнокислых штаммов, СД на основе ПК с добавлением пребиотиков, смесь ФПИ на основе СД с добавлением БАВ.

2.3 Характеристика исследуемой группы

Субъектами исследования являлись пациенты Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Кузбасский клинический кардиологический диспансер имени академика Л. С. Барбараша» (г. Кемерово). Выборка для исследования формировалась из общего числа лиц, добровольно согласившихся принять участие в данном исследовании (691 человек). Отбор осуществлялся по ряду критериев: национальность, наличие хронических заболеваний, пол, концентрация С-реактивного белка. В результате была отобрана исследуемая группа людей – 106 мужчин, схема отбора и характеристика выборки отражена на рисунке 2.3.1.

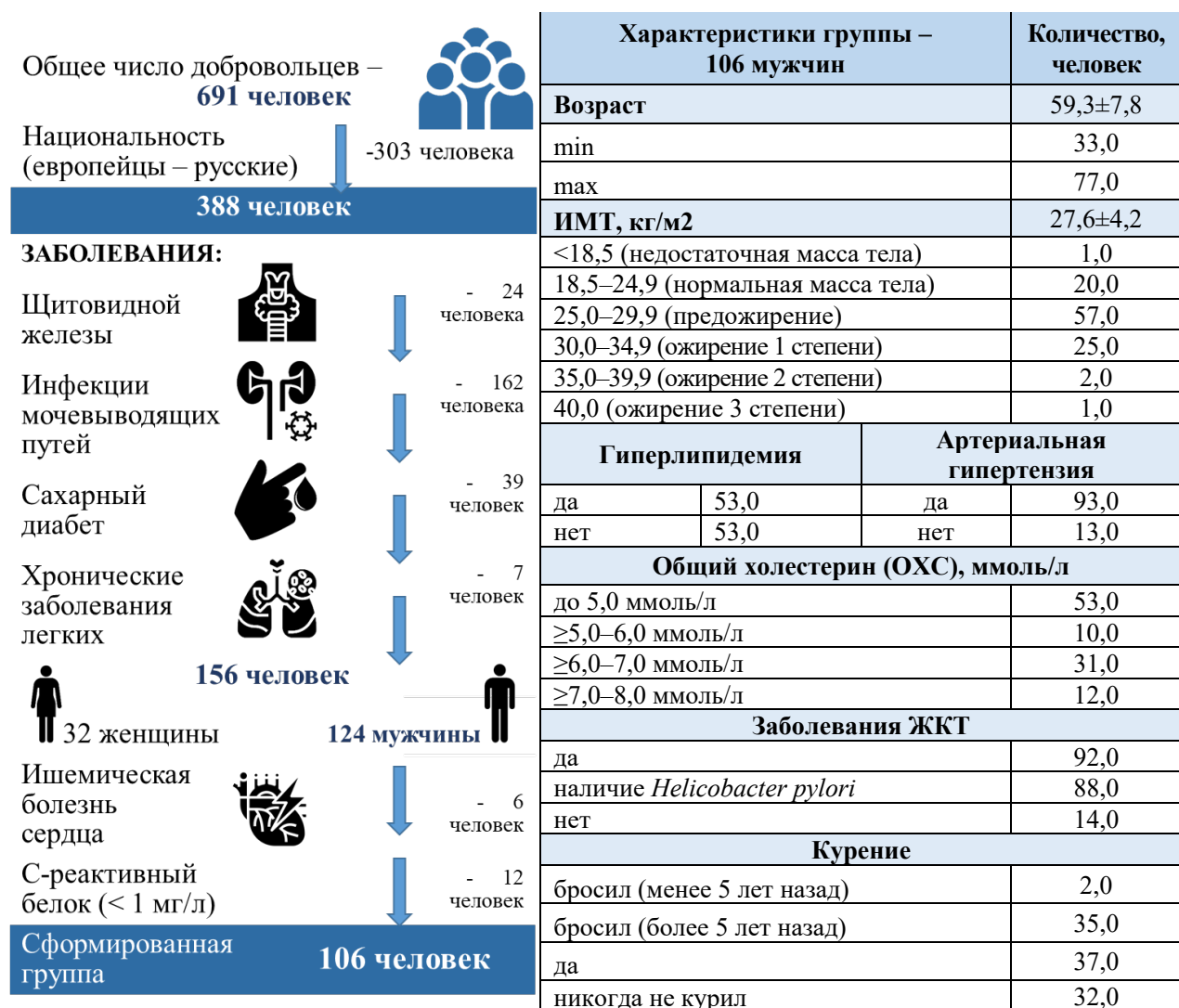


Рисунок 2.3.1 – Схема отбора и характеристика исследуемой выборки

Из общего числа добровольцев (691 человека) исключались пациенты, которые имели категорию высокого и очень высокого риска смертности от ССЗ (т.е. риск по Шкале Systematic COronary Risk Evaluation – SCORE выше 5,0 % [18]) и:

- хронические заболевания, представленные на рисунке 2.3.1;
- являлись женщинами в постменопаузе (средний возраст пациенток составлял $59,4 \pm 7,9$ лет);
- являлись мужчины, у которых в ходе эксперимента установлена ИБС.

Из отобранной группы (118 человек) исключались пациенты, у которых С-реактивный белок был не менее $1,0 \text{ мг/дм}^3$ (чтобы исключить наличие биомаркеров воспаления).

Сформированная исследуемая группа состояла из 106 мужчин, у которых имелся высокий и очень высокий риск по Шкале SCORE, не связанный с метаболическими заболеваниями, рисунок 2.3.1, которым помимо медикаментозного лечения необходимо скорректировать образ жизни – диетический рацион.

2.4 Материалы и методы исследования

Приоритизация генов, участвующих в формировании риска развития АЗ, осуществлялась при помощи программы ANDSystem. Программа использовалась для реконструкции и анализа молекулярно-генетических сетей на основе автоматизированного метода анализа текста [79].

У 106 добровольцев медицинским персоналом НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (г. Кемерово) собиралась венозная периферическая кровь, заполненная анкета (ПРИЛОЖЕНИЕ А), фекалии. Образцы венозной периферической крови собирались натощак в пробирки (в асептических условиях) с гепарином на $7,0 \text{ см}^3$ (ООО «ОМБ», Россия). После сбора крови плазму отделяли с помощью центрифугирования. Образцы до использо-

вания хранили в аликвотах при 80,0 °С ниже нуля. Выделение ДНК осуществляли фенол-хлороформным методом [197]. Количество выделенной ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США). Образцы ДНК хранили при 20 °С ниже нуля.

Генотипирование *CAT* (rs1001179), *MnSOD* (rs4880), *GPx1* (rs1050450), *ADRB3* (rs4994), *PPARG* (rs1801282), *FABP2* (rs1799883) выполнялось методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 Real-Time System («BioRad», США). Наборы для анализа SNP приобретены в компании ООО «НПФ Синтол» (Россия).

Методика выделения представителей микробиоты ЖКТ из фекалий представлена в работе [52], идентификация осуществлялась по МУ 2.3.2.2789-10 [25] и с помощью микробиологического анализатора VITEK 2 Compact (на картах для идентификации GP, ANC, GN, ООО «биоМерье Рус» (Россия).

Для культивирования штаммов использовались ПС: Рогоза (HjMedja Laboratories, Индия), Лактобакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), MRS (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), Бифидум (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), Блаурокка (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), M17 (HjMedja Laboratories, Индия), Vjfdobacterjum Agar (HiMedia Laboratories, Индия), агар Мюллера-Хинтона с добавлением 10 % дефибринированной бараньей крови и селективной добавки – Campylobacter Selective Supplement (HiMedia, Индия).

Для получения hairy roots использовали семена растений шлемника байкальского, левзеи сафлоровидной и копеечника забытого, приобретенные в НПО «Сады России» (Челябинская область, Красноармейский район, д. Шибаново). Семена шлемника байкальского стерилизовали путем выдерживания в течение 3,0 мин при 25,0±2,0 °С в концентрированной H₂SO₄, затем многократно промывали в стерильной дистиллированной воде и проращивали на твердой среде MS (1/2 концентрации) в темных условиях при 25,0±0,5 °С в течение двух дней [139]. Семена левзеи сафлоровидной и копеечника забытого стерилизовали в 5,0 см³ раствора (3,0 % перекиси водорода и 96,0 % этанола в соотношении 1:1) в течение 10,0 мин при 25,0±2,0 °С, затем многократно промывали стерильной дистиллированной во-

дой и переносили для проращивания в чашки Петри на твердую питательную среду MS в темных условиях при $25,0 \pm 0,5$ °C в течение двух дней [214]. Для получения каждого вида растения использовали 25,0–35,0 эксплантатов.

Проростки повреждали стерильной иглой и инкубировали в течение 24,0 ч в жидкой среде MS, содержащей суспензию *A. rhizogenes*.

Штаммы агробактерий, используемых в ходе работы, выращивали на среде YEB в течение 48,0 ч при $28,0 \pm 0,5$ °C [273], для заражения проростков использовали суспензию агробактерий с оптической плотностью при 600,0 нм 0,8–1,0 [72]. Состав среды YEB представлен в работе G. Vervliet [140].

Для трансформации эксплантов шлемника байкальского, левзеи сафлоровидной использовалась *Agrobacterium rhizogenes* ATCC A 4 [163; 261]; для копеечника забытого – *A. rhizogenes* ATCC 15834 [85]. Бактерии *A. rhizogenes* приобретены в коллекции СИФИБР СО РАН (Иркутск).

По истечении указанного времени инфицированные агробактериями проростки шлемника байкальского и копеечника забытого промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на твердые ПС, состав которых представлен в таблицах 2.4.1, 2.4.2 с добавлением 500,0 мг/л клафорана (Патеон Франс, Россия). Параметры культивирования – $25,0 \pm 1,0$ °C со 16,0 ч фотопериодом (холодные белые люминесцентные лампы). Экспланты пересаживали каждые трое суток до полной элиминации агробактерий – стерильность культивируемых корней проверяли путем инкубации образцов корней в жидкую среду YEB в течение 48,0 часов при $26,0 \pm 2,0$ °C. Появление первичных корней наблюдали через 14,0–28,0 дней после трансформации.

Первичные корни отделяли и пересаживали на агаризованную среду с 250,0 мг/л клафорана. Затем бородатые корни переносили в жидкую среду без антибиотиков и через каждые 3 недели – пересевали путем инокуляции сырой массы корней в конические колбы, содержащие жидкую ПС [157; 217; 273]. Растительный материал культивировали в темноте при $23,0 \pm 0,5$ °C на качалке со скоростью 90,0 об/мин.

Таблица 2.4.1 – Состав ПС, использующихся для выращивания hairy roots шлемника байкальского (состав на 1 дм³)

Компоненты	Питательная среда			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4 (контроль)
Макросоли В5, 20х, см ³	50,00	50,00	50,00	50,00
Микросоли В5, 20х, см ³	10,00	10,00	10,00	10,00
Fe-ЭДТА, см ³	5,00	5,00	5,00	5,00
Тиамин, мг	10,00	10,00	10,00	10,00
Пиридоксин, мг	1,00	1,00	1,00	1,00
Никотиновая кислота, мг	1,00	1,00	1,00	1,00
Сахароза, г	30,00	30,00	30,00	30,00
Инозит, мг	100,00	100,00	100,00	100,00
Кинетин, мг	–	1,00	2,00	–
6-БАП, мг	0,05	–	0,10	–
ИУК, мг	1,00	–	2,00	–
2,4-Д, мг	–	1,00	2,00	–
Агар, г	7,00	7,00	7,00	7,00

Таблица 2.4.2 – Состав питательных сред, использующихся для выращивания hairy roots копеечника забытого (состав на 1 дм³)

Компоненты	Питательная среда			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4 (контроль)
Макросоли В5, 20х, см ³	50,00	50,00	50,00	50,00
Микросоли В5, 20х, см ³	10,00	10,00	10,00	10,00
Fe-ЭДТА, см ³	5,00	5,00	5,00	5,00
Тиамин, мг	0,10	0,10	0,10	0,10
Пиридоксин, мг	0,10	0,10	0,10	0,10
Никотиновая кислота, мг	0,50	0,50	0,50	0,50
Сахароза, г	30,00	30,00	30,00	30,00
НУК, мг	1,00	2,00	–	–
6-БАП, мг	0,50	1,00	1,50	–
Агар, г	7,00	7,00	7,00	7,00

По истечению указанного времени инфицированные агробактериями проростки семян левзеи сафлоровидной промывали стерильной дистиллированной водой и пересаживали на твердую среду, состав которой отражен в таблице 2.4.3 с 500,0 мг/дм³ ампициллина. Экспланты пересаживали каждые трое суток до полной элиминации агробактерий. Образовавшиеся корни отрезали от эксплантов и переносили в конические колбы с жидкой питательной средой с

500,0 мг/ дм³ ампициллина. Культивирование осуществлялось в темноте на качалке при 80,0 об/мин. Через 7,0 дней корневые культуры пересаживали на новую жидкую среду с 250,0 мг/ дм³ ампициллина. Затем на жидкую среду без антибиотиков. Растительный материал культивировали при 23,0±0,5 °С на качалке со скоростью 90,0 об/мин, фотопериод равнялся 16,0 ч [132].

Таблица 2.4.3 – Состав ПС, использующихся для выращивания hairy roots левзеи сафлоровидной (состав на 1 дм³)

Компоненты	Питательная среда			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4 (контроль)
Макросоли MS, 20х, см ³	50,00	50,00	50,00	50,00
Микросоли MS, 20х, см ³	1,00	1,00	1,00	1,00
Fe-ЭДТА, см ³	5,00	5,00	5,00	5,00
Тиамин, мг	0,10	0,10	0,10	0,10
Пиридоксин, мг	0,50	0,50	0,50	0,50
Никотиновая кислота, мг	0,50	0,50	0,50	0,50
Сахароза, г	30,00	30,00	30,00	30,00
Гидролизат казеина, мг	500,00	500,00	500,00	500,00
Инозит, мг	100,00	100,00	100,00	100,00
Кинетин, мг	–	2,00	1,00	–
6-БАП, мг	–	0,50	–	–
ИУК, мг	–	–	2,00	–
НУК, мг	–	3,00	–	–
Агар, г	7,00	7,00	7,00	7,00

Состав среды MS – Мурасиге-Скуга представлен в работе Т. Murashige и F.Skoog [201], среды B5 (среда Гамборга) в работе О. L. Gamborg [145]. По данным литературного обзора целесообразно использовать соотношение инокулянт : питательная среда – 1:100, а соотношение объемов колбы и среды 5:1 [157; 217; 273].

Контролем являлись экспланты, раненные стерильной иглой, но которые не инфицировались агробактериями. Также контролем являлись инфицированные экспланты, культивированные на питательных средах без добавления гормонов. Все эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Активность роста корней оценивали по разнице между их массой в конце и в начале культивирования, т.е. определяли индекс роста (I), который рассчитывали по формуле 2.3.1 [157]:

$$I = \frac{X_{\max} - X_0}{X_0}, \quad (2.4.1)$$

где X_{\max} – масса в конце цикла культивирования, г;

X_0 – масса в начале культивирования, г.

Для проведения молекулярно-генетической оценки полученных hairy roots (для выявления интеграции Т-ДНК плазмиды Ri в трансформированные корни (ген *rolB*) из биообразцов выделялась суммарная геномная ДНК. Для выделения ДНК использовали коммерческий набор «ДНК-ЭКСТРАН-3» (ООО «НПФ Синтол», Россия). ПЦР анализ осуществлялся на амплификаторе ДНК ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Для амплификации гена *rolB* использовались праймеры и определенные параметры амплификации, представленные в работе R. K. Tiwari [72] и A. Stojakowska [273] (таблица 2.4.4).

Таблица 2.4.4 – Параметры амплификации

Праймер № 1	5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA-3'
Праймер № 2	5'-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC-3'
Параметры	денатурация 3,0 мин при 94,0 °С, 30,0 циклов амплификации: 50,0 с плавления при 94,0 °С, 1,0 мин отжиг при 53,0 °С, 1 мин элонгация при 72,0 °С, окончательная элонгация в течение 10,0 мин при 72,0 °С

Нетрансформированную ДНК проростков исследуемых растений использовали в качестве отрицательного контроля для ПЦР-анализа. Продукты ПЦР (амплифицированную ДНК) анализировали с помощью электрофоретического разделения на 1,0 % агарозном геле и визуализировали в ультрафиолете после окрашивания бромистым этидием. Комплекс, состоящий из смеси А и В для амплификации, праймеры были заказаны в ООО «НПФ Синтол», Россия.

Для разделения hairy roots от культуральной жидкости использовали фильтрование через стерильный бумажный фильтр («Желтая лента» ГОСТ 12026-76

(«Экохим», Россия) с помощью воронки Бюхнера под вакуумом. Биомассу hairy roots высушивали до постоянного веса в потоке воздуха при $30,0 \pm 0,5$ °С в сушильном шкафу (ШСВЛ-80 – «Касимов» («Касимовский приборный завод», Россия). Высушенная биомасса измельчалась в мельнице марки ЛЗМ-1М («Олис», Россия), просеивалась через сито с отверстиями 1,0–3,0 мм.

Экстрагирование растительного материала осуществлялось на водяной бане марки ПЭ-4310 (Россия, ЭКРОСХИМ) с обратным холодильником. УЗ обработку осуществляли с помощью ультразвуковой ванны Stegler 3DT («STEGLER», Китай) при частоте ультразвука 40,0 кГц. С помощью фильтрации, используя стерильный бумажный фильтр («Желтая лента» ГОСТ 12026-76 («Экохим», Россия) и воронку Бюхнера под вакуумом, экстракт отделяли от осадка растительного материала.

АОА полученных экстрактов оценивалась с помощью метода обесцвечивания катион-радикала 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) «ABTS •+» [86] на спектрофотометре UV 1800 («Shimadzu», Япония):

1) Реактив ABTS («AppliChem GmbH», Германия) растворяли в воде до концентрации 7,0 мМ (0,18011 г в 50,0 см³ воды, в мерной колбе).

2) Катион-радикал ABTS («ABTS •+») был получен реакцией исходного раствора ABTS с 2,45 мМ персульфата калия (0,03311 г в 50,0 см³ воды, в мерной колбе) и выдерживанием смеси в темноте при комнатной температуре в течение 12,0–16,0 часов перед использованием. Смешивали в соотношении ABTS : персульфат – 2:1.

3) Раствор «ABTS •+» разбавляли этанолом до значения оптической плотности $0,70 \pm 0,02$ при 734,0 нм.

4) Для изучения АОА смешивали 3,0 см³ «ABTS •+» с 30,0 мм³ раствора образца (соотношение 100:1).

Контроль для определения плотности «ABTS •+» – чистый растворитель. Контроль для образцов – «ABTS •+» без антиоксиданта. Для расчета АОА использовали формулу (2.4.2).

$$AOA (\%) = \frac{A_{ABTS} - A_x}{A_{ABTS}} \times 100 \%, \quad (2.4.2)$$

где A_{ABTS} – оптическая плотность исходного раствора ABTS;

A_x – оптическая плотность раствора ABTS + исследуемый образец.

Полученные результаты АОА сравнивали с активностью растворов витамина С (контроля) различной концентрации.

Для оценки качественного и количественного содержания полифенолов в экстрактах hairy roots использовали высокоэффективный метод жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором Shimadzu SPD20МА, колонкой Phenomenex Gemini C-18 250x4,6 мм («Shimadzu», Япония).

Образцы экстрактов hairy roots шлемника байкальского предварительно разбавляли водой – гидромодуль 10:1, левзеи сафлоровидной без разбавления пропускали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм («Membrane Solutions, LLC», США) в виалу для анализа. Образцы экстрактов hairy roots копеечника забытого предварительно высушивали в вакууме на роторном испарителе ИКА RV 8 («ИКА®-Werke GmbH & Co. KG», Германия) при температуре $45,0 \pm 0,5$ °С до сухого остатка. К навеске сухого экстракта массой $1,0 \pm 0,05$ г добавляли $10,0 \pm 0,01$ см³ 1,5 М раствора HCl. Полученную смесь ставили на кислотный гидролиз в течение $60,0 \pm 0,5$ мин с обратным холодильником на водяной бане ($95,0 \pm 5,0$ °С). Далее смесь нейтрализовали до pH=7,0 путем добавления раствора NaOH, фильтровали через бумажный фильтр «Желтая лента» ГОСТ 12026-76 («Экохим», Россия), далее через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм («Membrane Solutions, LLC», США).

Режим хроматографирования для всех образцов градиентный. Компоненты подвижной фазы: ацетонитрил, изопропиловый спирт, вода деионизированная с добавлением ортофосфорной кислоты до pH=3,5. Объем инъекции 20,0 мм³, скорость элюирования 0,8 см³/мин, температура колонки 30,0 °С. Количественное содержание определено методом абсолютной градуировки с

использованием стандартов чистотой 98,0 %: скутеллареин, байкалин, скутеллареин, необайкалеин, вогонин, галловая кислота, кверцетин, протокатеховая кислота, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, рутин, феруловая кислота, экдизон, кемпферол, ороксиллин А («Sigma-Aldrich», США).

Количественный анализ исследуемых полифенолов проводился с помощью калибровочных кривых, построенных в диапазоне концентраций 1,9–235,0 мкг/см³. Уравнение калибровочных кривых отражено в формуле 2.4.3.

$$y = a \cdot X, \quad (2.4.3)$$

где X – концентрация стандарта (мкг/см³);

y – соответствующая площадь пика по результатам ВЭЖХ (у.е.);

a – коэффициент пропорциональности.

Формула 2.4.4 связывает площадь пика с единицей сухой массы.

$$C = \frac{S}{a \cdot m \cdot 1000}, \quad (2.4.4)$$

где C – содержание флавоноидов в навеске сухого материала (мг/г);

m – масса сухого материала (г);

a – коэффициент пропорциональности из уравнения калибровочной кривой; коэффициент 1000 необходим для перевода C в размерность мг/г.

Для упаривания экстрактов использовался роторный испаритель ИКА RV 8 («ИКА®-Werke GmbH & Co. KG», Германия), сорбент – сефадекс LH-20 («GE Healthcare», США), порошковый активированный уголь («Panreac», Испания).

Для выделения и очистки хлорогеновой кислоты сухой остаток на силикагеле помещали на хроматографическую колонку размером 30x150 мм, предварительно упакованную целлюлозой микрокристаллической («Lachema», Чехия); элюция осуществлялась с применением хроматографа низкого давления BioLogic (BioRad). Для достижения чистоты не менее 97,0 % проводилась препаративная тонкослойная хроматография (ТСХ). Препаративную ТСХ осуществляли на пластинах Sorbfil ПТСХ-П-В («Labtex», Россия).

Идентификация выделенных БАВ осуществлялась с помощью:

1. Спектрофотометрических исследований, которые проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Санкт-Петербург, Россия); ИК-спектроскопию выполняли на приборе ФСМ-1202 («Инфраспек», Санкт-Петербург, Россия). Спектры ИК регистрировали в дисках бромида калия («Fluka», Германия). Обработку результатов осуществляли с использованием прибора «ПО FSрес 4.0.0.2». Запись спектров проводили в диапазоне 4000,0–400,0 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹.

2. ВЭЖХ, совмещенной с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС). Анализ проводился на хроматографе *Waters Aquity UPLC* (*Waters, США*), оснащенном гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (*Waters, США*). Проба в объеме 1,0 мм³ будет наносилась на колонку ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50×2,1 мм, 1,7 мкм; *Waters, Ирландия*). Температура колонки равнялась 40,0 °С, объемная скорость потока подвижной фазы – 0,4 см³/мин. В качестве подвижной фазы использовался 0,1 % (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0,1 % (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). Хроматографическое разделение веществ проводилось в режиме градиентного элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы изменялся следующим образом (растворитель Б, % по объему): 0,0–1,0 мин – 15,0 %; 1,0–5,0 мин – 15,0→30,0 %; 5–15 мин – 30,0→38,0 %; 15,0–15,5 мин – 48,0→45,0 %; 15,5–23,0 мин – 45,0 %; 23,0–23,5 мин – 45,0→95,0 %. Анализ осуществлялся в режиме детектирования положительных ионов (диапазон *m/z* 100–1200). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации – 120,0 °С, температура десольвации – 250,0 °С напряжение на капилляре – 3,0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы – 30,0 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) 600 дм³/час. Обработка полученных результатов будет производиться с помощью программы MassLynx (*Waters, США*).

Оценка биоактивности исследуемых БАВ, выделенных из экстрактов hairy roots растений, осуществлялась на модельных организмах – немато-

дах *C. elegans*. Для исследования готовили стоковые растворы БАВ в диметилсульфоксиде (ДМСО) концентрацией 10 мМ. Затем получали растворы концентрацией 2000 мкМ, 1000 мкМ, 500 мкМ и 100 мкМ (в дистиллированной воде). Данные растворы в количестве 15,0 мм³ добавляли в лунки планшета, тем самым получая тестируемые растворы БАВ концентрацией 200 мкМ, 100 мкМ, 50 мкМ и 10 мкМ.

Для получения синхронизированных личинок по возрасту 5,0–10,0 беременным взрослым особям давали откладывать яйца на чашках со средой для роста нематод (NGM) в течение 3,0 ч, с последующим удалением взрослых особей. Чашки с яйцами обрабатывали водным раствором NaClO (соотношение соль:вода – 1:5). Яйца культивировали на S-среде при 20±0,2 °С до вылупления. Полученных синхронизированных червей стадии L1 помещали на стандартные чашки с агаром NGM с *Escherichia coli* OP50 и инкубировали до личиночной стадии L4 [235].

Среда NGM имеет следующий состав на 1,0 л воды: 2,5 г бактопептона + 3,0 г NaCl + 17,0 г бактоагара. Смесь автоклавировали при 120,0 °С в течение 15,0 мин, затем добавляли 1,0 см³ 1,0 М раствора CaCl₂ + 1,0 см³ 1,0 М раствора MgSO₄ + 1,0 см³ 5,0 мг/см³ холестерина + 25,0 см³ K₂HPO₄ + KH₂PO₄.

S-среда имеет состав на 1,0 л S базовой среды: 10,0 см³ 1,0 М цитрата калия + 10,0 см³ раствора металлов. Состав S базовой среды: 5,85 г NaCl + 1,0 г K₂HPO₄ + 6,0 г KH₂PO₄ + 1,0 см³ холестерина в 1,0 л воды. Состав раствора металлов: в 1,0 дм³ воды растворить 1,86 г ЭДТА натрия + 0,69 г FeSO₄×7H₂O + 0,2 г MnCl₂×4H₂O + 0,29 г ZnSO₄×7H₂O + 0,025 г CuSO₄×5H₂O + 3,0 см³ 1,0 М CaCl₂ + 3,0 см³ 1,0 М MgSO₄.

Штамм *E. coli* OP50 использовался в качестве пищи для нематод, предоставлен институтом молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН (Москва, Россия). Для получения стартовой культуры штамма *E. coli* OP50 одну колонию выращивали в 5,0 см³ среды LB («AppliChem GmbH», Германия) в течение 12,0±0,5 ч при 37,0±0,5 °С при интенсивном перемешивании (120,0 об/мин).

Синхронизированные личинки стадии L4 переносили на чашки с агаром NGM, содержащую суспензию *E. coli* OP50 при $20,0 \pm 0,5$ °C, 3,0 суток. По истечению указанного времени личинки находятся в стадии L4, к которым добавляют $0,5 \text{ мг/см}^3$ 5-fluoro-2-deoxyuridine (FUdR) – вещества, подавляющего репродуктивную функцию нематод, что устраняет возможность получения смешанной популяции червей. После культивирования в течение 1,0 дня при $20 \pm 0,5$ °C червей переносили в жидкую питательную среду – S-среду. Эксперименты ставили в 96-луночных планшетах с плоским прозрачным дном (TPP, Швейцария), в которые вносили $150,0 \text{ мм}^3$ суспензии из нематод и *E. coli* OP50 (концентрация бактерий в суспензии $0,5 \text{ мг/см}^3$), и $15,0 \text{ мм}^3$ исследуемых растворов БАВ различной концентрации [113; 303].

Для оценки продолжительности жизни планшеты с нематодами ставили на культивирование при $20,0 \pm 0,5$ °C в течение 61,0 дня. Для оценки влияния растворов БАВ на стрессоустойчивость *C. elegans* к окислительному стрессу в каждую лунку планшета добавляли $15,0 \text{ мм}^3$ 1,0 М параквата (вещества, моделирующего окислительный стресс) и продолжали культивирование при $20,0 \pm 0,5$ °C в течение 48,0 ч с шагом в 6,0 ч. После истечения вышеуказанного времени делали подсчеты живых и мертвых нематод. Оценка осуществлялась с помощью микроскопа Axio Observer Z1 (Karl Zeiss, Германия). Критерием наступления смерти нематод считали полное отсутствие двигательной активности при воздействии на них ярким светом пучка света микроскопа. Нематоды, страдающие внутренним вылуплением (вылуплением зародышей внутри взрослого гермафродита), которые вырвались из чашек, подвергались цензуре (удалением из эксперимента). Эксперименты проводили в стерильных условиях бокса UVC/T-AR (ООО «BioSan», Латвия). Более подробно методика оценки продолжительности жизни и стрессоустойчивости, состав питательных сред и т. п. представлены в работе F. R. Amrit [282].

Для оценки уровня экспрессии гена *SOD-3* использовали 24-луночный планшет, в который вносили $900,0 \text{ мм}^3$ суспензии нематод стадии L1 и $100,0 \text{ мм}^3$ раствора БАВ. Планшет оставляли на 72,0 часа при $20,0 \pm 0,5$ °C до достижения

нематодами стадии развития L4, затем планшет помещали в инкубатор на $35,0 \pm 0,5$ °C на 5,0 часов. По истечению указанного времени планшет остужали на льду, содержимое лунки переносили в пробирку типа Эппендорф, центрифугировали 2,0 мин при 1000,0 g для удаления надосадочной жидкости. Полученный осадок немедленно замораживали при $86,0$ °C ниже нуля до выделения рибонуклеиновой кислоты (РНК). Выделения РНК из нематод проводили с использованием набора «Extract RNA» и в соответствии с инструкцией производителя («Евроген», Москва). Качество выделенной РНК оценивали на приборе для измерения концентрации РНК Nanodrop 2000C (Thermo Scientific, США). Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием набора реактивов «MMLV RT kit», в соответствии с инструкцией производителя («Евроген», Москва). Амплификацию РНК проводили на приборе CFX96 RealTime System (BioRad, США) на основе одноэтапного подхода с использованием реакционной смеси 5X qPCRmix-HS SYBR, предназначенной для ПЦР в режиме реального времени с красителем SYBER Green I. Этапы амплификации представлены в таблице 2.4.5.

Таблица 2.4.5 – Этапы амплификации РНК (этапы 2–4 повторяли 39 раз)

Этап	Название	Параметры
1	Предварительная денатурация	95,0 °C, 5,0 мин
2	Денатурация	95,0 °C, 30,0 сек
3	Отжиг	61,0 °C, 30,0 сек
4	Элонгация	72,0 °C, 30,0 сек
5	Остановка реакции	65,0 °C, 5,0 сек

Определение уровня экспрессии гена *SOD-3* в нематодах, обработанных исследуемыми растворами БАВ, проводили в сравнении с экспрессией этих генов в контрольных образцах – нематодах, необработанных тестируемыми соединениями. Количественные значения экспрессии генов нормализовали по отношению к уровню экспрессии референтных генов *AMA* или *ACT*, которую определяли в тех же условиях амплификации в режиме реального времени и с тем же количеством тестируемого кДНК.

Относительную экспрессию генов (RE) рассчитывали по формуле 2.4.5.

$$RE = E^{-\Delta\Delta Ct}, \quad (2.4.5)$$

где E – эффективность амплификации (равна 2,0).

Нормализация по среднему референсных генов представлена в формуле 2.4.6.

$$\Delta C(t) = C(t)_{target} - C(t)_{reference}, \quad (2.4.6)$$

где $C(t)_{reference}$ – среднее геометрическое ($C(t)$) референсных генов (для мРНК);

$C(t)_{target} - C(t)$ генов-мишеней.

Более подробно расчет RE представлен в работе Т. А. Димитриади [11].

Для оценки влияния БАВ на накопление жира в организме нематоды использовали флуоресцентное окрашивание липидных включений с помощью реагента BDP 505/515 – бордипиррометенового флуорофора (Lumiprobe, Россия) для визуализации липидных мембран [161]. По окончании 10,0 дней инкубации нематод в присутствии БАВ содержимое 96-луночного плоскодонного планшета переносили в соответствующие ячейки 96-луночного V-образного планшета. Планшет центрифугировали при 1000,0 об/мин 3,0 мин, затем отбирали супернатант, не затрагивая осадка нематод. Для промывки нематод от культуральной жидкости в каждую ячейку добавляли по 150,0 мм³ стерильного PBS (в 1,0 дм³ воды растворяли 8,0 г NaCl + 0,2 г KCl + 1,44 г Na₂HPO₄ + 0,24 г KH₂PO₄), центрифугировали при 1000,0 об/мин 3,0 мин. Процесс отмывки повторяли дважды. К отмывому осадку нематод в каждую ячейку добавляли 150,0 мм³ фиксирующего раствора (40 % раствора изопропанола). Планшеты с нематодами инкубировали 20,0 мин при 24,0±2,0 °С. По истечению указанного времени планшет центрифугировали при 1000,0 об/мин 3,0 мин. Затем в каждую ячейку планшета добавляли по 150,0 мм³ рабочего раствора реагента BDP 505/515 для окрашивания жира в нематодах (2,0 мм³/см³ стокового раствора в 40,0 % изопропанол). Планшет с нематодами инкубировали 15,0 мин

при 50 об/мин $24,0 \pm 2,0$ °С. Затем центрифугировали при 1000,0 об/мин 3,0 мин и удаляли супернатант. Осадок нематод отмывали стерильным раствором М9Т ($50,0 \text{ см}^3$ буфера М9 (на $1,0 \text{ дм}^3$ воды $3,0 \text{ г}$ KH_2PO_4 + $6,0 \text{ г}$ Na_2HPO_4 + $5,0 \text{ г}$ NaCl , автоклавирование 20 мин, 120 °С, затем внесение $1,0 \text{ см}^3$ 1,0 М раствора MgSO_4) с $5,0 \text{ мм}^3$ тритон X-100) три раза. По окончании промывки в лунки добавляли $100,0 \text{ мм}^3$ М9Т и приступали к сканированию прокрашенных липидных включений в теле нематод с помощью автоматизированного флуоресцентного микроскопа ImageXpress Micro XL («Molecular Devices», США) [161].

Для оценки АОА исследуемых растворов БАВ использовали методику определения обесцвечивания катион-радикал «ABTS •+», представленную ранее [86], формула 2.4.2. Исследуемые полифенолы растворяли в 70 % водно-этанольном растворе для получения стокового раствора концентрацией 1,0 М [220], с помощью разведения в воде готовили растворы концентрациями 800 мкМ, 600 мкМ, 400 мкМ, 200 мкМ.

Для оценки антимикробной (антагонистической) активности растворов БАВ по отношению к условно-патогенным штаммам использовался метод диффузии в лунках. Подробно метод представлен в работе А. Davoodabadi [83] и М. Razhoohan [230]). Использовались тест-культуры: *E. coli* В-6954, *Bacillus fastidiosus* В-5651, *Pseudomonas fluorescens* В-3502, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027, *Leuconostoc mesenteroides* В-8404, *Candida albicans* АТСС 885-653, *Staphylococcus aureus* АТСС 25923). Штаммы предоставлены ФГБУ «Кемеровская МВЛ» (Россия) [170]. Для сравнения антимикробной активности использовалась дистиллированная вода (контроль) и диски с антибиотиками: стрептомицином (10 мкг), ванкомицином (30 мкг), цефалоспорином (30 мкг), ципрофлоксацином (5 мкг). Антибиотики приобретены в ООО «НИЦФ» (Россия). За наличие антагонистической активности принимаются результаты ингибирования роста штаммов условно-патогенных бактерий в 20,0 мм, а именно: при зоне ингибирования диаметром менее 11,0 мм штамм не проявлял активность, при зоне в 11,0–16,0 мм штамм проявлял слабую активность, а при зоне в 17,0–22,0 мм – среднюю активность, зона более 23,0 мм – высокую активность [170].

Влияние на накопление биомассы представителей нормальной микрофлоры ЖКТ (оценку прироста биомассы штаммов в единицах оптической плотности) оценивали с помощью персонального мультиканального биореактора RTS-8 plus («BioSan SIA», Латвия). В каждую пробирку вносили 1,0 % (от объема питательной среды) исследуемого раствора БАВ и 2,0 % инокулянта (мутность суспензии микроорганизмов 0,5 по МакФарланда, с помощью денситометра ДЭН-1 («BioSan SIA», Латвия). Методика (параметры) культивирования использовалась в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора, таблица 2.4.6. Продолжительность культивирования составляла 67,0 ч.

Таблица 2.4.6 – Параметры культивирования молочнокислых бактерий, выделенных из соответствующего биоматериала добровольцев

Параметры	Род		
	<i>Lactobacillus</i> (<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i>)	<i>Bifidobacterium</i> (<i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>)	<i>Streptococcus</i> (<i>S. salivarius</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. thermophilus</i>)
Потребность в кислороде	Аэротолерантный анаэроб	Облигатный анаэроб	Факультативный анаэроб
Скорость вращения пробирки	0,0 об/мин	0,0 об/мин	2700,0 об/мин
Интервал реверс-спинов	0,0 с ⁻¹	0,0 с ⁻¹	1,0 с ⁻¹
Температура блока	37,0 °С	37,0 °С	37,0 °С
Объем питательной среды в пробирке	45,0 см ³	50,0 см ³	7,5 см ³
Частота измерений	20,0 мин	20,0 мин	20,0 мин

Все молочнокислые бактерии – объекты исследования депонированы в коллекции ВКПМ (ФГБУ «ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт», Россия), следовательно, не проводились исследования таксономической принадлежности, безопасности данных штаммов. Изучение пробиотических свойств проводилось в соответствии с МУ 2.3.2.2789-10 [25]).

Для оценки устойчивости к действию антибиотиков (антибиотикорезистентность) опирались на диско-диффузионный метод, описанный в работе

Y. Yang [84]. Для сравнения использовали диски с антибиотиками, заказанными в ООО «НИЦФ» (Россия): со стрептомицином (10 мкг), тетрациклином (30 мкг), ампициллином (10 мкг), хлорамфениколом (30 мкг), гентамицином (10 мкг). Интерпретация зон подавления роста для определения устойчивости штаммов представлена в МУ 2.3.2.2789-10 [25]. В качестве контроля использовали диски, пропитанные дистиллированной водой. Степень устойчивости микроорганизмов к антибиотикам определяли путем измерения зоны ингибирования вокруг индикаторного диска (мм). При зоне ингибирования диаметром менее 10,0 мм штамм считали устойчивым, 10,0–15,0 мм – малочувствительным, 15,0–25,0 – чувствительным, более 25,0 мм – высокочувствительным.

Оценивалась биосовместимость исследуемых штаммов по отношению к представителям нормальной микрофлоры ЖКТ добровольцев с помощью капельной методики Г. С. Волковой и ее коллег [6]. Интерпретация результатов: «+» – биосовместимы; «-» – бионесовместимы; «±» – слабый антагонизм; «-+» – сильный антагонизм.

Для оценки устойчивости к условиям ЖКТ опирались на методику, описанную в работе А. Sharma [159]. В качестве среды использовали бульон MRS с ферментом пепсином (3,0 мг/см³). pH бульона доводили до различных значений 2,0, 3,0 и 4,0 с помощью 1,0 н раствора HCl, далее в бульон инокулировали выращенные в течение 12,0–16,0 ч культуры исследуемых штаммов и инкубировали при 37,0±0,5 °C в течение 24,0 часов. Отбор проб производился с интервалом 6,0 ч. Оптическую плотность измеряли при 620,0 нм, также учитывали количество жизнеспособных организмов [159].

Для оценки кардиопротекторного потенциала с помощью теста на снижение холестерина *in vitro* опирались на работу D. K. Lee [177]. Метод заключался в культивировании (при 37,0±0,5 °C в течение 24,0 часов) исследуемых штаммов в питательной среде – бульоне MRS (HiMedia Laboratories, Индия) с L-цистеином, содержащей холестерин (Sigma, США). По истечению указанного времени отделяли биомассу клеток от культуральной жидкости с помощью центрифугирования (7,0 мин, 4200 об/мин). Объем холестерина в культураль-

ной жидкости определяли колориметрическим методом на спектрофотометре UV 1800 («Shimadzu», Япония) при помощи коммерческого набора «Холестерин общий. Энзиматический колориметрический метод» (CHOD-PAF метод) («НПФ АБРИС+», Россия). Холестерин (холестерол) чистотой 95,0 % приобретен в «BioChemica, PanReac Applichem» (Германия).

На основании полученных данных составлялись ПК. Рассматривали прирост биомассы путем культивирования на среде Рогоза, MRS, Лактобакагаре при $37,0 \pm 0,5$ °C в течение 24,0 ч, измерение количества клеток проводили каждые 2,0 ч. Количественный учет выросших микроорганизмов проводили, используя метод разведений, представленный в работе А. И. Нетрусова и его коллег [27].

Для составленных ПК оценивались пробиотические свойства, АОА, способность снижать холестерин *in vitro* по методикам, представленным ранее.

Для хранения ПК выращивали на жидкой ПС (MRS) в течение 11,0 ч при температуре $37,0 \pm 0,5$ °C в анаэробных условиях (используя CO₂-инкубатор производителя «Voxim», Китай). После окончания культивирования отделяли биомассу от культуральной жидкости с помощью центрифугирования (7,0 мин, 4200 об/мин). К трехкратно промытой стерильной водой биомассе добавляли защитную сахарозо-желатозо-молочную среду. Полученную суспензию разливали по стерильным пенициллиновым флаконам и замораживали, после чего подвергали сублимационному высушиванию [42]. ПК хранились при $4,0 \pm 0,5$ °C.

Для подбора пребиотической добавки оценивали влияние пребиотиков различной концентрации на прирост биомассы ПК и представителей нормальной микробиоты ЖКТ. В исследовании глюкозу в составе бульона MRS заменяли на инулин, ФОМ в количестве 1,0 %, 1,5 % и 2,0 % от объема ПС. Культивирование осуществляли при $37,0 \pm 0,5$ °C в течение 48,0 ч. Влияние на биомассу консорциумов оценивали с помощью метода серийных разведений. Для контроля разработанные консорциумы выращивали на среде MRS, содержащей глюкозу в количестве 1,0 %, 1,5 % и 2,0 % от объема ПС. Методика исследования представлена в работе К. Śliżewska [290]. Прирост биомассы оценивался по изменению единиц оптической плотности – методика представлена ранее.

Для составленных СД, смеси ФПИ оценивалась антимикробная активность, устойчивость к действию ряда антибиотиков, к неблагоприятным условиям ЖКТ, АОА и способность снижать холестерин *in vitro* по методикам, представленным ранее. Антимикробная активность растворов целевых БАВ (в 70 % водно-этанольном растворе) по отношению к разработанным СД оценивалась с помощью метода диффузии в лунках и по изменению оптической плотности (в течение 67,0 ч), методы анализов представлены выше.

Для стерилизации ПС в работе использовали вертикальный паровой стерилизатор DGM-500 («DGM», Швейцария), параметры автоклавирования: 120,0±5,0 мин, 15,0±0,5 мин. Для стерилизации посуды использовали шкаф сушильный ШС-80-01 (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия), параметры стерилизации: 60,0±3,0 минут при 180,0±5,0 °С. Дистиллированная и бидистиллированная вода были получены с помощью бидистиллятора марки ТУ 25-11.1592-81 БС («Лабинвест», Россия). Для культивирования использовались термостаты электрические суховоздушные охлаждающие ТСО-1/80 СПУ («Смоленское СКТБ СПУ», Россия), шейкеры-инкубаторы ISS-4075 («JEIO TECH», Республика Корея), климат камеры KBF-S ECO 720 («BINDER GmbH», Германия).

Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные результаты выражали как среднее значение ± стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости результатов использовали t-критерии Стьюдента. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для анализа использовали программу «Statistica 10.0» («StatSoft, Inc.», США).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ факторов риска развития атеросклероза у потребителей

У 106 участников исследования выявлены факторы риска развития АЗ, представленные на рисунках 3.1.1–3.1.3.

ОХС является важным показателем, используемым при оценке сердечно-сосудистого риска, чем выше уровень ОХС, тем выше риск. У 9,0 % добровольцев уровень ОХС находится в пределах от 5,0 до 6,0 ммоль/дм³, у 29,0 % – от 6,0 до 7,0 ммоль/дм³, у 11,0 % – от 7,0 до 8,0 ммоль/дм³.

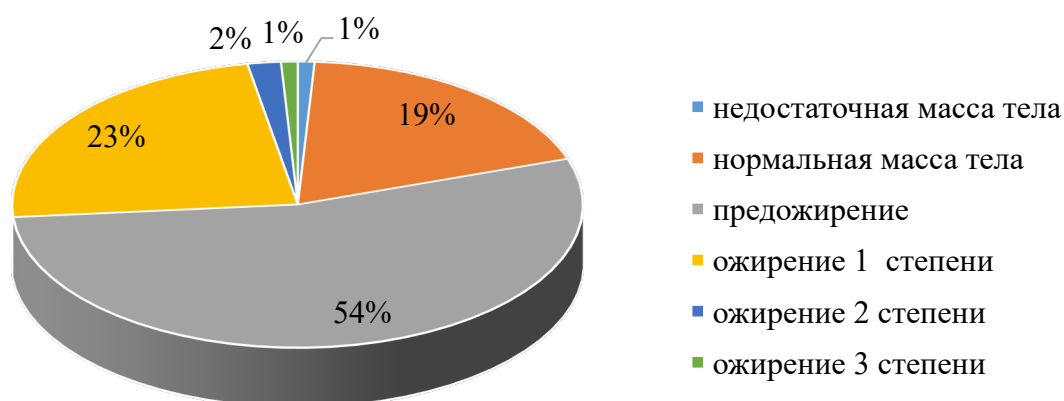
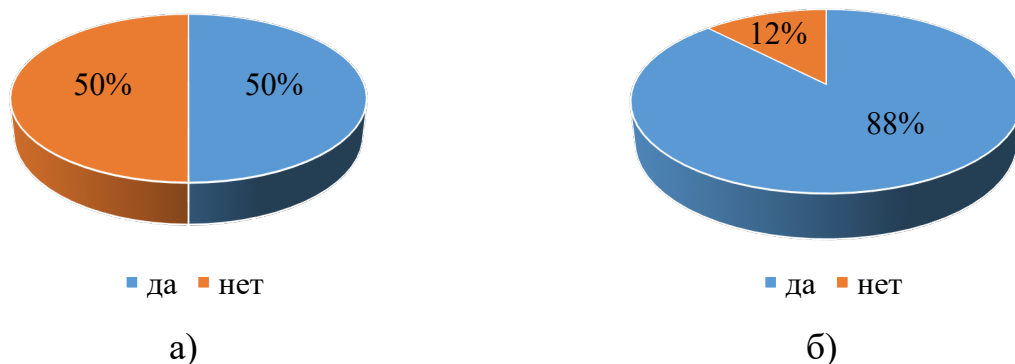
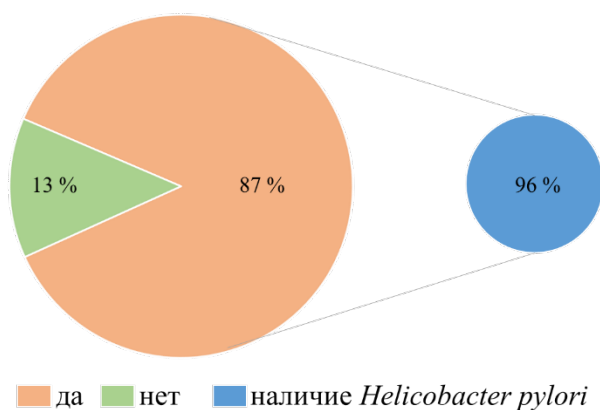


Рисунок 3.1.1 – Доля участников исследования, распределенная по ИМТ

ИМТ является одним из основных факторов риска развития ССЗ [18]. В исследуемой группе риск развития АЗ связан с ожирением (1–3 степени) у 26,0 % добровольцев.





в)

Рисунок 3.1.2 – Риски, связанные с наличием заболеваний:

а) гиперлипидемии; б) артериальной гипертензии; в) заболеваний ЖКТ

Риск развития АЗ, связанный с избыточным содержанием ОХС в крови, характерным для половины участников исследования. Риск, связанный с повышенным артериальным давлением – для 88,0 % добровольцев. Нарушенное функционирование микробиоты ЖКТ наблюдается у 87,0 % добровольцев, среди которых у 11,0 % имеются/имелись заболевания, вызванные активностью *H. pylori*.

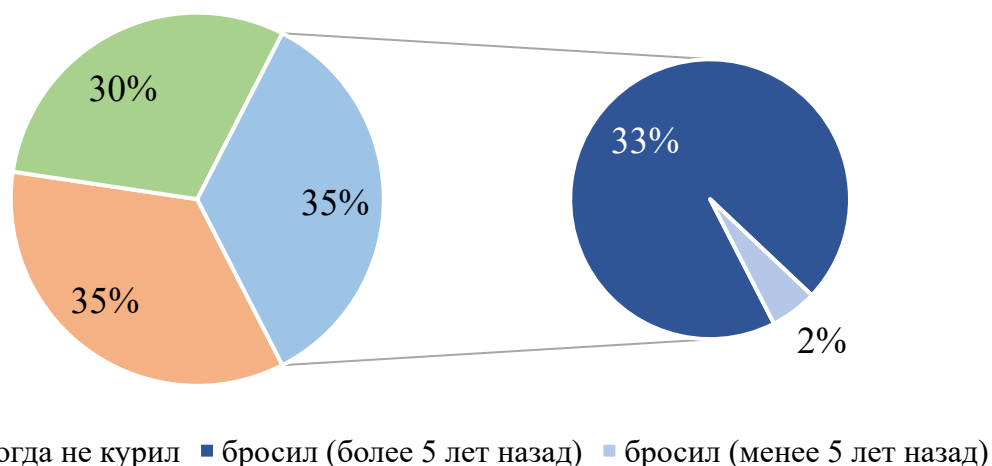


Рисунок 3.1.3 – Распределение добровольцев, принявших участие в исследовании, по наличию вредной привычки – курению

Риск возникновения АЗ, связанный с курением, характерен для 39 человек. У двух человек риск развития АЗ уменьшен в два раза, так как они бросили курить менее 5 лет назад [18]).

Результаты анализа представителей микробиоты ЖКТ, полученные из биоматериала добровольцев, представлены в таблице 3.1.1.

Таблица 3.1.1 – Выделенные и идентифицированные штаммы бактерий, обитающих в ЖКТ добровольцев

Анаэробные бактерии	Энтерококки, стрептококки	Энтеробактерии
<i>Bacteroides caccae</i> ; <i>B. fragilis</i> ; <i>B. thetaiotaomicron</i> ; <i>Eubacterium limosum</i> ; <i>Clostridium chauvoei</i> ; <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> ; <i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>L. fermentum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>E. faecium</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> ; <i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> ; <i>S. agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>rhinoscleromatis</i>

Известно, что у 88 добровольцев присутствуют/присутствовали *H. pylori*, вызывающие заболевания ЖКТ. По результатам исследования биоматериала (фекалий) добровольцев выявлены представители нормальной микробиоты ЖКТ, которые подвергались культивированию *in vitro*: *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *Streptococcus salivarius*, *S. agalactiae*, *S. thermophilus*.

Для стимулирования нормального функционирования микробиоты ЖКТ добровольцев необходимо систематическое употребление ФПИ, ФПД, оказывающих благоприятный эффект на выше представленные штаммы.

Существует генетическая предрасположенность у людей к развитию АЗ. С использованием программы ANDSsystem была произведена приоритизация генов, являющихся факторами риска АЗ. Результаты представлены на рис. 3.1.4.

Полученная генная сеть, подтверждает целесообразность оценки SNP генов *CAT* (rs1001179), *MnSOD* (rs4880), *GPx1* (rs1050450), *ADRB3* (rs4994), *PPARG* (rs1801282), *FABP2* (rs1799883), вносящих значимый вклад в формирование АЗ. Данные SNP могут использоваться в реализации персонализированного подхода при оценке развития АЗ и его профилактике.

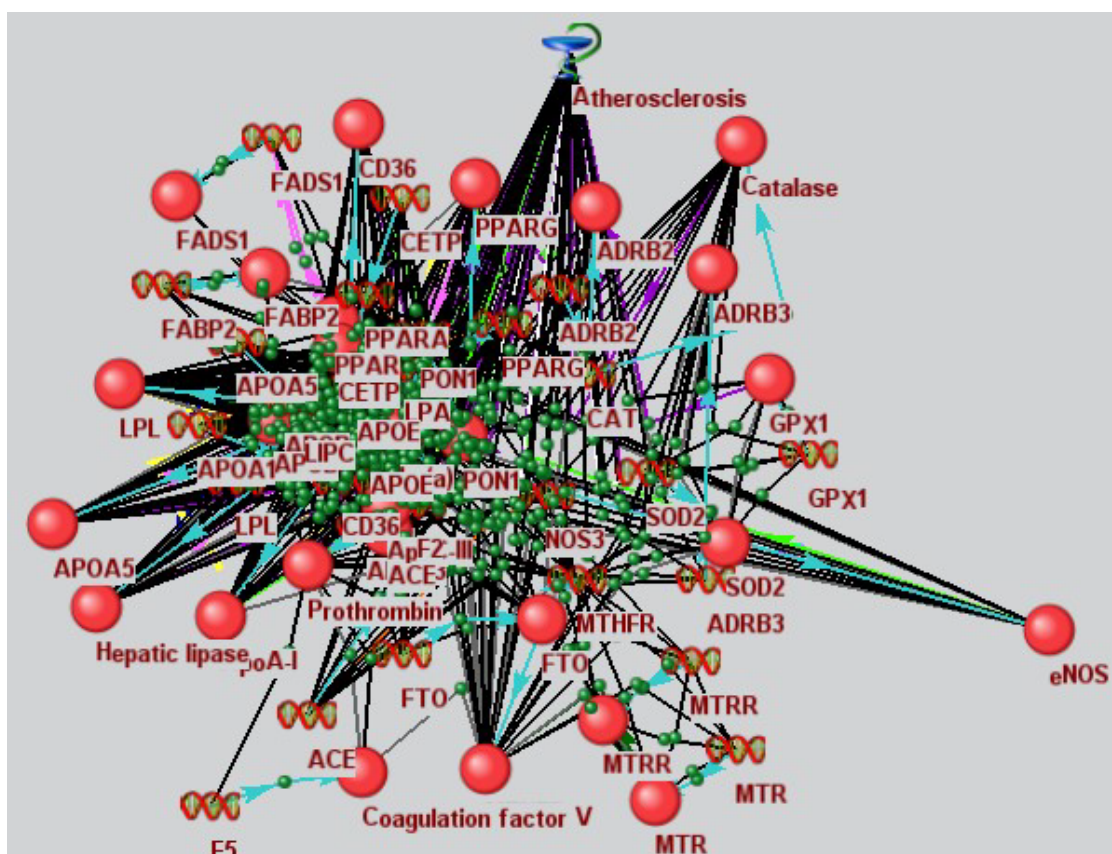


Рисунок 3.1.4 – Ассоциативная генная сеть, содержащая гены и белки, участвующие в развитии АЗ

Результаты ПЦР-анализа генов представлены в таблице 3.1.2. Распределение вариантов SNP в изученной группе мужчин Кемеровской области соответствовало данным, представленным в международных многоцентровых базах данных у европеоидов.

Таблица 3.1.2 – Генотипы добровольцев, участвующих в исследовании

Ген (полиморфизм)	Генотип		
	norm/norm	norm/mut	norm/mut
1 <i>GPx1</i> (rs1050450)	CC	CT	TT
	43 %	45 %	11 %
2 <i>MnSOD</i> (rs4880)	CC	CT	TT
	28 %	45 %	26 %
3 <i>CAT</i> (rs1001179)	CC	CT	TT
	58 %	32 %	9 %

Продолжение таблицы 3.1.2

Ген (полиморфизм)	Генотип		
	norm/norm	norm/mut	norm/mut
4 <i>ADRB3</i> (rs4994)	ТТ	ТС	СС
	84 %	16 %	0
5 <i>PPARG</i> (rs1801282)	СС	СG	GG
	75 %	23 %	2 %
6 <i>FABP2</i> (rs1799883)	GG	GA	AA
	53 %	37 %	10 %

В зависимости от сочетаний вариантов генотипов добровольцы разделены на 6 групп (рисунок 3.1.5).

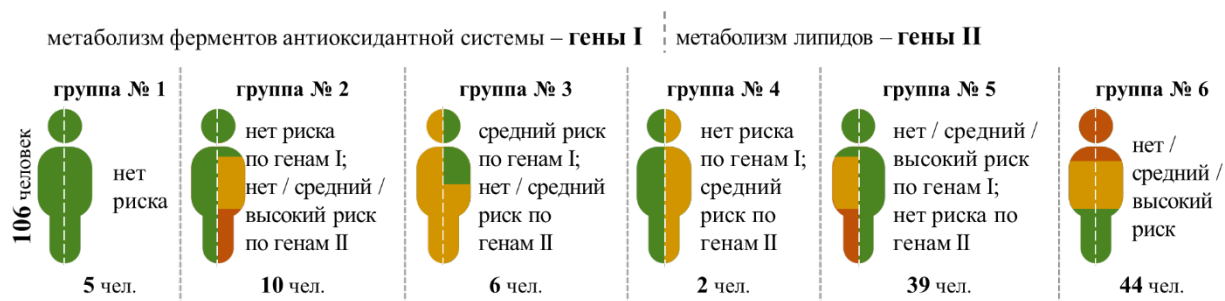


Рисунок 3.1.5 – Распределение исследуемой выборки на группы в зависимости от сочетаний генотипов

У 5 человек (4,72 %) отсутствует риск, связанный с неблагоприятными SNP в исследуемых группах генов. У 10 человек отсутствует риск, связанный с неблагоприятными SNP генов, вызывающих нарушения в системе антиоксидантной защиты организма, но имеется риск, связанный с метаболизмом липидов. У 6 человек (5,66 %) имеется средний риск развития заболевания, связанный с мутациями в генах антиоксидантной защиты организма. У 2 человек (1,89 %) имеется средний риск развития заболевания, связанный с мутациями в генах, ответственных за метаболизм липидов. У 39 человек отсутствует риск, с неблагоприятными SNP вызывающих нарушения в метаболизме липидов. У 44 человек имеется риск, связанный с неблагоприятными SNP в исследуемых группах генов.

В ходе обработки полученной информации сформирована база с характерными факторами риска развития АЗ исследуемой группы. Пример представлен в таблице 3.1.3 для первых четырех групп.

Исходя из анализа различных факторов риска АЗ (состояния здоровья, вредных привычек и генотипов) сформированы группы повышенного риска, для которых в ходе данной работы разрабатывались различные системы профилактики, в том числе индивидуально подобранные ФПИ, ФПД.

– группа № 1 – добровольцы, у которых отсутствуют SNP генов высокого риска развития АЗ, связанного с нарушением активности ферментов антиоксидантной защиты организма, участвующих в метаболизме липидов. Для добровольцев необходимы ФПИ, ФПД, способные нормализовать работу микробиоты ЖКТ (например, пробиотики в дозе от адекватного до верхнего допустимого уровня потребления) и проявлять способность снижать уровень холестерина. Для добровольцев, имеющих вредную привычку – курение, необходим дополнительный прием не только пробиотиков, но и антиоксидантов в дозе адекватного уровня потребления.

– группа № 2 – добровольцы, у которых отсутствуют SNP генов высокого риска развития АЗ, связанного с нарушением активности ферментов антиоксидантной защиты, но имеются риски, связанные с нарушением метаболизма липидов. Добровольцам необходим прием антиоксидантов в дозе адекватного уровня потребления, но для тех, кто дополнительно имеет вредную привычку – курение, необходим прием антиоксидантов в дозе от адекватного до верхнего допустимого уровня потребления. Для добровольцев, имеющих средний, высокий генетический риск нарушения работы ферментов – необходим дополнительный прием ФПИ, ФПД способных нормализовать работу микробиоты ЖКТ, в дозе от адекватного до верхнего допустимого уровня потребления;

– группа № 3 – добровольцы, у которых имеются SNP генов среднего риска развития нарушений системы антиоксидантной защиты организма, имеются

риски, связанные с нарушением метаболизма липидов. Для данной группы необходим прием антиоксидантов в дозе верхнего допустимого уровня потребления.

Для добровольцев со средним, высоким генетическими рисками нарушения работы ферментов необходим дополнительный прием ФПИ, ФПД, способных нормализовать работу микробиоты ЖКТ, в дозе от адекватного до верхнего допустимого уровня потребления;

– группа № 4 – добровольцы, у которых имеются SNP генов среднего риска развития нарушений в метаболизме липидов, и возможный риск нарушения антиоксидантной системы защиты организма. Для данной группы характерен прием ФПИ, ФПД, способных снижать уровень холестерина, нормализовать работу микробиоты ЖКТ в дозе, близкой к верхнему допустимому уровню потребления. Для тех, у кого дополнительно имеются риски, связанные с нарушением антиоксидантной защиты (мутации и/или вредная привычка-курение), необходим прием антиоксидантов в дозе от адекватного до верхнего допустимого уровня потребления;

– группа № 5, не вошедшая в таблицу 3.1.3, состоит из 39 добровольцев, у которых отсутствуют SNP генов, приводящих к среднему риску нарушению метаболизма липидов в организме, и возможен риск нарушения антиоксидантной системы защиты организма. Для добровольцев необходим систематический прием ФПИ, ФПД способных снизить уровень холестерина, проявлять АОА в дозах от адекватного до верхнего допустимого уровня потребления. Для тех, у кого дополнительно имеется вредная привычка – курение, то уровень приема добавок требуется в дозе верхнего допустимого уровня потребления.

– группа № 6, не вошедшая в таблицу 3.1.3, состоит из 44 человек, у которых имеются SNP генов, приводящих к среднему, высокому риску развития нарушений, происходящих в антиоксидантной системе защиты организма и в метаболизме липидов. Для группы необходим прием ФПИ, ФПД в дозах верхнего допустимого уровня потребления.

Адекватный и верхний допустимые уровни потребления различных ФПИ, ФПД представлены в МР 2.3.1.1915-04 и в работе В. А. Тутельяна [29].

Таблица 3.1.3 – Характеристика исследуемой группы людей

№	Количество человек	Ожирение	Гиперлипидемия	Артериальная гипертензия	Заболевания ЖКТ	Курение	Генетические особенности					
							антиоксидантная защита			метаболизм липидов		
							<i>GPx1</i>	<i>MnSOD</i>	<i>CAT</i>	<i>ADRB3</i>	<i>PPARG</i>	<i>FABP2</i>
1	1	имеется	нет	имеется	нет	курит	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	2	нет	нет	имеется	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	3	имеется	имеется	нет	имеется	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	4	имеется	имеется	имеется	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	5	имеется	имеется	имеется	имеется	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
2	1	имеется	нет	имеется	нет	курит	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	2	нет	нет	имеется	имеется	нет	нет	нет	нет	нет	нет	средний
	3	нет	нет	имеется	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	4	имеется	имеется	имеется	имеется	нет	нет	нет	нет	средний	нет	средний
	5	нет	нет	имеется	имеется	курит	нет	нет	нет	нет	нет	высокий
	6	имеется	имеется	нет	имеется	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	7	имеется	имеется	имеется	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	8	имеется	имеется	имеется	имеется	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	9	нет	имеется	имеется	имеется	курит	нет	нет	нет	средний	нет	средний
	10	имеется	имеется	имеется	имеется	нет	нет	нет	нет	нет	средний	высокий
3	1	имеется	нет	нет	имеется	курит	средний	средний	средний	нет	нет	средний
	2	имеется	нет	имеется	имеется	нет	средний	средний	средний	нет	нет	средний
	3	нет	имеется	имеется	имеется	курит	средний	средний	средний	средний	средний	нет
	4	имеется	нет	имеется	нет	нет	средний	средний	средний	нет	нет	нет
	5	нет	имеется	имеется	имеется	нет	средний	средний	средний	нет	нет	средний
	6	имеется	имеется	имеется	нет	нет	средний	средний	средний	нет	нет	нет
4	1	нет	нет	да	имеется	курит	средний	нет	нет	средний	средний	средний
	2	нет	да	да	имеется	курит	нет	высокий	нет	средний	средний	средний

3.2 Параметры культивирования и анализ роста hairy roots растений

Семена шлемника байкальского, левзеи сафлоровидной и копеечника забытого стерилизовали, промывали и выращивали на твердой питательной среде MS. Полученные проростки повреждали стерильной иглой и инкубировали в течении 24,00 ч в жидкой питательной среде MS с агробактериями. Затем инфицированные проростки промывали и помещали на твердую питательную среду с антибиотиками. Состав ПС представлен в таблицах 2.4.1–2.4.3, в которых варьировали качественным и количественным содержанием регуляторов роста – ауксинов, цитокинов природного (ИУК, кинетин) и синтетического (6–БАП, 2,4–Д и НУК) происхождения. Появление первичных hairy roots наблюдалось через 14,0–28,0 дней после трансформации.

В ходе биотехнологического культивирования на ПС различного гормонального состава получены hairy roots растений, описание hairy roots представлено в таблице 3.2.1.

Таблица 3.2.1 – Hairy roots, выращенные на различных ПС

ПС	Общее число эксплантов, шт	% эксплантов, образовавших корни	Длина корня, см	Начало стационарной фазы, день
Шлемник байкальский				
№ 1	23,00±1,00	70,00±1,00	1,59±0,07	27,00±1,00
№ 2	25,00±1,00	70,00±1,00	1,66±0,08	
№ 3	22,00 ±1,00	65,00±1,00	1,59±0,05	
№ 4	25,00±0,80	70,00±1,00	1,28±0,05	
Левзея сафлоровидная				
№ 1	28,00±1,00	67,50±1,50	1,52±0,04	33,00±1,50
№ 2	28,00±1,00	62,50±1,500	1,55±0,04	
№ 3	30,00±1,00	70,00±1,0	1,60±0,05	
№ 4	29,00±1,00	68,90±1,30	1,59±0,05	
Копеечник забытый				
№ 1	30,5±1,00	65,00±1,00	1,32±0,05	28,00±1,00
№ 2	30,0±1,00	65,00±1,00	1,35±0,05	
№ 3	32,0±1,00	70,00±1,00	1,39±0,05	
№ 4	31,5±1,00	68,50±0,50	1,35±0,02	

У контрольных образцов (нетрансформированных проростков) образование hairy roots отсутствовало, что подтверждается ПЦР анализом на наличие гена *rol B* в выделенной ДНК. Результаты ПЦР анализа по определению заражения биообъектов *A. rhizogenes* показали, что продукты амплификации размером 780 п.н. обнаружены во всех исследуемых ДНК, выделенных из образцов hairy roots растений, рисунок 3.2.1.

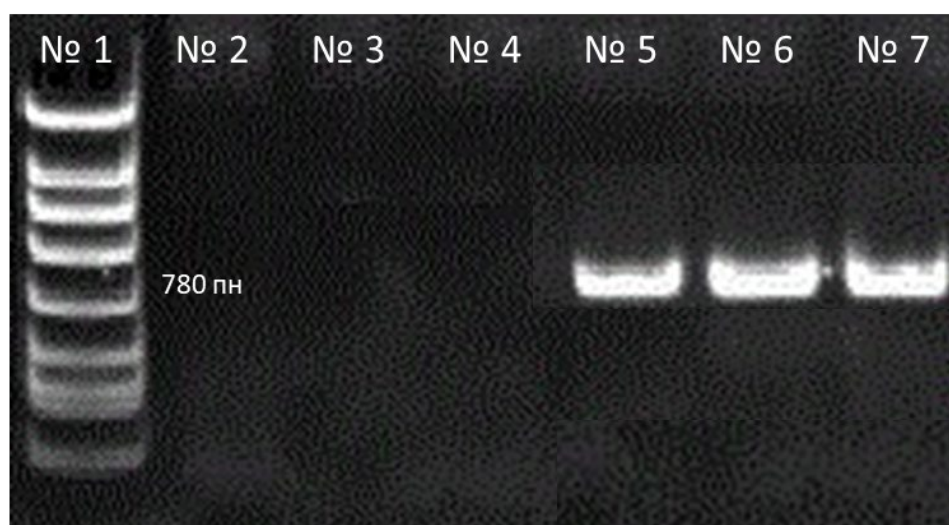


Рисунок 3.2.1 – Результаты электрофореза продуктов амплификации в агарозном геле: № 1 – ДНК-маркер; № 2, № 3, № 4 – контрольные образцы, выделенные из ДНК нетрансформированных объектов; № 5, № 6, № 7 – образцы с геном *rolB* в корнях объектов шлемника байкальского, левзеи сафлоровидной, копеечника забытого, соответственно

В итоге для выращивания hairy roots шлемника байкальского подходит ПС № 2 (в основе которой среда B5 + 1,00 мг цитокина растительного происхождения – кинетина + 1,00 мг ауксина синтетического происхождения – 2,4-Д); левзеи сафлоровидной ПС № 3 (в основе которой среда MS + 1,00 мг кинетина + 2,00 мг ауксина растительного происхождения – ИУК); копеечника забытого ПС № 3 (B5 + 1,50 мг цитокина синтетического происхождения – 6-БАП).

Биомассу hairy roots растений накапливали путем их культивирования в жидких ПС. Результаты накопления биомассы hairy roots растений образцов

№ 2 шлемника байкальского, № 3 левзеи сафлоровидной и № 3 копеечника забытого представлены на рисунке 3.2.2.

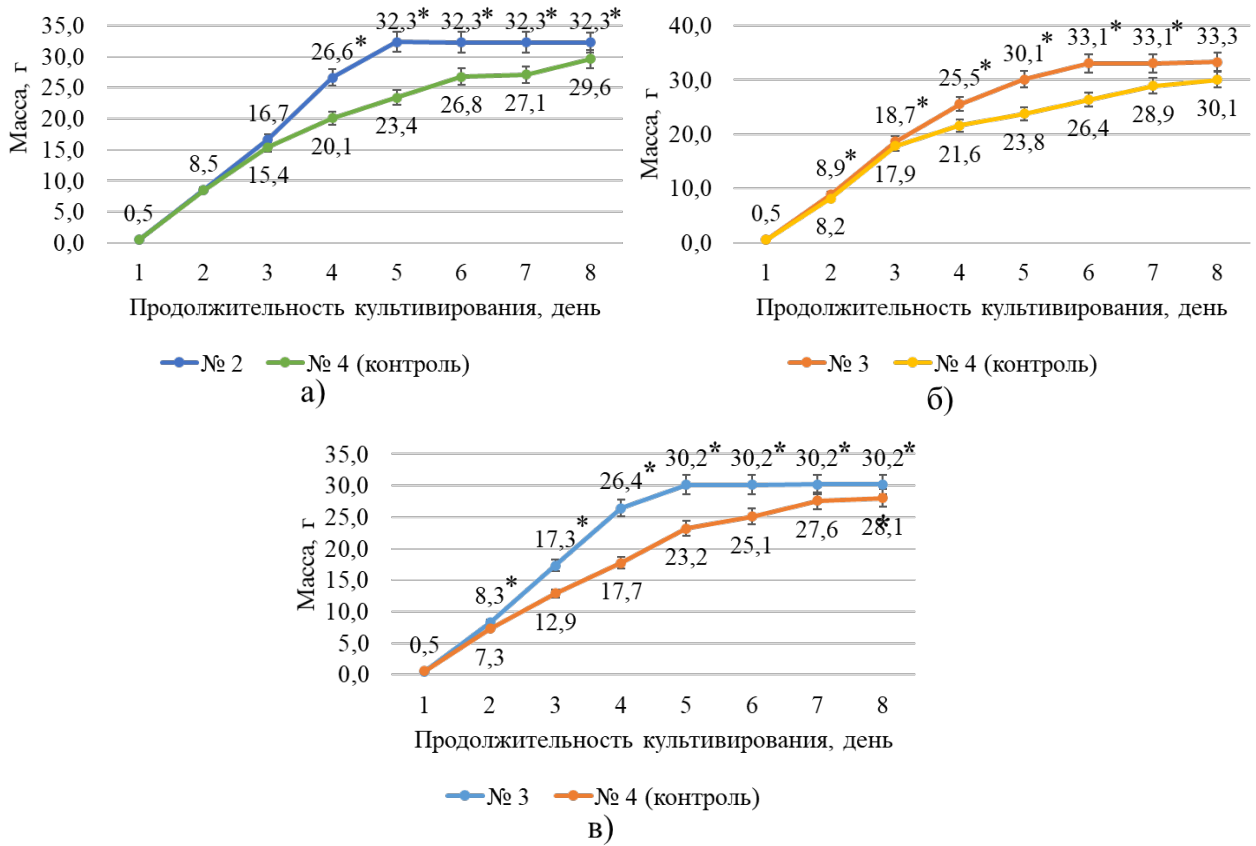


Рисунок 3.2.2 – Кривые роста hairy roots: а) шлемника байкальского; б) левзеи сафлоровидной; в) для копеечника забытого; «*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Все кривые роста приближенно имеют S-образную форму: экспоненциальная фаза роста для всех hairy roots начинается с $22,0 \pm 1,5$ суток; стационарная фаза роста для hairy roots шлемника байкальского начинается с $27,0 \pm 1,0$ суток, затем наступает фаза ускоренного отмирания – с $35,0 \pm 1,0$ суток; для hairy roots левзеи сафлоровидной стационарная фаза относительно короткая начинается с $33,0 \pm 1,5$ суток, фаза отмирания начинается с $37,0 \pm 1,5$ суток; для hairy roots копеечника забытого экспоненциальная фаза роста начинается с $28,0 \pm 1,0$ суток, фаза отмирания – с $35,0 \pm 1,0$ суток.

Максимальные значения индекса роста hairy roots:

- шлемника байкальского наблюдались при выращивании на ПС № 2. В сравнении с контрольным образцом (№ 4) индекс роста был больше на 9,09 %;
- левзеи сафлоровидной при выращивании на ПС № 3. В сравнении с контрольным образцом (№ 4) индекс роста был больше на 10,32 %;
- копеечника забытого при выращивании на ПС № 3. В сравнении с контрольным образцом (№ 4) индекс роста был больше на 7,80 %.

Результаты показали, что ПС (№ 2 для шлемника байкальского, № 3 для левзеи сафлоровидной и № 3 для копеечника забытого) из-за содержания регуляторов роста подходят для культивирования hairy roots и позволяют накопить биомассу, прирост которой больше в среднем на 9,07 % в сравнении с контрольными образцами, выращенными на безгормональных ПС.

3.3 Получение экстрактов hairy roots растений, изучение их биологических свойств

Для получения сухого порошка hairy roots биомассу растений отделяли с помощью фильтрации от культуральной жидкости, высушивали и измельчали. К высушенному биоматериалу добавляли соответствующий экстрагент, смесь подвергали УЗ обработке и экстракции на водяной бане с обратным холодильником. Параметры экстрагирования высушенного и измельченного биоматериала – hairy roots представлены в таблице 3.3.1.

Таблица 3.3.1 – Параметры экстрагирования, выбранные в ходе литературного обзора, биомассы hairy roots растений

Растение	№	Масса навески, г	Экстрагент		Гидро-модуль	Температура	Продолжительность	Прочее	Источник
Шлемник байкальский	1	1,010 ±0,008		70,0 %	10:1	23,0 ±2,0 °С	1,5 ч		[2; 65; 274]
	2	1,012 ±0,011		75,0 %					

Продолжение таблицы 3.3.1

Растение	№	Масса навески, г	Экстрагент	Гидро-ромодуль	Температура	Продолжительность	Прочее	Источник	
Копеечник забытый	3	1,001 ±0,002	водно-этанольный раствор	40:1	60,0± 2,0 °С	1,0 ч	15 мин УЗ обработки с последующей экстракцией	[12; 112; 215; 252; 300; 305]	
	4	1,004 ±0,001							80,0 %
	5	1,016 ±0,003							50,0 %
	6	1,018 ±0,002							60,0 %
Левзея сафлоровидная	7	1,0043 ±0,002	вода (70,0±2,0 °С)	30:1	70,0 ±2,0 °С	1,5 ч		[3; 44; 259; 299]	
	8	1,006 ±0,001							40,0 %
	9	1,021 ±0,009							50,0 %

Экстракт отделяли от осадка биомассы с помощью фильтрования через бумажный фильтр и воронку Бюхнера под вакуумом.

В ходе экстракции биомассы hairy roots растений были получены образцы, характеристика которых представлена в таблице 3.3.2.

Таблица 3.3.2 – Характеристика полученных экстрактов из биомассы hairy roots растений

№	Растение	Цвет	Запах	Особенности
1, 2, 3	шлемник байкальский	коричневый	характерный	нет осадка
4, 5, 6	левзея сафлоровидная	коричнево-зеленый, желто-зеленый	характерный	наличие осадка
7, 8, 9	копеечник забытый	краснокирпичный	характерный	наличие осадка

Для выбора параметров экстракции, позволяющих получить образец, содержащий наибольшее количество веществ-антиоксидантов, оценивали АОА полученных экстрактов из биомассы hairy roots растений. Результаты АОА полученных экстрактов из биомассы hairy roots растений представлены в таблице 3.3.3. АОА витамина С отражена на рисунке 3.3.1.

Таблица 3.3.3 – АОА экстрактов hairy roots растений, полученных при выбранных параметрах экстрагирования, %

Hairy roots	Образцы		
	№ 1	№ 2	№ 3
шлемник байкальский	93,6±0,01*	93,9±0,02*	93,6±0,01*
копеечник забытый	№ 4	№ 5	№ 6
	94,7±0,01*	94,4±0,01*	94,3±0,01*
левзея сафлоровидная	№ 7	№ 8	№ 9
	94,6±0,02*	94,2±0,02*	94,5±0,01*

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

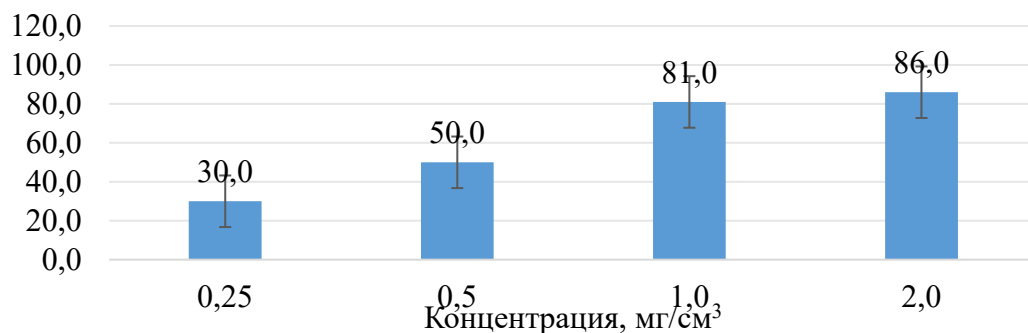


Рисунок 3.3.1 – АОА витамина С (контроля) различной концентрации, %

Результаты оценки качественного и количественного состава полифенолов в исследуемых образцах экстрактов hairy roots шлемника байкальского отражены на рисунках 3.3.2–3.3.5, в таблицах 3.3.4–3.3.6.

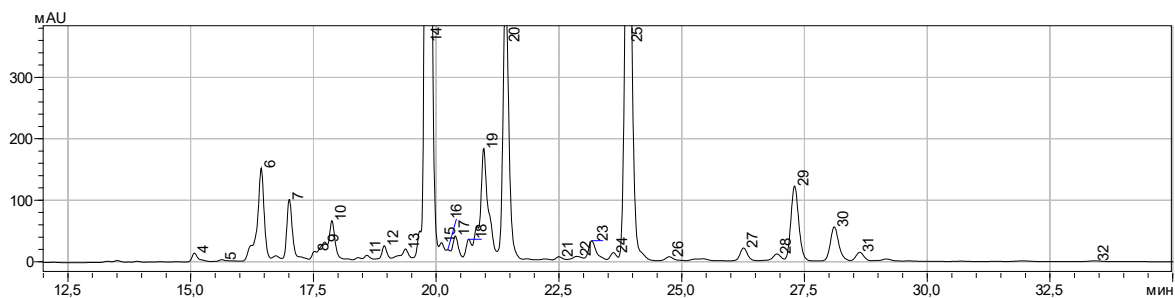


Рисунок 3.3.2 – Хроматограмма экстракта № 1 hairy roots шлемника байкальского (увеличенный масштаб для минорных компонентов):
пик 6, 7 – производные байкалина, 10 – скутелларин, 14– байкалин,
20 – скутеллареин, 25– необайкалин, 29 – вогонин

Таблица 3.3.4 – Компонентный состав основных полифенолов образца № 1

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
6	16,436	производное байкалина	0,38±0,01
7	17,008	производное байкалина	1,92±0,02
10	17,876	скутелларин	1,26±0,01
14	19,826	байкалин	48,41±1,31
20	21,415	скутеллареин	9,38±0,09
25	23,909	необайкалеин	19,04±0,21
29	27,298	вогонин	3,49±0,01

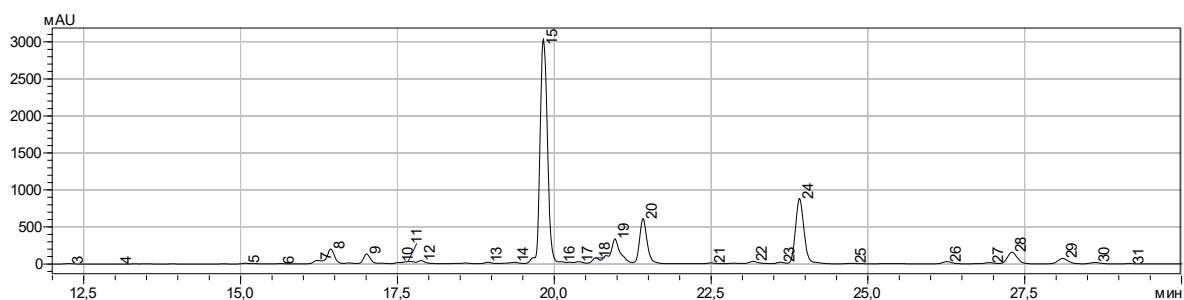


Рисунок 3.3.3 – Хроматограмма экстракта № 2 hairy roots шлемника байкальского:
пик 15 – байкалин, 20 – скутеллареин, 24 – необайкалеин,
29 – 5,7-дигидрокси-6-метоксифлавоон

Таблица 3.3.5 – Компонентный состав основных полифенолов образца № 2

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
8	16,437	производное байкалина	4,16±0,02

Продолжение таблицы 3.3.5

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
9	17,008	производное байкалина	2,60±0,02
12	17,874	скутелларин	0,80±0,01
15	19,827	байкалин	63,02±1,92
20	21,415	скутеллареин	12,73±0,24
24	23,909	необайкалеин	21,25±0,54
28	27,298	вогонин	4,47±0,01
29	28,213	5,7-дигидрокси-6-метоксифлаво	8,95±0,37

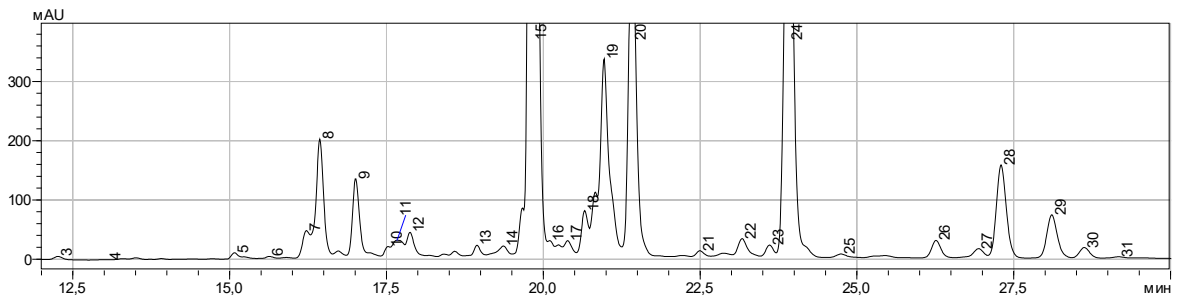


Рисунок 3.3.4 – Хроматограмма экстракта № 2 hairy roots шлемника байкальского (увеличенный масштаб для минорных компонентов): пик 8, 9 – производные байкалина, 12 – скутеллареин, 28 – вогонин, 29 – 5,7-дигидрокси-6-метоксифлаво

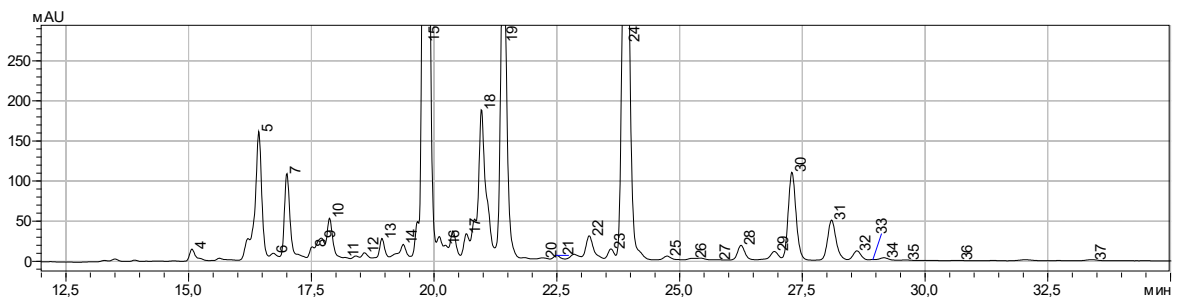


Рисунок 3.3.5 – Хроматограмма экстракта № 3 hairy roots шлемника байкальского (увеличенный масштаб для минорных компонентов): пик 5, 7 – производные байкалина, 10 – скутелларин, 15 – байкалин, 19 – скутеллареин, 24 – необайкалин, 30 – вогонин

Таблица 3.3.6 – Компонентный состав основных полифенолов образца № 3

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
5	16,428	производное байкалина	4,24±0,08
7	17,001	производное байкалина	2,31±0,03
10	17,869	скутелларин	1,06±0,01
15	19,822	байкалин	38,18±0,87

Продолжение таблицы 3.3.6

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
19	21,410	скутеллареин	9,15±0,08
24	23,900	необайкалеин	16,31±0,10
30	27,287	вогонин	3,13±0,05

В результате исследования методом ВЭЖХ определены доминирующие полифенолы в исследуемых образцах экстрактов hairy roots шлемника байкальского: байкалин (7-О-глюкуронид байкалеина), скутелларин (7-О-глюкуронид скутеллареина), байкалеин (5,6,7-триоксифлавоны), скутеллареин (5,6,7,4¹-тетраоксифлавоны), а также флавоны – вогонин. В образце № 2 был обнаружен 5,7-дигидрокси-6-метоксифлавоны – ороксиллин А, по данным литературы проявляющим ААЗ потенциал [310; 311].

В образце № 2 содержание целевого БАВ – байкалина было в среднем в 1,5 раза больше чем в образцах № 1 и № 3. Следовательно, среди всех рассматриваемых параметров экстракции для накопления байкалина оптимально использовать параметры экстракции: экстрагент – 75,0 % водно-этанольный раствор, гидромодуль – 10:1, температура 23,0±2,0 °С, продолжительность 1,5 ч.

Результаты оценки качественного и количественного состава полифенолов в исследуемых образцах экстрактов hairy roots копеечника забытого представлены на рисунках 3.3.6–3.3.8 и таблицах 3.3.7 – 3.3.9.

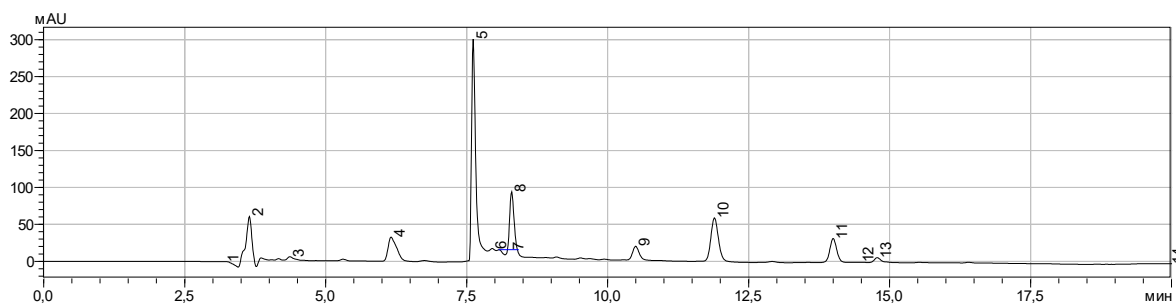


Рисунок 3.3.6 – Хроматограмма экстракта № 4 hairy roots копеечника забытого:

пик 5 – галловая кислота, 8 – кверцетин, 9 – протокатеховая кислота,

10 – хлорогеновая кислота, 11 – кофейная кислота

Таблица 3.3.7 – Компонентный состав основных полифенолов образца № 4

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
5	7,617	галловая кислота	5,15±0,04
8	8,298	кверцетин	4,32±0,05
9	10,497	протокатеховая кислота	0,08±0,01
10	11,894	хлорогеновая кислота	0,09±0,07
11	14,138	кофейная кислота	0,01±0,01

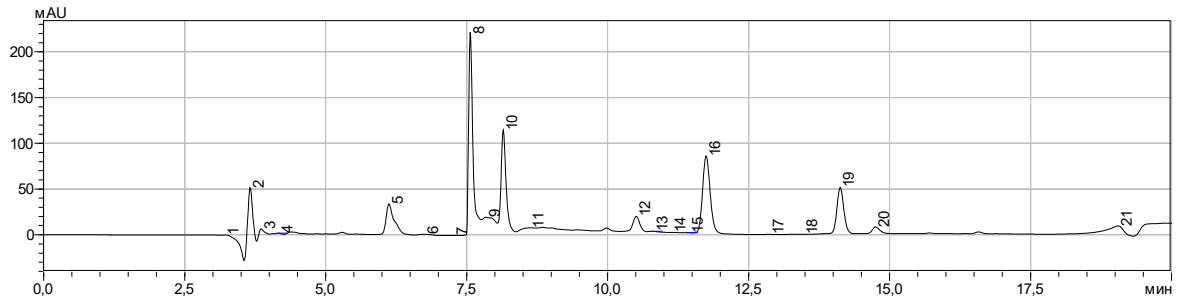


Рисунок 3.3.7 – Хроматограмма экстракта № 5 hairy roots копеечника забытого:

пик 8 – галловая кислота, 10 – кверцетин, 12 – протокатеховая кислота,
16 – хлорогеновая кислота, 19 – кофейная кислота

Таблица 3.3.8 – Компонентный состав основных полифенолов образца № 5

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
5	7,565	галловая кислота	3,07±0,04
8	8,150	кверцетин	2,94±0,04
9	10,507	протокатеховая кислота	0,07±0,01
10	11,747	хлорогеновая кислота	0,10±0,01
19	14,124	кофейная кислота	0,03±0,00

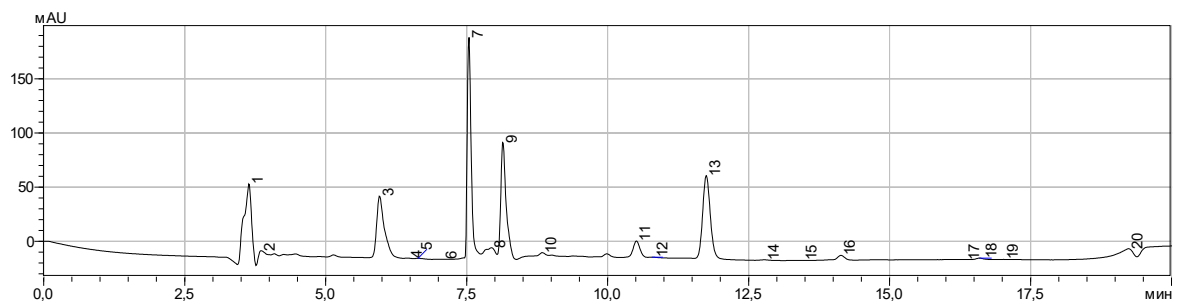


Рисунок 3.3.8 – Хроматограмма экстракта № 6 hairy roots копеечника забытого:

пик 7 – галловая кислота, 9 – кверцетин, 11 – протокатеховая кислота,
13 – хлорогеновая кислота, 16 – кофейная кислота

Таблица 3.3.9 – Компонентный состав основных полифенолов образца № 6

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
5	7,540	галловая кислота	2,77±0,03
8	8,143	кверцетин	1,64±0,04
9	10,511	протокатеховая кислота	0,08±0,02
10	11,750	хлорогеновая кислота	0,10±0,06
16	14,138	кофейная кислота	0,02±0,00

В результате исследования методом ВЭЖХ определены доминирующие полифенолы в исследуемых образцах экстрактов hairy roots копеечника забытого: галловая кислота, кверцетин мангиферин, протокатеховая кислота.

В образце № 4 содержание целевого БАВ – кверцетина было в среднем в 2,1 раза больше чем в образцах № 5 и № 6. Следовательно, среди всех рассматриваемых параметров экстракции для накопления кверцетина оптимально использовать параметры экстракции: экстрагент – 50,0 % водно-этанольный раствор, гидромодуль – 40:1, температура 60,0±2,0 °С, продолжительность 1,0 ч.

Результаты оценки качественного и количественного состава полифенолов в исследуемых образцах экстрактов hairy roots левзеи сафлоровидной представлены на рисунках 3.3.9 – 3.3.14 и таблицах 3.3.10 – 3.3.12.

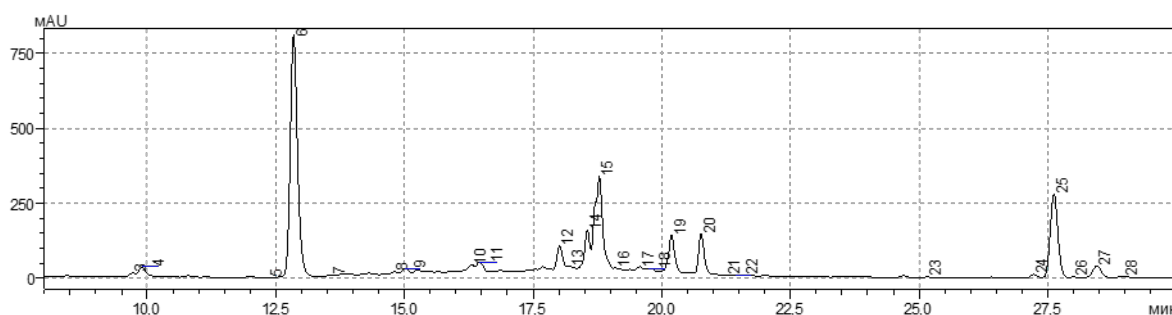


Рисунок 3.3.9 – Хроматограмма экстракта № 7 hairy roots левзеи сафлоровидной:

пик 6 – хлорогеновая кислота, 10 – рутин,
15 – кофейная кислота, 19 – феруловая кислота

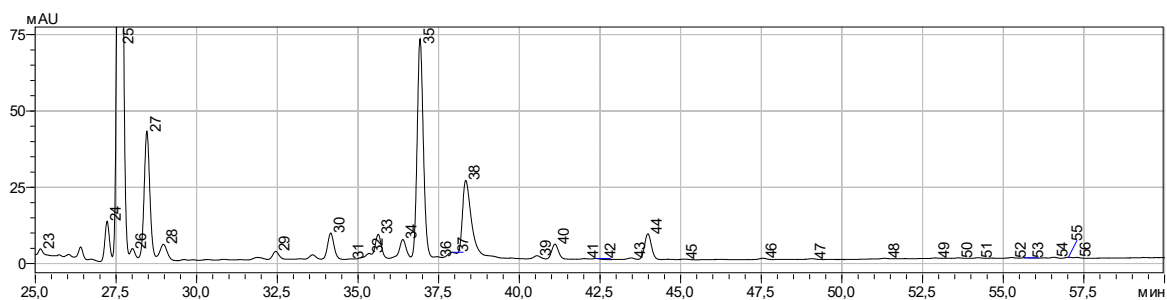


Рисунок 3.3.10 – Хроматограмма экстракта № 7 hairy roots левзеи сафлоровидной (увеличенный масштаб для минорных компонентов):

пик 30 – экдизон, 35 – кверцетин, 38 – кемпферол

Таблица 3.3.10 – Компонентный состав основных полифенолов образца № 7

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
6	12,845	хлорогеновая кислота	4,07±0,09
10	16,311	рутин	0,18±0,01
15	18,786	кофейная кислота	0,61±0,01
19	20,188	феруловая кислота	0,29±0,01
30	34,154	экдизон	0,09±0,01
35	36,924	кверцетин	0,70±0,01
38	38,342	кемпферол	0,47±0,01

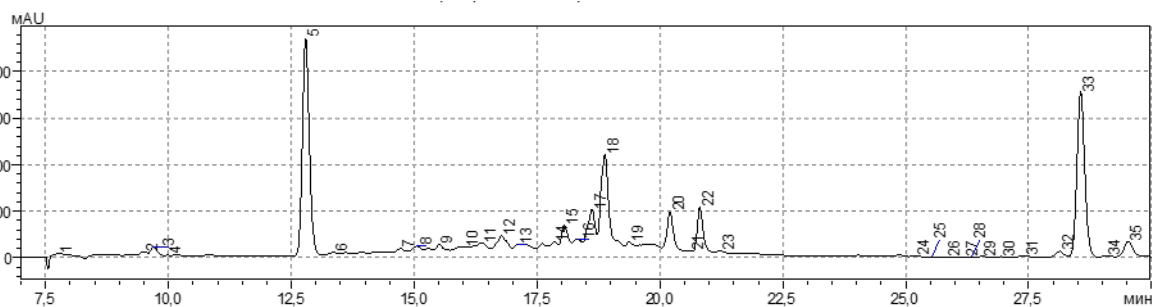


Рисунок 3.3.11 – Хроматограмма экстракта № 8 hairy roots левзеи сафлоровидной:

пик 5 – хлорогеновая кислота, 12 – рутин, 18 – кофейная кислота,
20 – феруловая кислота

Таблица 3.3.11 – Компонентный состав основных полифенолов образца № 8

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
5	12,789	хлорогеновая кислота	2,35±0,01
12	16,771	рутин	0,26±0,01
18	18,879	кофейная кислота	0,39±0,01

Продолжение таблицы 3.3.11

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
20	20,203	феруловая кислота	0,19±0,01
30	34,273	экдизон	0,57±0,01
33	37,432	кверцетин	0,58±0,01
35	38,576	кемпферол	0,49±0,01

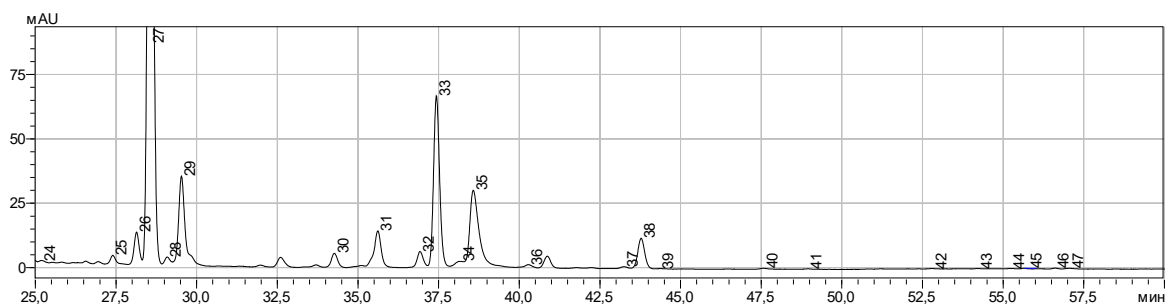


Рисунок 3.3.12 – Хроматограмма экстракта № 8 hairy roots левзеи сафлоровидной (увеличенный масштаб для минорных компонентов): пик 30 – экдизон, 33 – кверцетин, 35 – кемпферол

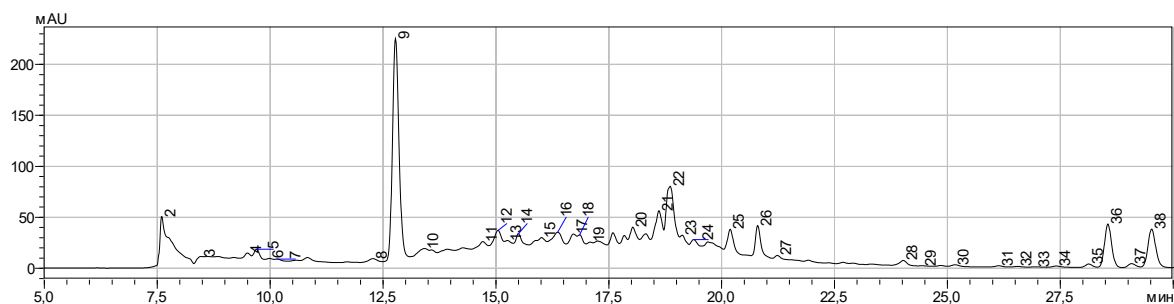


Рисунок 3.3.13 – Хроматограмма экстракта № 10 hairy roots левзеи сафлоровидной: пик 9 – хлорогеновая кислота, 16 – рутин, 22 – кофейная кислота, 25 – феруловая кислота

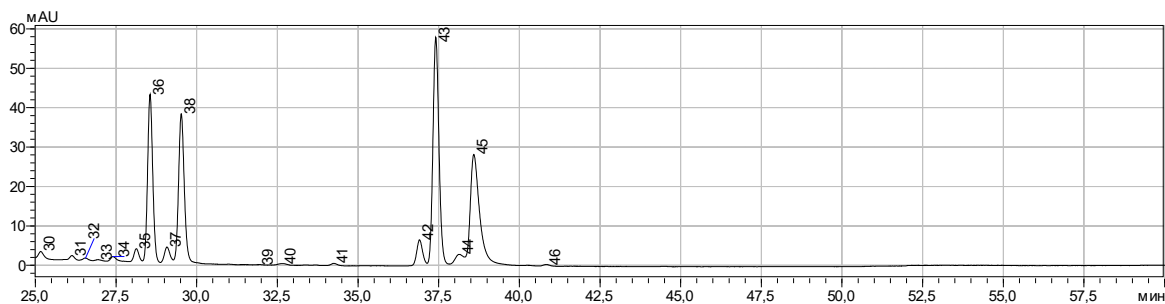


Рисунок 3.3.14 – Хроматограмма экстракта № 10 hairy roots левзеи сафлоровидной (увеличенный масштаб для минорных компонентов): пик 41 – экдизон, 43 – кверцетин, 45 – кемпферол

Таблица 3.3.12 – Компонентный состав полифенолов образца № 10

№ пика	Время удерживания, мин	Наименование компонента	Количественное содержание, мг/г
9	12,789	хлорогеновая кислота	1,09±0,01
16	16,771	рутин	0,14±0,01
22	18,879	кофейная кислота	0,12±0,00
25	20,203	феруловая кислота	0,05±0,00
41	34,273	экдизон	0,01±0,01
43	37,432	кверцетин	0,50±0,01
45	38,576	кемпферол	0,45±0,01

В результате исследования методом ВЭЖХ удалось определить доминирующие полифенолы в исследуемых образцах экстрактов hairy roots левзеи сафлоровидной. Идентифицированы флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, а также фитоэкдизон.

В образце № 7 содержание целевого БАВ – хлорогеновой кислоты было в среднем в 2,7 раза больше чем в образцах № 8 и № 9. Следовательно, среди всех рассматриваемых параметров экстракции для накопления кверцетина оптимально использовать параметры экстракции: экстрагент – 40,0 % водно-этанольный раствор, гидромодуль – 30:1, температура 70,0±2,0 °С, продолжительность 1,5 ч.

3.4 Выделение и очистка целевых БАВ с ААЗ из экстрактов hairy roots растений, изучение их биофункциональных свойств

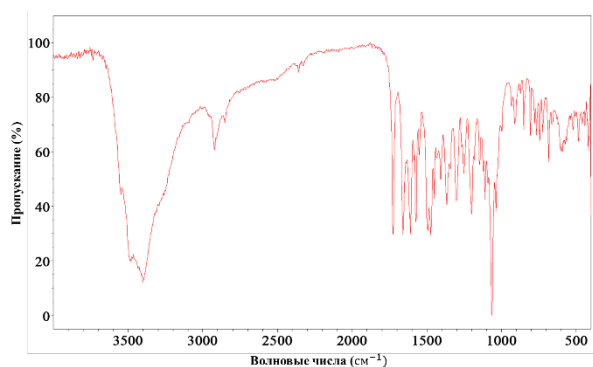
Из экстрактов hairy roots растений, проявляющих наибольшую АОА, методами хроматографии были выделены и очищены целевые БАВ: байкалин из экстракта № 2 hairy roots шлемника байкальского; кверцетин из экстракта № 4 hairy roots копеечника забытого; хлорогеновая кислота из экстракта № 7 hairy roots левзеи сафлоровидной. Извлечение и очистка БАВ из экстрактов биомассы hairy roots соответствующих растений представлена на схеме, отраженной на рисунке 3.4.1.



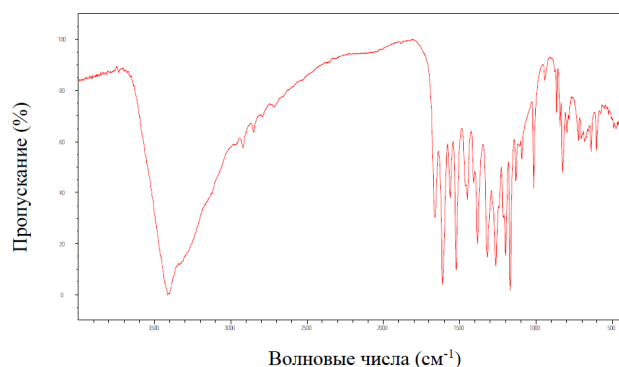
Рисунок 3.4.1 – Схема извлечения и очистки БАВ из экстрактов hairy roots:
а) шлемника байкальского; б) левзеи сафлоровидной; в) копеечника забытого

Применение схемы извлечения и очистки целевых БАВ, выделенных из экстрактов биомассы hairy roots шлемника байкальского, левзеи сафлоровидной и копеечника забытого, позволило получить индивидуальные БАВ со степенью очистки не менее 97,0 %.

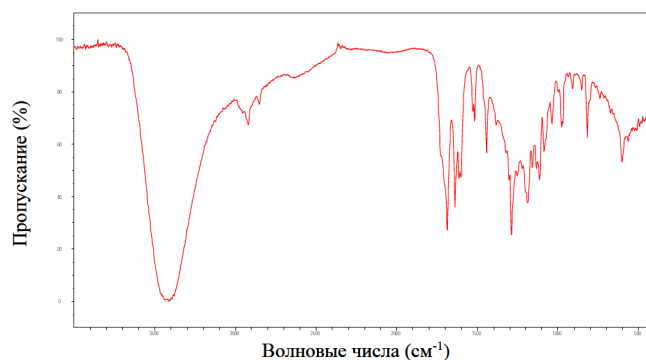
Результаты идентификации выделенных индивидуальных веществ из экстрактов hairy roots растений представлены на рисунках 3.4.2, 3.4.3.



а)

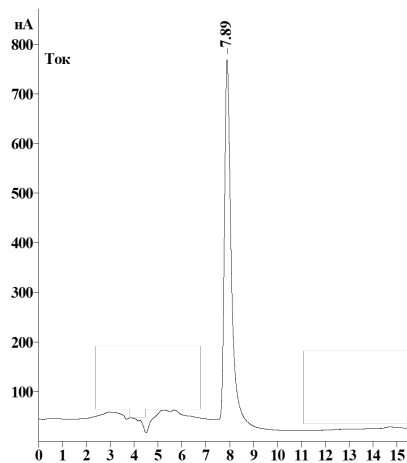


б)

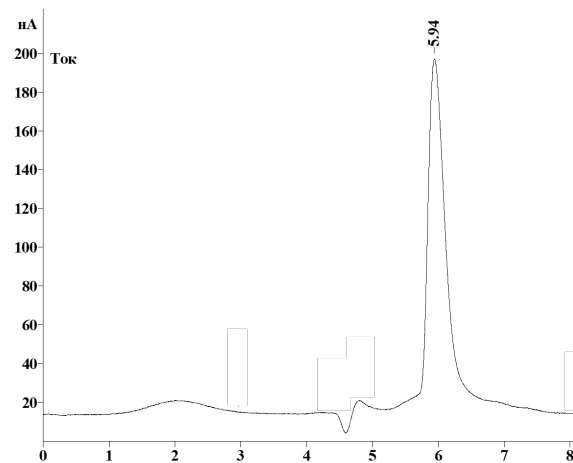


в)

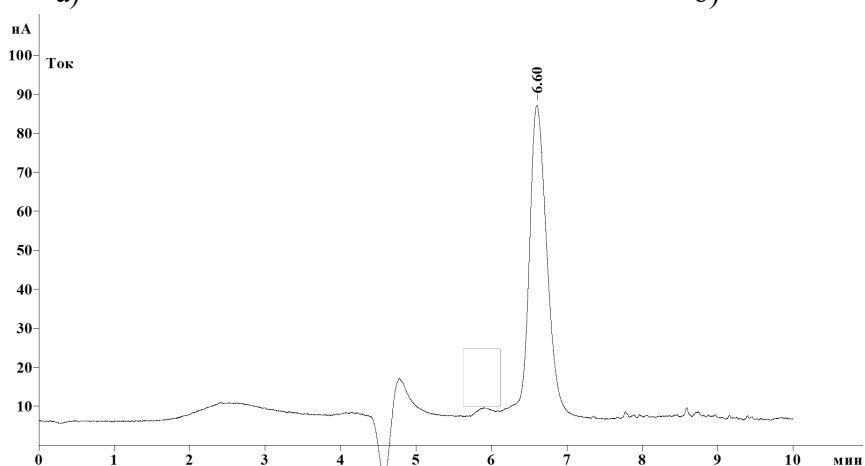
Рисунок 3.4.2 – ИК-спектр: а) байкалина, выделенного из водно-этанольного экстракта № 2 hairy roots шлемника байкальского; б) кверцетина, выделенного из экстракта № 4 hairy roots копеечника забытого; в) хлорогеновой кислоты, выделенной из экстракта № 7 hairy roots левзеи сафлоровидной



а)



б)



в)

Рисунок 3.4.3 – ВЭЖ-хроматограмма целевых БАВ, выделенных из экстрактов hairy roots: а) байкалин; б) кверцетин; в) хлорогеновая кислота

Выделенные и очищенные БАВ представляли собой кристаллические вещества байкалина, имеющего желтый цвет, кверцетина – красно-желтый цвета и бесцветной хлорогеновой кислоты.

Подобранные параметры экстракции биомассы hairy roots позволяют получить наибольший выход целевых БАВ, идентичных веществам, представленным на рынке, полученных в ходе химического синтеза. Следовательно, целесообразно использовать биомассу hairy roots в качестве сырья для извлечения БАВ, являющейся альтернативой традиционного растительного сырья.

Для оценки биоактивности целевых БАВ готовили стоковые растворы в ДМСО концентрацией 10 мМ. Для оценки влияния БАВ на модельный организм *C. elegans* готовили растворы концентрацией 2000 мкМ, 1000 мкМ, 500 мкМ и 100 мкМ (в дистиллированной воде).

Результаты влияния исследуемых БАВ различной концентрации на продолжительность жизни нематод представлены на рисунке 3.4.4.

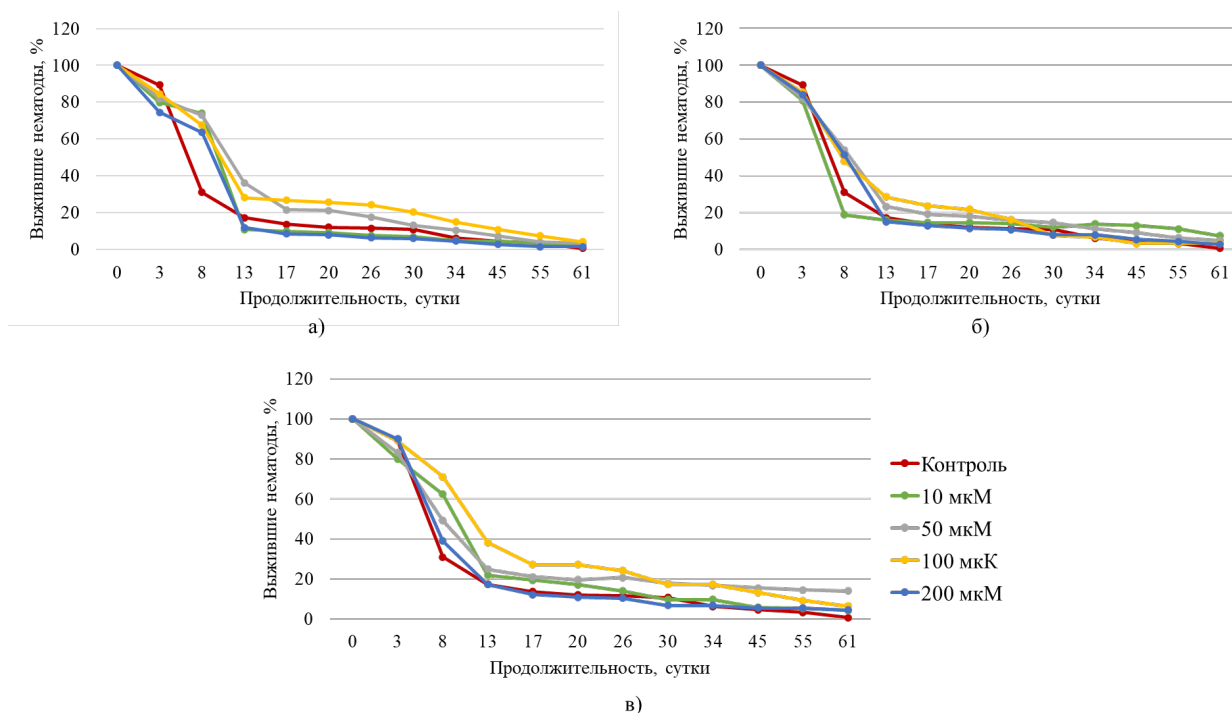


Рисунок 3.4.4 – Влияние растворов целевых БАВ на продолжительность жизни нематод: а) кверцетина; б) байкалина; в) хлорогеновой кислоты

Все исследуемые растворы БАВ различной концентрации влияют на продолжительность жизни нематод. Результаты показали, что среди всех исследуемых концентраций растворов БАВ (10, 50, 100, 200 мкМ), растворы с концентрацией 100 мкМ оказывали наиболее выраженную способность увеличивать продолжительность жизни нематод (рисунок 3.4.5).

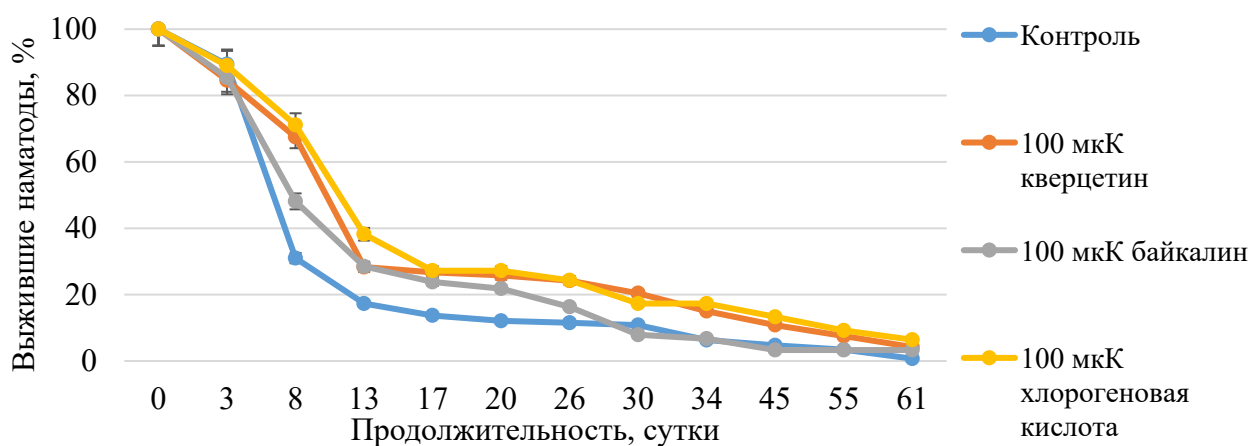
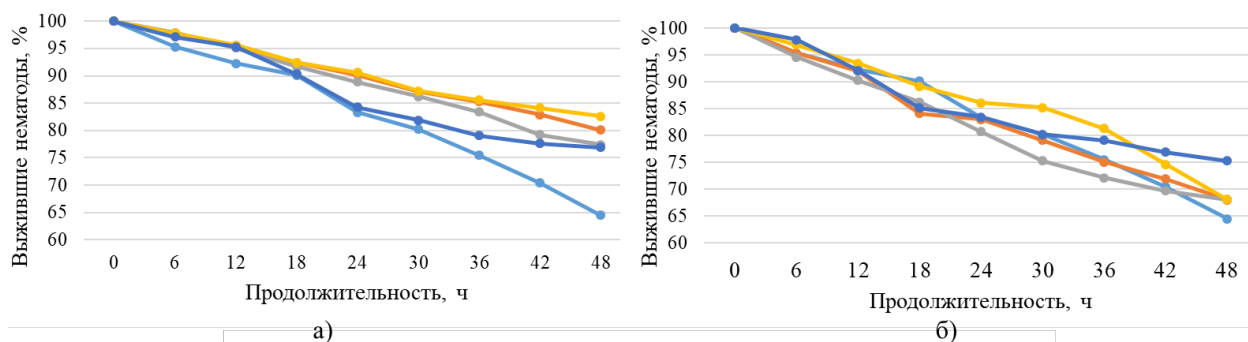


Рисунок 3.4.5 – Влияние растворов БАВ, которые оказывали наиболее выраженную способность увеличивать продолжительность жизни нематод

Раствор 100 мкМ хлорогеновой кислоты увеличивал продолжительность жизни нематод, в сравнении с другими растворами БАВ и контролем, выращивание без внесения исследуемого раствора, – процент выживших на 61 сутки был выше в 1,50–9,10 раз.

Результаты показали, что все исследуемые растворы кверцетина и хлорогеновой кислоты увеличивали процент выживаемости нематод в условиях окислительного стресса (рисунок 3.4.6).



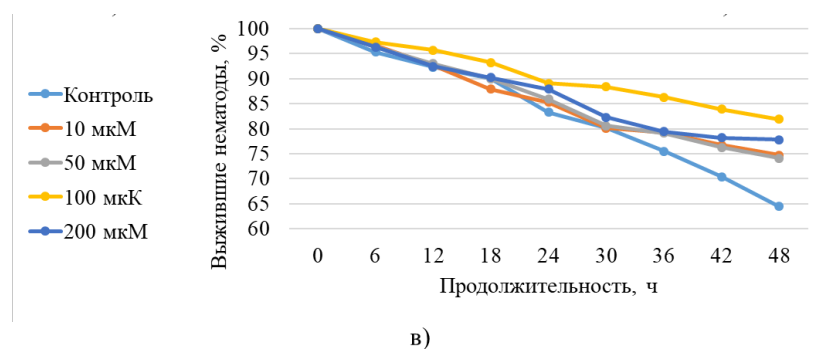


Рисунок 3.4.6– Влияние растворов БАВ на выживаемость нематод при окислительном стрессе: а) кверцетина; б) байкалина; в) хлорогеновой кислоты

В сравнении с контролем, процент выживаемости был в 1,3 раза выше на 48 ч эксперимента при добавлении 100 мкМ кверцетина и 100 мкМ хлорогеновой кислоты. Растворы байкалина концентрацией 100 мкМ и 200 мкМ увеличивали процент выживаемости нематод, в сравнении с контрольным образцом, – процент выживаемости выше в 1,1 раз.

Раствор 100 мкМ кверцетина увеличивал процент выживших нематод в условиях окислительного стресса. Процент выживших через 24 ч и 48 ч был выше в среднем в 1,00–1,08 раза, в сравнении с растворами других БАВ и контролем (рисунок 3.4.7).

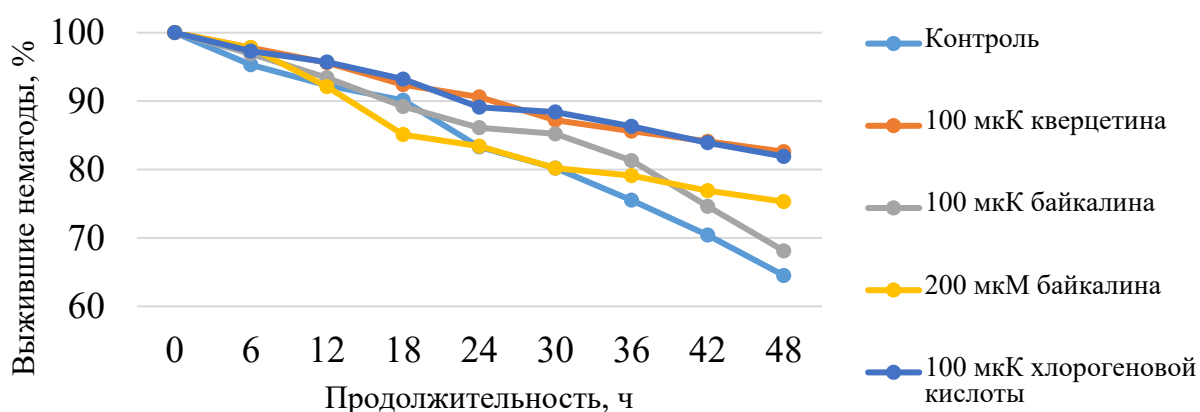


Рисунок 3.4.7 – Влияние растворов БАВ, максимально увеличивающих процент выживших нематод в условиях окислительного стресса

На рисунке 3.4.8 представлены результаты оценки влияния исследуемых растворов БАВ различной концентрации на экспрессию *SOD-3*.

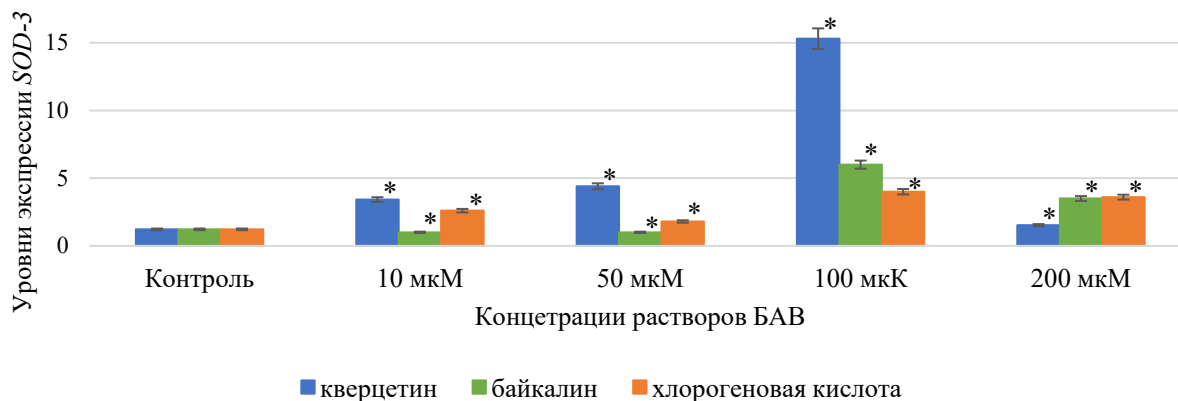


Рисунок 3.4.8 – Влияние исследуемых растворов БАВ на экспрессию *SOD-3*: значения для растворов байкалина от 10 до 100 мкМ представлены в 10^{-2} , для 200 мкМ в 10^{-1} ; для хлорогеновой кислоты концентрация 10, 50 и 200 мкМ – 10^{-1} , для 100 мкМ – 10^{-2} ; «*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Полученные данные свидетельствуют, что раствор кверцетина концентрацией 100 мкМ приводит к увеличению экспрессии *SOD-3* – примерно в 12,5 раза, в сравнении с контролем (значение экспрессии 1,22).

Результаты влияния растворов БАВ на изменения липидных включений в телах нематод отражены на рисунке 3.4.9.

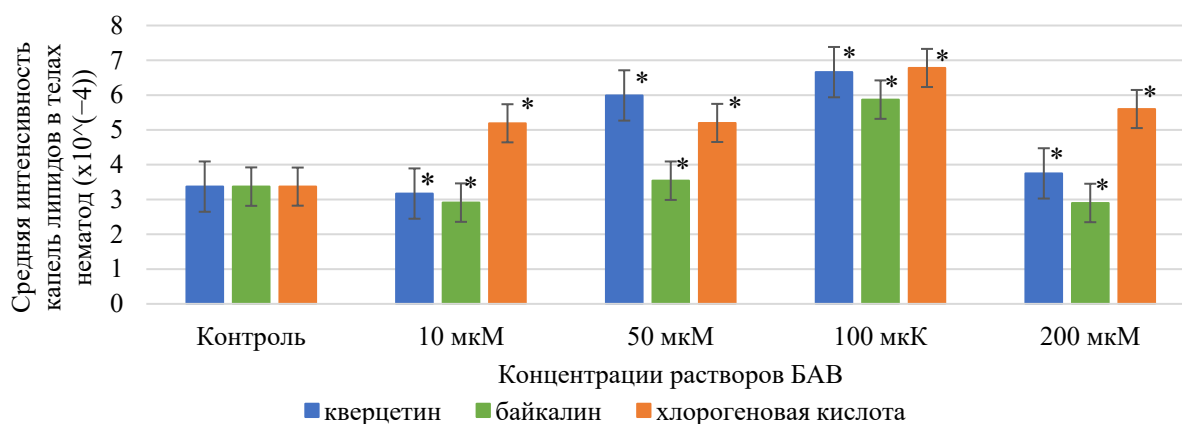


Рисунок 3.4.9 – Влияние исследуемых растворов БАВ на накопление липидных включений в телах нематод; «*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Полученные результаты показали, что растворы байкалина (10 мкМ и 200 мкМ) снижают содержание липидных включений в телах нематод. В сравнении с контрольными образцами, снижение липидных включений в среднем было больше в 1,16 раз.

Определяли АОА и влияние целевых БАВ для того, чтобы их использовать в качестве компонентов ФПД профилактической направленности, нормализующих работу микробиоты ЖКТ и проявляющих АОА. Для оценки биоактивности готовили 1,0 М стоковый раствор БАВ в 70 % водно-этанольном растворе. С помощью разведения в воде готовили растворы БАВ концентрациями 1000 мкМ, 800 мкМ, 600 мкМ, 400 мкМ, 200 мкМ. АОА растворов целевых БАВ отражены в таблице 3.4.1.

Таблица 3.4.1 – АОА (%) растворов исследуемых БАВ

Концентрация растворов	Байкалин	Хлорогеновая кислота	Кверцетин	Витамин С (контроль)
1000 мкМ	54,18±1,53	39,00±1,20*	67,69±2,59*	50,89±1,59
800 мкМ	45,40±1,45*	36,91±1,05	66,43±2,33*	40,03±1,23
600 мкМ	34,12±1,02	24,09±1,09*	57,38±2,28*	37,28±1,55
400 мкМ	22,84±0,80*	22,01±0,51*	49,44±2,04*	19,67±0,57
200 мкМ	8,91±0,21*	13,93±0,43*	29,53±1,45*	18,16±0,56

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

В ходе работы установлено, что растворы БАВ (растворитель – 70 % водно-этанольная смесь) различной концентрации проявляют АОА, которая схожа с активностью контроля. АОА растворов кверцетина, в сравнении с активностью витамина С (контролем) и другими растворами БАВ, выше в среднем в 1,7 раз. АОА уменьшается в ряду, снижается в ряду кверцетин>байкалин>хлорогеновая кислота. Полученные данные также подтверждают, что активность растворов по улавливанию АВТС-радикала ВТС-радикала возрастает по мере увеличения концентрации БАВ в них, что не противоречит литературным данным.

Антимикробная активность растворов БАВ различной концентрации по отношению к условно-патогенным тест-штаммам представлена в таблице 3.4.2.

Таблица 3.4.2 – Результаты влияния исследуемых растворов БАВ на рост условно-патогенных тест-штаммов

БАВ	Зоны подавления роста, мм				
	Исследуемые концентрации БАВ				
Байкалин	1000 мкМ	800 мкМ	600 мкМ	400 мкМ	200 мкМ
<i>E. coli</i> В-6645	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	23,1±0,5*	18,1±0,6*
<i>B. subtilis</i> В-110	<30,0±1,1	<30,0±1,1	<30,0±1,1	<30,0±1,1	23,4±1,7*
<i>C. albicans</i> Y-3108	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	24,6±0,9
<i>K. pneumonia</i> К1 5054	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	23,5±1,0
<i>Ps. aeruginosa</i> В-6643	12,3±1,1*	12,2±1,0*	12,4±0,6*	12,9±1,7*	12,9±1,1*
Кверцетин	1000 мкМ	800 мкМ	600 мкМ	400 мкМ	200 мкМ
<i>E. coli</i> В-6645	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	24,4±1,4*	17,2±0,4*
<i>B. subtilis</i> В-110	22,9±0,4*	22,1±0,1*	21,9±0,4*	21,1±0,4*	17,3±0,5*
<i>C. albicans</i> Y-3108	23,0±0,2	23,1±0,1	22,8±0,2	22,1±0,2*	17,0±0,1*
<i>K. pneumonia</i> К1 5054	23,1±1,1	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	<30,0±1,1*	17,2±0,2*
<i>Ps. aeruginosa</i> В-6643	12,1±0,5*	12,1±0,6*	12,8±1,2*	11,9±1,2*	12,1±1,1*
Хлорогеновая кислота	1000 мкМ	800 мкМ	600 мкМ	400 мкМ	200 мкМ
<i>E. coli</i> В-6645	24,5±1,6	24,4±1,3	23,1±1,2	17,1±1,4*	15,1±1,6*
<i>B. subtilis</i> В-110	<30,0±1,1	<30,0±1,1	26,4±1,6	24,5±1,6	22,3±0,3*
<i>C. albicans</i> Y-3108	12,6±1,2*	12,2±0,9*	12,9±0,1*	12,2±1,2*	12,1±1,8*
<i>K. pneumonia</i> К1 5054	12,1±1,2*	12,1±1,5*	12,6±1,0*	12,9±2,5*	12,6±0,7
<i>Ps. aeruginosa</i> В-6643	12,5±1,1*	12,5±2,5*	12,6±2,1*	12,9±2,0*	12,2±0,4*

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Растворитель – 70 % водно-этанольный раствор, проявлял слабую / среднюю антимикробную активность, зона ингибирования роста тест-штаммов была в пределах от 12,1±1,1 до 18,1 ±0,6 мм.

Результаты показали, что антимикробная активность растворов возрастает при увеличении концентрации БАВ в растворе. Наилучшую способность подавлять жизнедеятельность наибольшего количества условно-патогенных тест-штаммов, используемых в исследовании, проявляют растворы байкалина. По отношению к *Ps. aeruginosa* В-6643 и *K. pneumonia* К1 5054 все исследуемые БАВ не проявляют активность, так как полученные результаты, предположительно, влияние растворителя. Исключение составляют растворы байкалина, подавляющие рост *K. pneumonia* К1 5054.

Результаты влияния исследуемых растворов БАВ на рост представителей микробиоты ЖКТ потребителей показали, что, в сравнении с контролем, растворитель (70,0 % водно-этанольный раствор) и растворы целевых БАВ на его основе подавляли рост микроорганизмов. На рисунках 3.4.10–3.5.12 отражено влия-

ние растворов концентрацией 1000 мкМ и 200 мкМ. Результаты влияния растворов 800 мкМ, 600 мкМ и 400 мкМ аналогичны представленным.

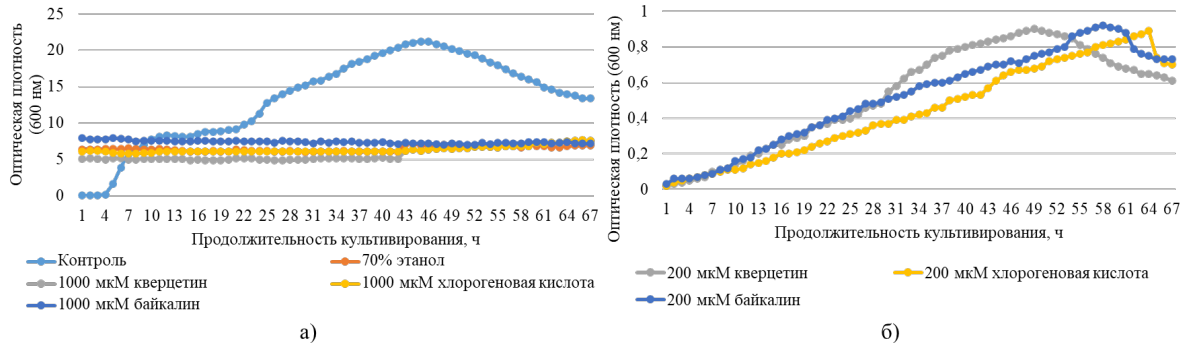


Рисунок 3.4.10 – Влияние растворов БАВ концентрацией 1000 мкМ и 200 мкМ на *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*)

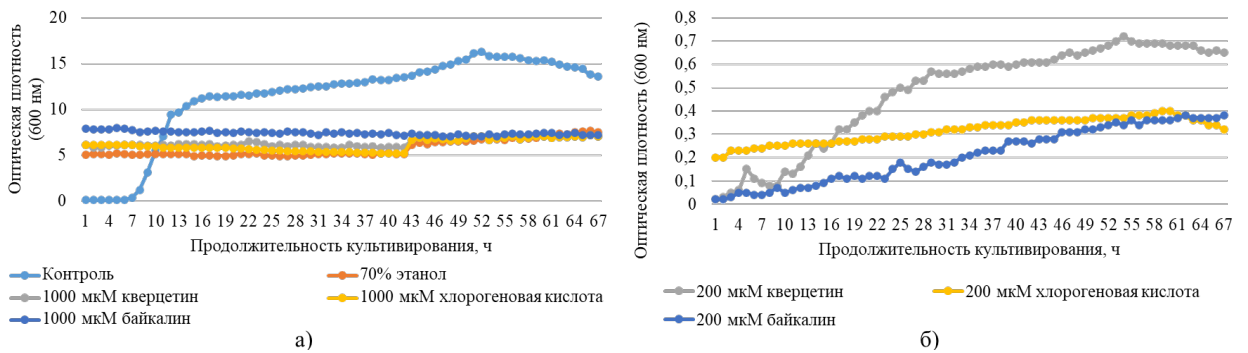


Рисунок 3.4.11 – Влияние растворов БАВ концентрацией 1000 мкМ и 200 мкМ на *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*); в) *Streptococcus* (*S. salivarius*, *S. agalactiae*, *S. thermophilus*)

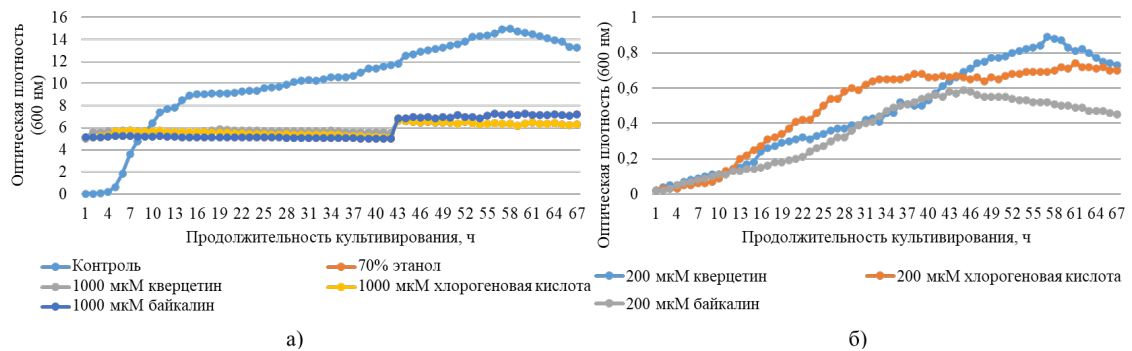


Рисунок 3.4.12 – Влияние растворов БАВ концентрацией 1000 мкМ и 200 мкМ на *Streptococcus* (*S. salivarius*, *S. agalactiae*, *S. thermophilus*)

В результате все спиртовые растворы целевых БАВ подавляли жизнедеятельность представителей нормальной микробиоты ЖКТ добровольцев. Следовательно, для оценки биоактивности растворов БАВ необходимы доклинические эксперименты *in vivo*, используя модельные объекты, имеющие пищеварительную систему (грызуны и т. п.).

Таким образом, установлено, что целевые растворы БАВ проявляют АОА, способность подавлять жизнедеятельность условно-патогенных штаммов, влияют на продолжительность жизни, выживаемость в стрессовых условиях, экспрессию гена антиоксидантной защиты *SOD-3*, изменения количества липидных включений в телах модельных организмов – *C. elegans*. Следовательно, выделенные БАВ целесообразно использовать в качестве ФПИ профилактической направленности.

ГЛАВА 4 ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1 Формирование пробиотических консорциумов с антиатеросклеротическим потенциалом

Для формирования ФПД профилактической направленности с ААЗ потенциалом необходимо чтобы в состав входили ФПИ, стимулирующие работу нормальных и подавляющие условно-патогенных представителей микробиоты ЖКТ; устойчивых к действию антибиотиков, неблагоприятных условий ЖКТ, проявляющих АОА и способность снижать уровень холестерина *in vitro*. Антимикробная активность исследуемых молочнокислых бактерий по отношению к условно-патогенным штаммам отражена в таблицах 4.1.1–4.1.4.

Контрольным образцом являлась дистиллированная вода, добавляемая в лунки. Размер зон ингибирования при добавлении воды равнялся $0,0 \pm 0,0$ мм для всех результатов, представленных в таблицах раздела 4.1.

Таблица 4.1.1 – Антимикробная активность исследуемых штаммов рода *Lactobacillus* по отношению к условно-патогенным тест-штаммам

Тест-штамм	Антибиотик	Диаметр зон подавления роста, мм					
		<i>L. acidophilus</i>			<i>L. plantarum</i>		
		В-8634	В-3190	В-12025	В-11007	В-5772	В-2353
<i>E. coli</i> В-6645	Стрептомицин (25,2±0,4)	25,3 ±1,3	27,4 ±1,1	25,9 ±1,2	27,4 ±1,1	26,3 ±0,4	27,2 ±1,6
<i>B. subtilis</i> В-110	Ванкомицин (28,8±0,9)	28,9 ±1,1	31,2 ±1,2	29,6 ±1,3	30,4 ±1,7	27,9 ±0,6	28,1 ±1,8
<i>C. albicans</i> У-3108	Стрептомицин (24,9±0,8)	27,9 ±0,6*	30,3 ±1,1*	28,5 ±1,3	29,2 ±1,6	27,3 ±0,9	23,4 ±0,9
<i>K. pneumonia</i> К1 5054	Цефалоспорин (24,5±0,7)	10,9 ±0,9*	11,6 ±1,3*	11,3 ±0,6*	11,7 ±1,1*	10,0 ±1,0*	9,8 ±1,1*
<i>Ps. aeruginosa</i> В-6643	Ципрофлоксацин (26,7±0,7)	26,9 ±1,2	27,4 ±1,2	25,6 ±1,4	28,6 ±1,1	27,1 ±1,4	24,3 ±0,3*

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Таблица 4.1.2 – Антимикробная активность исследуемых штаммов рода *Lactobacillus* по отношению к условно-патогенным тест-штаммам

Тест-штамм	Диаметр зон подавления роста, мм							
	Антибиотик	<i>L. fermentum</i> B-7574	<i>L. casei</i> B-9227	<i>L. paracasei</i> B-6253	<i>L. helveticus</i> B-8636	<i>L. brevis</i>		
						B-6338	B-2429	B-10903
<i>E. coli</i> B-6645	Стрептомицин (25,2±0,4)	29,0 ±1,9	27,8 ±1,6	27,4 ±1,9	27,5 ±1,3	20,3 ±1,2*	21,1 ±0,8*	21,0 ±1,0*
<i>B. subtilis</i> B-110	Ванкомицин (28,8±0,9)	29,5 ±1,6	27,9 ±1,3	26,4 ±1,1	26,6 ±0,9	23,3 ±1,0*	21,9 ±1,2*	23,0 ±1,3*
<i>C. albicans</i> Y-3108	Стрептомицин (24,9±0,8)	31,4 ±1,1*	30,8 ±1,6*	30,2 ±1,2*	29,9 ±1,3*	19,2 ±1,2*	19,6 ±1,3*	20,1 ±1,6
<i>K. pneumonia</i> K1 5054	Цефалоспориин (24,5±0,7)	18,8 ±1,2*	10,9 ±1,0*	11,2 ±1,8*	12,1 ±1,9*	10,1 ±1,3*	9,9 ±0,5*	10,8 ±1,0*
<i>Ps. aeruginosa</i> B-6643	Ципрофлоксацин (26,7±0,7)	28,1 ±1,4	25,1 ±2,3	24,9 ±1,1	24,2 ±0,9	18,2 ±1,1*	19,6 ±1,2*	19,7 ±1,1*

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

По отношению к *K. pneumonia* K1 5054 объекты исследования проявляли среднюю / слабую антимикробную активность, в сравнении с цефалоспорином. Виды *L. acidophilus*, *L. plantarum*, и *L. fermentum*, *L. casei* проявляли высокую антимикробную активность по отношению к *E. coli* B-6645, *B. subtilis* B-110, *C. albicans* Y-3108 и *Ps. aeruginosa* B-6643. В сравнении с соответствующими антибиотиками, активность была в 1,1 единицу ниже.

Таблица 4.1.3 – Антимикробная активность исследуемых штаммов рода *Bifidobacterium*, *Enterococci* и *Streptococcus* по отношению к условно-патогенным тест-штаммам

Тест-штамм	Диаметр зон подавления роста, мм						
	Антибиотик	<i>B. animalis</i> AC-1560	<i>B. bifidum</i>		<i>E. faecium</i> B-5000	<i>S. thermophilus</i>	
			AC-1779	AC-1579		B-2011	B-5392
<i>E. coli</i> B-6645	Стрептомицин (25,2±0,4)	26,8 ±1,4	21,3 ±1,3*	31,7 ±1,4*	19,3 ±1,3*	20,9 ±1,1*	31,0 ±1,4

Продолжение таблицы 4.1.3

Тест-штамм	Антибиотик	Диаметр зон подавления роста, мм					
		<i>B. animalis</i> AC-1560	<i>B. bifidum</i>		<i>E. faecium</i> B-5000	<i>S. thermophilus</i>	
			AC-1779	AC-1579		B-2011	B-5392
<i>B. subtilis</i> B-110	Ванкомицин (28,8±0,9)	30,4 ±1,3	22,8 ±0,9*	28,3 ±0,9	20,1 ±1,3*	23,6 ±1,6*	26,8 ±1,7
<i>C. albicans</i> Y-3108	Стрептомицин (24,9±0,8)	30,2 ±1,3*	29,2 ±1,6	31,8 ±1,1*	21,3 ±1,1	20,9 ±1,2	27,7 ±1,1
<i>K. pneumonia</i> K1 5054	Цефалоспорин (24,5±0,7)	11,6 ±1,2*	10,2 ±1,3*	11,6 ±1,2*	11,0 ±1,0*	10,9 ±0,9*	12,5 ±1,6*
<i>Ps. aeruginosa</i> B-6643	Ципрофлоксацин (26,7±0,7)	30,6 ±1,1*	25,6 ±1,3	25,2 ±1,2	21,5 ±1,6*	28,3 ±1,6	31,4 ±1,3*

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Высокую антимикробную активность к большему числу тест-штаммов проявляли *B. animalis* AC-1560, *B. bifidum* AC-1579, *S. thermophilus* B-5392.

Таблица 4.1.4 – Антимикробная активность исследуемых штаммов рода *Propionibacterium* по отношению к условно-патогенным штаммам

Тест-штамм	Антибиотик	Диаметр зон подавления роста, мм						
		<i>P. freudenreichii</i>			<i>P. troenii</i>		<i>P. jensenii</i> B-6085	<i>P. shermanii</i> B-4891
		B-9653	B-9654	B-5592	B-6083	B-6080		
<i>E. coli</i> B-6645	Стрептомицин (25,2±0,4)	20,3 ±1,1*	20,9 ±0,9*	20,4 ±1,4*	19,9 ±0,5*	19,7 ±1,1*	23,1 ±1,3	24,1 ±1,6
<i>B. subtilis</i> B-110	Ванкомицин (28,8±0,9)	20,3 ±1,1*	20,9 ±1,1*	21,2 ±1,3*	21,1 ±1,5*	23,4 ±1,0*	22,8 ±1,3*	23,1 ±1,6*
<i>C. albicans</i> Y-3108	Стрептомицин (24,9±0,8)	20,3 ±1,1*	21,1 ±1,1*	21,9 ±1,2	22,3 ±1,1	20,9 ±0,9*	21,7 ±1,3	22,4 ±0,9
<i>K. pneumonia</i> K1 5054	Цефалоспорин (24,5±0,7)	11,0 ±1,3*	11,6 ±1,1*	10,3 ±1,2*	9,7 ±0,9*	8,6 ±0,9*	10,1 ±1,1*	6,9 ±0,5*
<i>Ps. aeruginosa</i> B-6643	Ципрофлоксацин (26,7±0,7)	20,3 ±1,1*	21,3 ±1,3*	22,6 ±1,6	21,9 ±1,3*	21,1 ±1,3*	23,1 ±2,1	20,9 ±1,1*

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Представители рода *Propionibacterium* в основном проявляли среднюю антимикробную активность по отношению к тест-штаммам.

Результаты устойчивости исследуемых молочнокислых штаммов к действию ряда антибиотиков отражены в таблицах 4.1.5–4.1.8.

Таблица 4.1.5 – Устойчивость исследуемых штаммов рода *Lactobacillus* к действию ряда антибиотиков

Антибиотик	Диаметр зон подавления роста, мм					
	<i>L. acidophilus</i>			<i>L. plantarum</i>		
	В-8634	В-3190	В-12025	В-11007	В-5772	В-2353
Стрептомицин	8,9±0,7	6,1±0,3	17,3±0,9	7,3±0,2	10,3±0,5	11,5±0,1
Тетрациклин	16,2±1,1	13,9±0,4	17,1±0,8	18,1±0,2	18,6±0,3	19,4±0,1
Ампициллин	8,2±0,9	5,0±0,5	5,3±0,5	9,2±0,2	21,6±0,5	21,7±0,2
Гентамицин	12,2±1,0	12,4±0,7	12,5±1,2	11,2±0,2	15,2±0,3	15,9±0,1
Хлорамфеникол	12,6±0,9	16,2±0,9	13,1±1,4	9,2±0,1	21,3±0,1	22,0±0,2

Штаммы *L. acidophilus* проявляют большую устойчивость к действию ампициллина, гентамицина, хлорамфеникола и тетрациклина, в сравнении с представителем *L. plantarum*. Представители *L. plantarum* проявляли большую устойчивость к действию стрептомицина. Так, среди представителей *L. acidophilus* к стрептомицину, тетрациклину, ампициллину наибольшую устойчивость проявлял *L. acidophilus* В-3190, к гентамицину и хлорамфениколу *L. acidophilus* В-8634. Среди *L. plantarum* наибольшую чувствительность к действию стрептомицина, тетрациклина.

Таблица 4.1.6 – Устойчивость исследуемых штаммов рода *Lactobacillus* к действию ряда антибиотиков

Антибиотик	Диаметр зон подавления роста, мм						
	<i>L. fermentum</i> В-7574	<i>L. casei</i> В-9227	<i>L. paracasei</i> В-6253	<i>L. helveticus</i> В-8636	<i>L. brevis</i>		
					В-6338	В-2429	В-10903
Стрептомицин	10,9±0,2	15,2±0,3	13,3±0,2	18,2±0,3	19,2±0,3	18,5±0,4	17,5±0,2
Тетрациклин	20,0±0,2	21,2±0,2	21,5±0,3	22,1±0,1	23,1±0,3	23,1±0,4	21,0±0,3
Ампициллин	19,8±0,1	18,2±0,2	20,3±0,4	20,4±0,5	19,9±0,3	21,0±0,4	20,9±0,4
Гентамицин	11,8±0,2	13,2±0,2	13,4±0,4	14,6±0,3	15,6±0,1	15,2±0,3	14,3±0,2
Хлорамфеникол	19,8±0,1	20,0±0,1	15,2±0,3	19,3±0,3	21,3±0,2	19,9±0,3	19,8±0,1

К стрептомицину устойчивость проявляют *L. fermentum* В-7574, *L. casei* В-9227, *L. paracasei* В-6253, промежуточную устойчивость *L. helveticus* В-8636 и представители *L. brevis*. К тетрациклину промежуточную устойчивость проявлял только *L. fermentum* В-7574, остальные штаммы были чувствительными к действию данного антибиотика. К ампициллину промежуточную устойчивость проявляли *L. fermentum* В-7574, *L. casei* В-9227, *L. brevis* В-6338 и В-10903, остальные были чувствительны. К гентамицину все исследуемые штаммы проявляли промежуточную устойчивость. К хлорамфениколу только *L. casei* В-9227 и *L. brevis* В-6338 были чувствительны, остальные проявляли промежуточную устойчивость.

Таблица 4.1.7 – Устойчивость исследуемых штаммов рода *Bifidobacterium*, *Enterococcus* и *Streptococcus* к действию ряда антибиотиков

Антибиотик	Диаметр зон подавления роста, мм					
	<i>B. animalis</i> АС-1560	<i>B. bifidum</i>		<i>E. faecium</i> В-5000	<i>S. thermophilus</i>	
		АС-1779	АС-1579		В-2011	В-5392
Стрептомицин	17,5±0,4	16,2±0,2	12,0±0,1	18,3±0,1	12,1±0,2	15,3±0,2
Тетрациклин	5,7±0,2	16,4±0,1	7,6±0,2	21,3±0,1	24,2±0,2	8,2±0,4
Ампициллин	6,9±0,1	10,2±0,3	19,5±0,1	19,8±0,2	27,5±0,3	11,3±0,3
Гентамицин	11,6±0,1	19,3±0,3	8,2±0,3	13,9±0,1	20,4±0,3	10,9±0,3
Хлорамфеникол	18,2±0,2	18,3±0,4	19,6±0,2	22,9±0,2	23,5±0,3	12,3±0,4

К стрептомицину устойчивость проявляли *B. bifidum* АС-1579 и *S. thermophilus* В-5392, остальные проявляли промежуточную устойчивость к действию данного антибиотика. К тетрациклину устойчивость проявляли *B. animalis* АС-1560, *B. bifidum* АС-1579 и *S. thermophilus* В-5392, чувствителен был штамм *S. thermophilus* В-2011, остальные проявляли промежуточную чувствительность. К ампициллину устойчив только *B. animalis* АС-1560, чувствителен штамм *S. thermophilus* В-2011, остальные проявляли промежуточную чувствительность. К гентамицину устойчивы *B. animalis* АС-1560, *B. bifidum* АС-1579 и *S. thermophilus* В-5392, чувствительны *B. bifidum* АС-1779 и *S. thermophilus* В-2011, остальные про-

являли промежуточную чувствительность. К хлорамфениколу устойчив *B. bifidum* AC-1579, чувствительны *E. faecium* B-5000 и *S. thermophilus* B-2011, остальные проявляли промежуточную чувствительность.

Таблица 4.1.8 – Устойчивость исследуемых штаммов рода *Propionibacterium* к действию ряда антибиотиков

Антибиотик	Диаметр зон подавления роста, мм						
	<i>P. freudenreichi</i>			<i>P. troenii</i>		<i>P. jensenii</i> B-6085	<i>P. shermanii</i> B-4891
	B-9653	B-9654	B-5592	B-6083	B-6080		
Стрептомицин	18,6±0,2	17,9±0,1	21,2±0,2	20,2±0,3	21,01±0,4	19,8±0,3	18,7±0,5
Тетрациклин	20,0±0,2	26,3±0,2	22,9±0,5	24,2±0,2	20,9±0,1	22,8±0,1	21,1±0,5
Ампициллин	15,2±0,3	16,3±0,1	13,3±0,2	11,2±0,4	10,9±0,1	19,9±0,5	12,1±0,1
Гентамицин	16,2±0,2	16,4±0,3	16,8±0,2	17,0±0,1	18,2±0,1	17,6±0,6	17,2±0,3
Хлорамфеникол	22,1±0,1	22,3±0,1	22,5±0,2	21,9±0,5	21,8±0,1	21,2±0,6	21,3±0,8

К стрептомицину и ампициллину промежуточную устойчивость проявляли все исследуемые штаммы. К тетрациклину промежуточную устойчивость проявляли *P. freudenreichi* B-9653, *P. troenii* B-6080 и *P. shermanii* B-4891, остальные были чувствительны. К гентамицину и хлорамфениколу все штаммы были чувствительны.

Анализ антимикробной активности показал, что целесообразно для формирования ПК использовать штаммы *L. acidophilus* B-3190, *L. acidophilus* B-12025, *L. plantarum* B-11007, *L. fermentum* B-7574, *B. animalis* AC-1560, *B. bifidum* AC-1579, *S. thermophilus* B-5392.

Результаты биосовместимости исследуемых штаммов по отношению к представителям микробиоты ЖКТ представлены в таблице 4.1.9. Для стимулирования роста микроорганизмов рода *Streptococcus* оптимальны штаммы *L. fermentum* B-7574, *B. animalis* AC-1560 и *S. thermophilus* B-5392; для стимулирования роста микроорганизмов рода *Lactobacillus* – *L. acidophilus* B-12025, *L. plantarum* B-11007, *B. animalis* AC-1560 и

B. bifidum AC-1579; для стимулирования роста микроорганизмов рода *Bifidobacterium* – все исследуемые штаммы, кроме *S. thermophiles* B-5392.

Таблица 4.1.9 – Результаты биосовместимости молочнокислых бактерий по отношению к представителям нормальной микрофлоры ЖКТ добровольцев

Консорциумы	<i>L. acidophilus</i>		<i>L. plantarum</i> B-11007	<i>L. fermentum</i> B-7574	<i>B. animalis</i> AC-1560	<i>B. bifidum</i> AC-1579	<i>S. thermophilus</i> B-5392
	B-3190	B-12025					
<i>Bifidobacterium</i> (<i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>)	+	+	+	+	+	+	±
<i>Lactobacillus</i> (<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i>)	±	+	+	±	+	+	±
<i>Streptococcus</i> (<i>S. salivarius</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. thermophilus</i>)	±	±	±	+	+	±	+

Оценка устойчивости исследуемых штаммов к неблагоприятным условиям ЖКТ отражена в таблицах 4.1.10 и 4.1.11.

Таблица 4.1.10 – Устойчивость исследуемых штаммов к pH среды

Исследуемые штаммы	Выживаемость клеток (%)											
	30 мин			60 мин			90 мин			120 мин		
	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4
<i>L. acidophilus</i> B-3190	73,2 ±1,0	85,6 ±0,4	86,1 ±1,0	71,3 ±0,9	81,1 ±0,4	94,1 ±0,9	67,2 ±0,1	79,3 ±0,5	89,3 ±0,4	68,1 ±1,1	74,1 ±0,9	81,3 ±0,2
<i>L. acidophilus</i> B-12025	72,3 ±1,2	80,3 ±1,4	83,4 ±1,1	70,7 ±1,1	82,8 ±1,4	90,1 ±1,0	65,5 ±1,1	74,1 ±1,2	80,4 ±1,1	67,3 ±1,6	72,2 ±1,2	80,9 ±0,9
<i>L. plantarum</i> B-11007	72,0 ±0,2	85,3 ±0,7	86,1 ±0,3	66,3 ±0,2	79,5 ±0,6	89,9 ±0,1	64,3 ±0,6	75,9 ±0,1	85,1 ±0,6	62,3 ±0,8	73,9 ±0,3	80,8 ±0,1
<i>L. fermentum</i> B-7574	70,2 ±0,8	80,4 ±0,5	92,2 ±0,2	65,3 ±0,5	69,1 ±0,8	76,0 ±0,4	89,9 ±0,2	63,9 ±0,9	84,2 ±0,1	61,1 ±0,1	62,9 ±0,4	75,9 ±0,1
<i>B. animalis</i> AC-1560	61,2 ±0,7	66,4 ±0,4	88,2 ±0,2	75,0 ±0,9	71,6 ±0,2	80,9 ±0,4	70,8 ±0,1	79,9 ±0,3	75,8 ±0,3	65,1 ±1,1	74,9 ±0,2	69,8 ±0,1

Продолжение таблицы 4.1.10

Исследуемые штаммы	Выживаемость клеток (%)											
	30 мин			60 мин			90 мин			120 мин		
	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4
<i>B. bifidum</i> AC-1579	60,2 ±0,2	72,3 ±0,1	83,2 ±0,5	52,3 ±0,4	65,4 ±0,3	75,3 ±0,5	48,8 ±0,3	62,1 ±0,6	70,8 ±0,2	63,2 ±0,7	59,3 ±0,7	62,4 ±0,9
<i>S. thermophilus</i> B-5392	75,1 ±1,6	88,2 ±0,8	83,9 ±0,2	72,1 ±0,2	85,3 ±0,6	89,9 ±0,2	68,1 ±0,6	70,9 ±0,1	82,4 ±0,9	65,3 ±0,9	70,1 ±0,5	75,9 ±1,3

Таблица 4.1.11 – Устойчивость исследуемых штаммов к желчи

Исследуемые штаммы	Выживаемость клеток (%)											
	30 мин			60 мин			90 мин			120 мин		
	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %
<i>L. acidophilus</i> B-3190	71,1 ±0,1	80,3 ±0,4	90,1 ±0,1	67,9 ±0,1	81,1 ±0,4	91,2 ±0,4	63,1 ±0,1	77,8 ±1,2	88,9 ±1,8	62,1 ±2,1	75,1 ±1,3	85,2 ±0,4
<i>L. acidophilus</i> B-12025	69,9 ±1,1	81,2 ±1,1	91,3 ±1,0	63,4 ±0,9	82,0 ±1,5	90,4 ±1,1	65,3 ±1,1	75,3 ±1,4	88,9 ±2,1	62,1 ±1,6	69,1 ±1,3	60,4 ±1,1
<i>L. plantarum</i> B-11007	74,1 ±0,2	88,0 ±0,3	96,4 ±0,3	72,1 ±0,1	85,1 ±0,3	91,8 ±0,1	68,0 ±0,3	81,0 ±0,1	89,8 ±0,1	64,0 ±0,3	78,0 ±0,2	87,0 ±0,4
<i>L. fermentum</i> B-7574	72,8 ±0,1	83,7 ±0,2	97,8 ±0,1	72,0 ±0,3	81,9 ±0,2	95,0 ±0,4	70,1 ±0,3	81,2 ±0,1	91,0 ±0,4	65,9 ±0,4	78,0 ±0,1	87,3 ±0,1
<i>B. animalis</i> AC-1560	71,2 ±0,2	81,1 ±0,5	89,5 ±0,1	70,1 ±0,2	80,9 ±0,1	89,3 ±0,1	65,1 ±0,2	76,0 ±0,1	84,6 ±0,2	63,0 ±0,1	70,9 ±0,1	81,0 ±0,1
<i>B. bifidum</i> AC-1579	71,0 ±0,1	81,2 ±0,4	94,0 ±0,1	67,9 ±0,2	78,3 ±0,1	91,0 ±0,5	66,1 ±0,4	71,9 ±0,1	83,9 ±0,2	63,2 ±0,1	67,0 ±0,5	72,1 ±0,2
<i>S. thermophilus</i> B-5392	71,0 ±0,1	83,0 ±0,1	94,0 ±0,1	70,1 ±0,2	83,1 ±0,4	82,1 ±0,2	66,1 ±0,2	66,9 ±0,2	79,0 ±0,4	64,6 ±0,2	68,0 ±0,2	75,1 ±0,3

Выбранные штаммы не теряли свою жизнеспособность при добавлении желчи различной концентрации и при низких значениях кислотности в течение 30–120 мин. Все штаммы выдерживали неблагоприятные условия ЖКТ, следовательно, их целесообразно использовать при разработке ПК.

Оценка способности выбранных молочнокислых бактерий снижать уровень холестерина *in vitro* отражена в таблице 4.1.12.

Таблица 4.1.12 – Изменения количества холестерина в среде, вызванные действием исследуемых штаммов

Штамм	Остаточный холестерин, мг/дл	Уровень холестерина, % от контроля
Контроль	346,3±1,5	–
<i>L. acidophilus</i> B-3190	323,0±1,7*	6,7±0,3
<i>L. acidophilus</i> B-12025	320,0±1,7*	7,6±0,2
<i>L. plantarum</i> B-11007	315,3±1,5*	9,0±0,4
<i>L. fermentum</i> B-7574	315,7±2,9*	8,8±0,3
<i>B. animalis</i> AC-1560	283,0±1,0*	18,3±0,3
<i>B. bifidum</i> AC-1579	271,7±7,2*	21,5±1,00
<i>S. thermophilus</i> B-5392	302,7±2,1*	12,6±0,5

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Установлено, что бифидобактерии, в сравнении с другими объектами исследования, обладали самой высокой способностью снижать холестерин. Способность *B. bifidum* AC-1579 снижать холестерин выше в среднем в 2,3 раза, в сравнении с другими штаммами. Полученные данные не противоречили результатам аналогичных исследований, подтверждающих то, что у бифидобактерий выше способность снижать холестерин, в сравнении с лактобактериями [177].

АОА исследуемых штаммов представлена на рисунке 4.1.1.

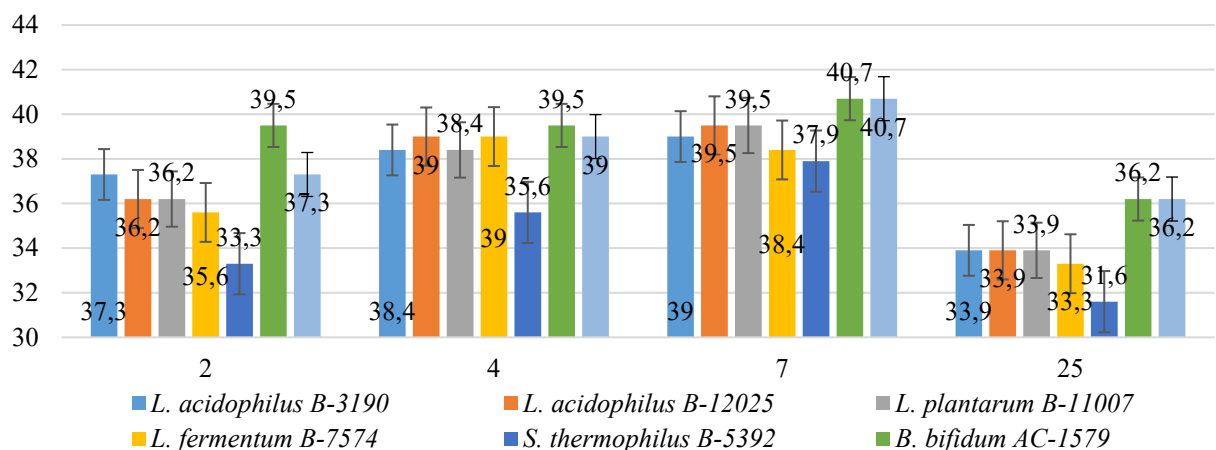


Рисунок 4.1.1 – АОА супернатантов исследуемых штаммов, %;

все представленные результаты статистически значимы ($p < 0,05$)

Все исследуемые штаммы обладали АОА. Установлено, что АОА в период экспоненциальной фазы роста имеет максимальные значения, которые соответствуют активности витамина С (контроля) концентрацией от 0,25 до 0,50 мг/см³. Данные результаты не противоречат литературным данным [17].

Результаты по оценке биосовместимости исследуемых молочнокислых бактерии друг по отношению к другу отражены в таблице 4.1.13.

Таблица 4.1.13 – Биосовместимость исследуемых штаммов

	<i>L. acidophilus</i> B-3190	<i>L. acidophilus</i> B-12025	<i>L. plantarum</i> B-11007	<i>L. fermentum</i> B-7574	<i>B. animalis</i> AC-1560	<i>B. bifidum</i> AC-1579	<i>S. thermophilus</i> B-5392
<i>L. acidophilus</i> B-3190	X	+	+	±	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> B-12025	+	X	+	±	+	+	-
<i>L. plantarum</i> B-11007	+	+	X	+	+	+	±
<i>L. fermentum</i> B-7574	±	±	+	X	+	+	+
<i>B. animalis</i> AC-1560	+	+	+	+	X	+	+
<i>B. bifidum</i> AC-1579	+	+	+	+	+	X	±
<i>S. thermophilus</i> B-5392	-	-	±	+	+	±	X

Оценка биосовместимости штаммов друг по отношению к другу позволила составить следующие ПК (в соотношении 1:1):

№ 1. *L. acidophilus* B-3190 + *L. plantarum* B-11007 + *B. animalis* AC-1560;

№ 2. *L. acidophilus* B-3190 + *L. plantarum* B-11007 + *B. bifidum* AC-1579;

№ 3. *L. acidophilus* B-12025 + *L. plantarum* B-11007 + *B. animalis* AC-1560;

№ 4. *L. acidophilus* B-12025 + *L. plantarum* B-11007 + *B. bifidum* AC-1579;

№ 5. *L. plantarum* B-11007 + *L. fermentum* B-7574 + *B. animalis* AC-1560;

№ 6. *L. plantarum* B-11007 + *L. fermentum* B-7574 + *B. bifidum* AC-1579;

№ 7. *S. thermophilus* B-5392 + *L. fermentum* B-7574 + *B. animalis* AC-1560.

№ 8. *L. acidophilus* B-3190 + *L. plantarum* B-11007 + *B. bifidum* AC-1579 + *B. animalis* AC-1560.

№ 9 *L. plantarum* B-11007 + *L. fermentum* B-7574 + *B. bifidum* AC-1579 + *B. animalis* AC-1560.

Оптимальное соотношение бактерий в разработанных ПК подбиралось в ранее опубликованных материалах [52; 49].

Результаты антимикробной активности составленных ПК по отношению к условно-патогенным тест-штаммам представлены в таблице 4.1.14.

Таблица 4.1.14 – Антимикробная активность ПК к тест-штаммам

Тест-штамм	Диаметр зон подавления роста, мм									
	Антибиотик	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9
<i>E. coli</i> B-6645	Стрептомицин (25,2±0,4)	27,3 ±1,3	29,2 ±1,0*	25,5 ±1,4	28,9 ±1,3	28,2 ±1,1	29,7 ±1,0*	28,9 ±1,1*	28,1 ±2,5	28,7± 2,2
<i>B. subtilis</i> B-110	Ванкомицин (28,8±0,9)	30,1 ±1,1	29,3 ±1,3	29,6 ±1,1	29,2 ±1,1	29,9 ±1,0	29,2 ±1,4	28,6 ±1,4	30,1 ±1,2	29,7± 1,0
<i>C. albicans</i> Y-3108	Стрептомицин (24,9±0,8)	29,8 ±1,0	30,4 ±1,4	28,9 ±1,6	29,3 ±1,3	30,1 ±0,9	30,1 ±1,3	30,1 ±1,3	30,4 ±1,1	30,7± 1,2
<i>K. pneumonia</i> K1 5054	Цефалоспорин (24,5±0,7)	11,5 ±0,9*	11,5 ±1,0*	11,1 ±1,0*	11,2 ±1,0*	15,2 ±1,4*	12,3 ±1,2*	17,2 ±1,4*	11,6± 0,1*	11,7± 0,2*
<i>Ps. aeruginosa</i> B-6643	Ципрофлоксацин (26,7±0,7)	28,3 ±1,2	26,7 ±1,6	29,3 ±0,9	27,1 ±1,2	29,1 ±1,0	26,6 ±1,4	30,8 ±1,0*	28,0 ±2,3	28,1± 2,2

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Все исследуемые консорциумы, аналогично штаммам, входящих в их состав, проявляли высокую активность по отношению к *E. coli* B-6645, *B. subtilis* B-110, *C. albicans* Y-3108 и *Ps. aeruginosa* B-6643; слабую активность по отношению *K. pneumonia* K1 5054, кроме консорциума № 7, проявляющего среднюю активность.

Результаты устойчивости консорциумов к действию антибиотиков отражены в таблице 4.1.15.

Таблица 4.1.15 – Устойчивость ПК к действию антибиотиков

Антибиотик	Диаметр зон подавления роста, мм								
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9
Стрептомицин	12,2 ±1,1	11,3 ±1,3	16,2 ±1,1	15,5 ±1,2	15,3 ±1,0	11,2 ±0,9	16,6 ±1,0	10,7 ±1,2	11,9 ±1,2

Продолжение таблицы 4.1.15

Антибиотик	Диаметр зон подавления роста, мм								
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9
Тетрациклин	15,6 ±1,2	16,2 ±1,4	17,1 ±1,1	16,2 ±1,6	16,5 ±1,3	18,9 ±1,1	18,2 ±1,1	11,3 ±1,7	12,9 ±1,2
Ампициллин	7,1 ±0,9	12,3 ±1,0	7,0 ±0,5	11,3 ±1,4	17,3 ±1,4	19,9 ±1,6	18,3 ±1,3	13,4 ±1,8	17,1 ±1,2
Гентамицин	11,3 ±1,2	10,6 ±1,1	11,3 ±1,1	9,2 ±1,0	11,5 ±1,0	10,9 ±1,4	11,8 ±0,8	12,9 ±1,6	14,2 ±1,2
Хлорамфеникол	17,2 ±1,3	17,6 ±1,2	13,6 ±1,0	14,4 ±1,3	17,7 ±1,1	19,2 ±1,3	19,2 ±1,2	19,6 ±1,9	20,5 ±1,9

Результаты показали, что преимущественно ПК обладали большей устойчивостью по отношению к ряду антибиотиков, в сравнении с отдельными штаммами, входящими в их состав. ПК № 1 проявлял устойчивость к четырем из пяти антибиотиков, используемых в исследовании.

Результаты биосовместимости ПК по отношению к представителям нормальной микробиоты ЖКТ представлены в таблице 4.1.16.

Таблица 4.1.16 – Результаты биосовместимости разработанных ПК по отношению к представителям микробиоты ЖКТ

Консорциумы	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9
<i>Bifidobacterium</i> (<i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> (<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus</i> (<i>S. salivarius</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. thermophilus</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Все составленные ПК проявляли биосовместимость, несмотря на то что часть штаммов, входящих в их состав, проявляла слабый антагонизм. Следовательно, все разработанные ПК оказывают положительное воздействие на рост ряда представителей микробиоты ЖКТ *in vitro*.

Результаты устойчивости ПК к неблагоприятным условиям ЖКТ отражены в таблицах 4.1.17 и 4.1.18.

Таблица 4.1.17 – Устойчивость ПК к различным уровням рН среды

Консорциум	Выживаемость клеток (%)											
	30 мин			60 мин			90 мин			120 мин		
	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4
№ 1	68,8 ±1,3	79,1 ±1,8	86,8 ±1,0	70,9 ±1,2	77,4 ±1,7	88,3 ±4,6	67,4 ±1,1	78,4 ±1,4	83,4 ±1,1	65,2 ±1,2	74,3 ±1,3	77,3 ±1,3
№ 2	68,5 ±1,4	81,1 ±1,1	85,1 ±2,1	63,3 ±1,5	75,3 ±1,1	86,4 ±2,4	60,1 ±2,4	72,4 ±2,4	81,7 ±1,9	64,5 ±1,8	69,1 ±1,7	74,8 ±1,6
№ 3	68,5 ±1,2	77,3 ±2,1	85,9 ±2,2	70,7 ±1,4	78,0 ±2,3	87,0 ±1,7	66,9 ±2,4	76,6 ±2,0	80,4 ±1,6	64,9 ±1,9	73,7 ±1,8	77,2 ±2,0
№ 4	68,2 ±1,3	79,3 ±2,3	84,2 ±2,0	63,1 ±1,3	75,9 ±1,4	85,1 ±5,0	59,5 ±1,9	70,7 ±2,3	78,8 ±2,5	64,3 ±2,2	68,5 ±2,0	74,7 ±1,3
№ 5	67,8 ±1,8	77,4 ±1,8	88,8 ±2,1	68,9 ±1,3	73,4 ±2,3	82,3 ±1,7	75,0 ±2,1	73,2 ±1,3	81,7 ±1,4	62,8 ±1,8	70,6 ±1,9	75,5 ±1,7
№ 6	67,5 ±2,3	79,3 ±2,4	87,2 ±2,1	61,3 ±1,8	71,3 ±3,7	80,4 ±1,7	67,7 ±1,5	67,3 ±1,2	80,0 ±2,1	62,2 ±1,0	65,4 ±1,8	73,0 ±1,9
№ 7	68,8 ±2,2	78,3 ±2,0	88,1 ±1,8	70,8 ±2,2	75,3 ±2,1	82,3 ±2,3	76,3 ±2,9	71,6 ±2,1	80,8 ±2,4	63,8 ±2,0	69,3 ±1,5	73,9 ±2,1
№ 8	66,4 ±1,9	76,1 ±1,3	85,2 ±2,4	66,1 ±1,1	74,8 ±3,7	84,1 ±2,9	62,4 ±1,0	73,0 ±2,3	78,0 ±3,8	64,5 ±1,1	70,1 ±1,3	73,5 ±1,7
№ 9	65,9 ±2,1	76,1 ±2,3	87,4 ±3,3	64,7 ±1,7	71,4 ±1,6	80,5 ±1,7	68,5 ±1,9	70,5 ±2,1	79,0 ±2,2	62,9 ±1,3	67,8 ±1,7	72,2 ±5,9

Таблица 4.1.18 – Устойчивость ПК к желчи различной концентрации в среде

Консорциум	Выживаемость клеток (%)											
	30 мин			60 мин			90 мин			120 мин		
	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %
№ 1	72,1 ±3,5	83,1 ±3,1	92,0 ±3,9	70,0 ±2,7	82,4 ±3,4	90,8 ±3,8	65,4 ±3,3	78,3 ±1,5	87,8 ±1,6	63,0 ±3,0	74,7 ±2,4	84,4 ±3,6
№ 2	72,1 ±1,9	83,2 ±2,5	93,5 ±2,9	69,3 ±2,9	81,5 ±3,1	91,3 ±4,5	65,7 ±1,7	76,9 ±2,0	87,5 ±2,5	63,1 ±3,4	73,4 ±3,9	81,4 ±4,0
№ 3	71,7 ±4,5	83,4 ±4,1	92,4 ±5,5	68,5 ±2,3	82,7 ±4,1	90,5 ±4,9	66,1 ±3,8	77,4 ±2,5	87,8 ±1,4	63,0 ±3,5	72,7 ±1,7	76,1 ±6,7
№ 4	71,7 ±2,7	83,5 ±2,5	93,9 ±3,7	67,8 ±4,9	81,8 ±1,6	91,1 ±2,7	66,5 ±1,7	76,1 ±3,3	87,5 ±2,1	63,1 ±1,7	71,4 ±5,2	73,2 ±5,1
№ 5	72,7 ±3,3	84,3 ±2,9	94,6 ±5,7	71,4 ±2,7	82,6 ±3,4	92,0 ±1,3	67,7 ±3,1	79,4 ±2,9	88,5 ±2,1	64,3 ±2,9	75,6 ±2,5	85,1 ±4,8
№ 6	72,6 ±2,9	84,3 ±3,1	96,1 ±2,2	70,7 ±2,7	81,8 ±2,6	92,6 ±4,9	68,1 ±2,5	78,0 ±2,3	88,2 ±2,7	64,4 ±2,1	74,3 ±3,1	82,1 ±4,7
№ 7	71,7 ±3,1	82,6 ±3,6	93,8 ±4,1	70,7 ±5,1	82,0 ±3,6	88,8 ±3,1	67,1 ±4,0	74,7 ±2,1	84,9 ±4,4	64,5 ±2,6	72,3 ±5,3	81,1 ±3,4
№ 8	71,9 ±3,8	82,7 ±4,2	92,5 ±5,1	69,5 ±4,4	81,4 ±3,2	90,8 ±5,0	65,6 ±4,4	76,7 ±3,2	86,8 ±3,3	63,1 ±2,7	72,8 ±2,9	81,3 ±2,1
№ 9	72,3 ±2,6	83,5 ±2,61	94,4 ±2,9	70,5 ±3,6	81,6 ±4,0	91,8 ±3,1	67,3 ±2,9	77,5 ±2,9	87,3 ±3,3	64,0 ±2,6	73,5 ±3,4	81,9 ±5,6

Исследуемые ПК не теряли свою жизнеспособность при низких значениях рН среды и при добавлении желчи различной концентрации в течение 30–120 мин.

Результаты по снижению холестерина *in vitro* исследуемыми ПК отражены в таблице 4.1.19.

Таблица 4.1.19 – Изменения количества холестерина в среде, вызванные действием исследуемых ПК

Штамм	Остаточный холестерин (мг/дл)	Уровень холестерина, % от контроля
Контроль	346,3±1,5	–
№ 1	283,9±2,3*	18,0±0,5
№ 2	284,2±2,5*	17,9±0,3
№ 3	289,7±2,1*	16,3±0,3
№ 4	285,3±2,7*	17,6±0,2
№ 5	295,2±2,1*	14,8±0,1
№ 6	282,1±2,31*	18,5±0,6
№ 7	300,6±2,0*	13,2±0,2
№ 8	278,3±2,8*	19,6±0,2
№ 9	286,4±7,5*	17,3±0,3

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Результаты показали, что максимальную способность снижать холестерин проявляли ПК № 1, № 6 и № 8 (их активность в среднем равнялась 18,7 %).

АОА разработанных ПК представлена на рисунке 4.1.2.

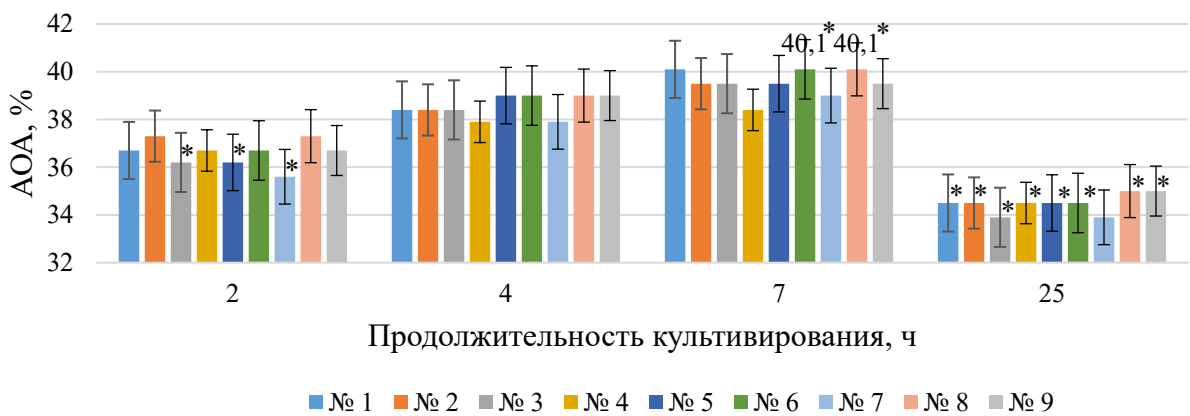


Рисунок 4.1.2 – АОА супернатантов разработанных ПК, %;

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Таким образом, все исследуемые ПК обладали АОА. Активность ПК № 6 и № 8 в экспоненциальной фазе роста принимала максимальные значения, в сравнении с активностью других ПК, – была выше в среднем в 1,2 раза.

После лиофилизации ПК представляли собой порошок молочного цвета, который хранили до момента использования при 5 °С.

Разработанные консорциумы № 1 (*L. acidophilus* В-3190 + *L. plantarum* В-11007 + *B. animalis* АС-1560), № 6 (*L. plantarum* В-11007 + *L. fermentum* В-7574 + *B. bifidum* АС-1579), № 8 (*L. acidophilus* В-3190 + *L. plantarum* В-11007 + *B. bifidum* АС-1579 + *B. animalis* АС-1560) проявляли наибольшую пробиотическую активность, АОА и способность снижать уровень холестерина, следовательно, на основе данных ПК будут формироваться СД.

4.2 Формирование синбиотических добавок с антиатеросклеротическим потенциалом

Для стимулирования биоактивности разработанных ПК использовали пребиотические вещества. Оценивали способность СД, содержащих инулин и ФОС, стимулировать рост ПК, представителей нормальной микробиоты ЖКТ; быть устойчивыми к действию ряда антибиотиков, неблагоприятных условий ЖКТ; АОА и способность снижать уровень холестерина *in vitro*.

Оценка влияния пребиотиков на рост разработанных ПК и представителей нормальной микробиоты ЖКТ представлена в таблице 4.2.1.

Таблица 4.2.1 – Результаты влияния пребиотиков на ПК и представителей нормальной микробиоты ЖКТ

Объекты исследования	Количество штаммов, log КОЕ/см ³								
	инулин			ФОС			глюкоза		
	1,00 %	1,50 %	2,00 %	1,00 %	1,50 %	2,00 %	1,00 %	1,50 %	2,00 %
ПК № 1	10,39 ±0,54	11,09 ±0,51	11,15 ±0,40	8,94 ±0,87	9,40 ±0,74	10,05 ±0,87	8,52 ±0,57	8,42 ±0,77	9,85 ±0,72

Продолжение таблицы 4.2.1

Объекты исследования	Количество штаммов, log КОЕ/см ³								
	инулин			ФОС			глюкоза		
	1,00 %	1,50 %	2,00 %	1,00 %	1,50 %	2,00 %	1,00 %	1,50 %	2,00 %
ПК № 6	9,12 ±1,01	9,36 ±1,02	10,84 ±0,25	9,45 ±0,97	9,71 ±0,47	9,87 ±1,00	7,99 ±0,69	8,40 ±1,12	9,75 ±0,98
ПК № 8	8,99 ±1,05	9,57 ±0,98	9,86 ±0,85	9,02 ±1,10	9,85 ±1,25	10,92 ±1,00	7,52 ±1,28	8,18 ±0,72	8,52 ±1,24
<i>Bifidobacterium</i> (<i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>)	9,40 ±1,11	9,52 ±0,41	9,98 ±1,12	8,62 ±1,02	9,13 ±0,65	10,11 ±0,71	8,51 ±1,01	8,62 ±1,05	9,71 ±1,03
<i>Lactobacillus</i> (<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i>)	9,02 ±0,87	9,45 ±1,08	10,33 ±1,00	8,56 ±1,07	9,13 ±1,18	9,97 ±1,08	9,44 ±1,20	9,70 ±1,32	9,80 ±1,21
<i>Streptococcus</i> (<i>S. salivarius</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. thermophilus</i>)	8,25 ±1,12	9,05 ±1,15	9,53 ±1,16	8,16 ±1,00	9,11 ±0,87	9,37 ±0,71	8,00 ±0,97	8,52 ±1,32	9,12 ±1,07

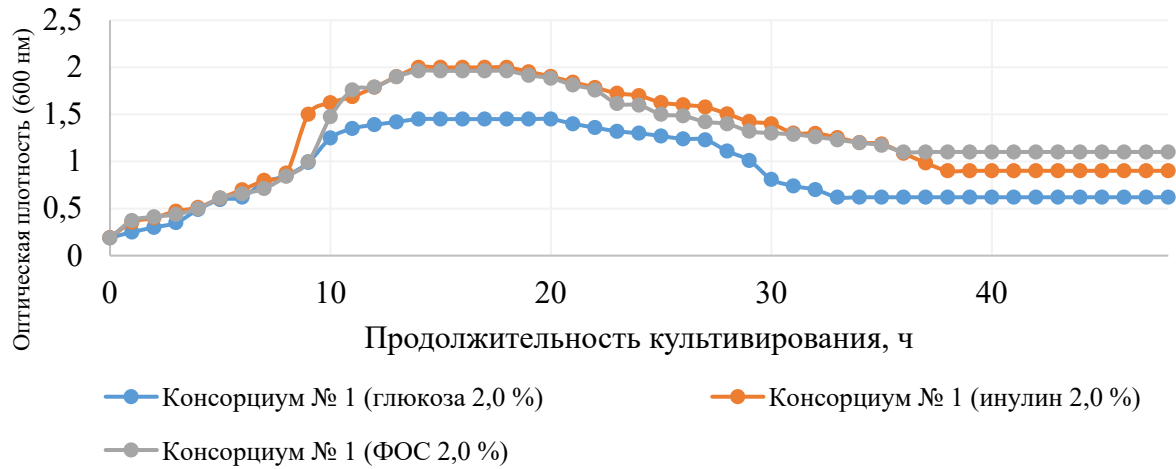
Для представителей нормальной микробиоты ЖКТ замена глюкозы на равный объем инулина стимулировала прирост биомассы *Streptococcus* и *Lactobacillus*, а для вида *Bifidobacterium* наибольший прирост биомассы наблюдается при замене глюкозы на равный объем ФОС, что характерно и для разработанных консорциумов. Для ПК № 1 и № 6, где преобладают представители *Lactobacillus*, замена глюкозы на инулин стимулировала увеличение биомассы; для ПК № 8 – где одинаковое соотношение *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, наибольший прирост биомассы наблюдался при замене глюкозы на ФОС.

Влияние пребиотиков на кривые роста ПК отражено на рисунке 4.2.1.

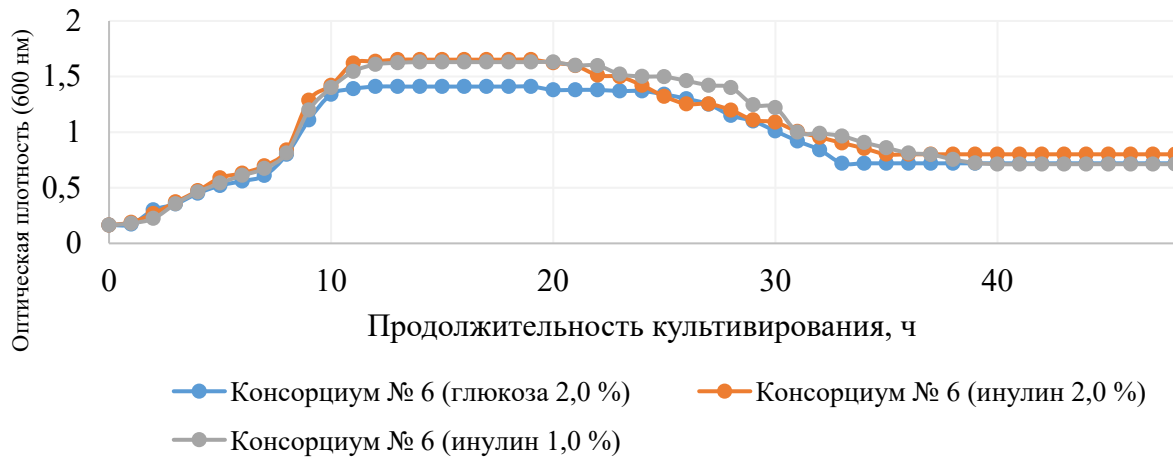
Кривая роста для всех исследуемых ПК имеет S-образную форму. Для ПК № 1 и № 6 наибольший прирост биомассы в экспоненциальной фазе роста достигался при культивировании на ПС, содержащей 2,0 % инулина, для консорциума № 8 – 2,0 % ФОС. На основании полученных результатов сформированы следующие СД:

- № 1: консорциум № 1 + инулин (2,0 % от объема питательной среды);
- № 2: консорциум № 6 + инулин (2,0 % от объема питательной среды);

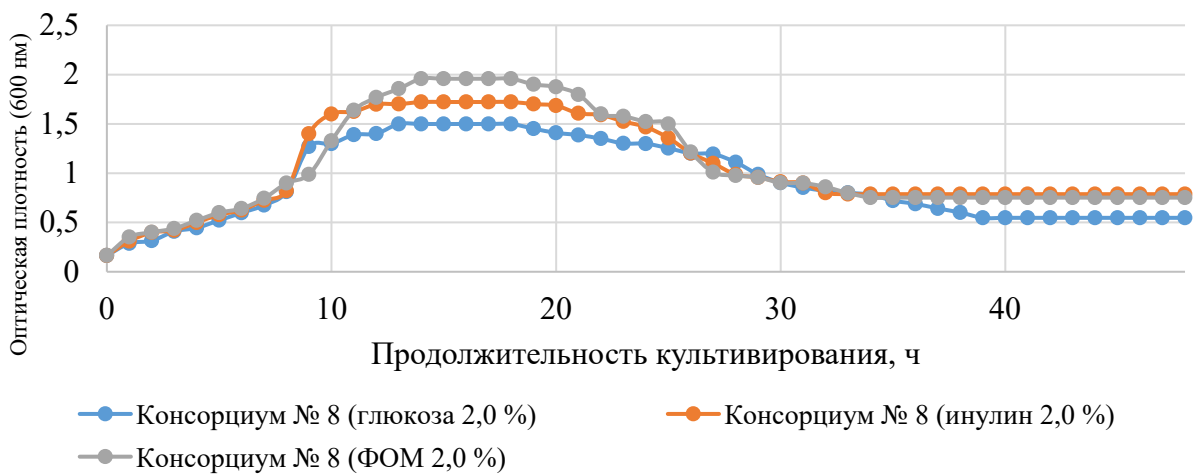
– № 3: консорциум № 8 + ФОС (2,0 % от объема питательной среды).



а)



б)



в)

Рисунок 4.2.1 – Культивирование ПК на ПС, в состав которых внесено 2,0 % пребиотиков от общего объема: а) ПК № 1; б) ПК № 6; в) ПК № 8

Результаты антимикробной активности СД по отношению к ряду условно-патогенных тест-штаммов отражены в таблице 4.2.2.

Таблица 4.2.2 – Антимикробная активность исследуемых СД по отношению к условно-патогенным тест-штаммам

Тест-культуры	Диаметр зон подавления роста, мм			
	Антибиотик	№ 1	№ 2	№ 3
<i>E. coli</i> В-6645	Стрептомицин (25,2±0,4)	28,4±1,1	31,2±1,5*	29,9±1,1*
<i>B. subtilis</i> В-110	Ванкомицин (28,8±0,9)	31,9±1,2	30,3±1,0	31,0±1,2
<i>C. albicans</i> Y-3108	Стрептомицин (24,9±0,8)	30,1±1,0*	31,2±1,1*	30,9±1,0*
<i>K. pneumonia</i> К1 5054	Цефалоспорин (24,5±0,7)	13,3±1,1*	12,8±1,1*	12,1±0,5*
<i>Ps. aeruginosa</i> В-6643	Ципрофлоксацин (26,7±0,7)	29,9±1,0	28,9±1,0	29,5±1,0

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Все исследуемые СД проявляли высокую антимикробную активность по отношению к *E. coli* В-6645, *B. subtilis* В-110, *C. albicans* Y-3108 и *Ps. aeruginosa* В-6643, слабую антимикробную активность по отношению к *K. pneumonia* К1 5054. Следовательно, добавление инулина и ФОС не снижает, а стимулирует антимикробную активность ПК, входящих в их состав, примерно на 1,0–2,0±1,0 значения.

Результаты по оценке устойчивости разработанных СД к действию ряда антибиотиков представлены в таблице 4.2.3.

Таблица 4.2.3 – Оценка устойчивости разработанных СД к действию ряда антибиотиков

Антибиотик	Диаметр зон подавления роста, мм		
	№ 1	№ 2	№ 3
Стрептомицин	11,1±1,0	10,6±0,5	10,1±0,9
Тетрациклин	14,7±1,3	15,7±1,1	10,1±0,5
Ампициллин	6,0±0,5	15,5±1,1	12,2±0,6
Гентамицин	10,1±1,0	10,5±1,3	11,4±0,4
Хлорамфеникол	15,1±1,0	16,9±1,0	17,5±0,7

Совместное культивирование ПК с пребиотиками увеличивало устойчивость штаммов, входящих в их состав, примерно на $1,0-2,0 \pm 1,0$ значения.

Результаты устойчивости СД к неблагоприятным условиям ЖКТ представлены в таблицах 4.2.4 и 4.2.5.

Таблица 4.2.4 – Устойчивость исследуемых СД к рН среды

СД	Выживаемость клеток (%)											
	30 мин			60 мин			90 мин			120 мин		
	рН2	рН3	рН4	рН2	рН3	рН4	рН2	рН3	рН4	рН2	рН3	рН4
№ 1	68,5 ±3,0	79,0 ±1,5	87,0 ±1,9	71,1 ±1,7	76,9 ±1,2	87,9 ±1,4	68,0 ±1,5	78,5 ±1,7	83,0 ±2,6	64,7 ±1,2	75,3 ±1,9	77,5 ±2,1
№ 2	68,0 ±1,9	79,1 ±2,0	86,9 ±1,3	62,2 ±1,5	71,7 ±3,2	80,5 ±1,5	68,0 ±1,3	67,0 ±1,5	80,5 ±2,1	62,9 ±1,4	65,1 ±1,5	72,9 ±1,5
№ 3	65,9 ±2,1	76,5 ±1,1	85,5 ±2,5	66,5 ±1,7	75,0 ±3,4	83,9 ±2,0	63,1 ±1,5	73,3 ±2,4	77,5 ±3,0	65,6 ±2,4	72,3 ±1,8	75,1 ±2,0

Таблица 4.2.5 – Устойчивость разработанных СД к желчи

СД	Выживаемость клеток (%)											
	30 мин			60 мин			90 мин			120 мин		
	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %
№ 1	73,1 ±2,4	83,5 ±2,4	90,8 ±1,7	71,1 ±2,0	83,1 ±3,1	91,1 ±2,7	65,5 ±3,5	79,1 ±2,7	87,3 ±1,5	63,9 ±3,1	75,5 ±3,1	83,9 ±2,3
№ 2	73,0 ±1,5	83,1 ±2,4	91,6 ±1,5	70,9 ±1,4	81,9 ±2,7	91,1 ±4,1	66,3 ±2,4	76,2 ±1,8	87,9 ±2,2	63,7 ±3,6	73,6 ±3,4	81,4 ±3,0
№ 3	72,3 ±2,4	84,4 ±3,1	90,9 ±2,3	69,1 ±2,0	82,4 ±3,2	91,3 ±3,2	66,5 ±3,4	77,7 ±2,5	88,1 ±1,1	63,9 ±3,1	72,3 ±1,2	76,3 ±4,1

Разработанные СД устойчивы к действию неблагоприятных условий ЖКТ.

Результаты оценки АОА СД показали, что при добавлении к ПК пребиотиков, активность возрастала примерно на $1,0-2,0 \pm 1,0$ % (таблица 4.2.6).

Таблица 4.2.6 – АОА разработанных СД

СД	АОА, %			
	2 ч	4 ч	7 ч	25 ч
№ 1	38,7±2,0*	40,2±1,7*	45,2±2,0	35,5±1,9*

Продолжение таблицы 4.2.6

СД	АОА, %			
	2 ч	4 ч	7 ч	25 ч
№ 2	39,3±1,9*	42,8±1,6*	46,6±1,5	37,1±1,8*
№ 3	38,9±2,1*	40,3±1,1*	43,5±2,0	36,4±2,4*

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Результаты оценки АОА показали, что добавление пребиотиков увеличивало активность ПК, входящих в их состав. АОА разработанных СД соответствовала активности водных растворов витамина С концентрацией от 0,25 до 0,50 мг/см³.

Оценка способности разработанных СД снижать уровень холестерина отражена в таблице 4.2.7.

Таблица 4.2.7 – Изменения количества холестерина в среде, вызванное действием исследуемых СД

СД	Остаточный холестерин (мг/дл)	Уровень холестерина, % от контроля
Контроль	346,3±1,5	–
№ 1	284,1±2,6*	18,0±0,3
№ 2	282,5±2,7*	18,4±0,5
№ 3	262,9±2,5*	24,1±0,8

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Разработанные СД проявляли способность снижать уровень холестерина. Добавление к ПК № 8 ФОС увеличило способность снижать уровень холестерина – с 19,6 % до 24,1 %.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что разработанные СД (№ 1: консорциум № 1 + инулин (2,0 % от объема питательной среды); № 2: консорциум № 6 + инулин (2,0 % от объема питательной среды); № 3: консорциум № 8 + ФОС (2,0 % от объема питательной среды) можно использовать в качестве ФПИ профилактической направленности с ААЗ потенциалом.

4.3 Формирование функциональных пищевых добавок с антиатеросклеротическим потенциалом

Для получения индивидуальных ФПД профилактической направленности с ААЗ потенциалом необходимо оценить влияние целевых БАВ, выделенных из экстрактов hairy roots растений, на разработанные СД. Проанализировать биоактивность разработанных ФПИ (состоящих из БАВ и СД): способность подавлять рост условно-патогенных тест-штаммов, устойчивость к действию ряда антибиотических препаратов, АОА и способность снижать уровень холестерина *in vitro*.

Антимикробная активность растворов БАВ различной концентрации по отношению к условно-патогенным тест-штаммам и влияние на разработанные СД представлены в таблице 4.3.1.

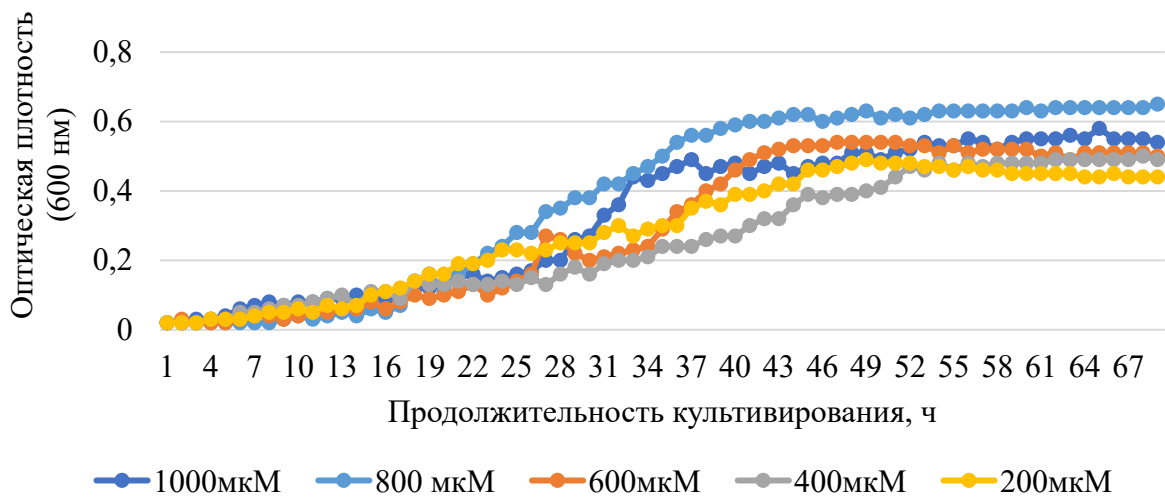
Таблица 4.3.1 – Антимикробная активность растворов целевых БАВ на разработанные СД

БАВ	Зоны подавления роста, мм				
	БАВ, мг/см ³				
	1000 мкМ	800 мкМ	600 мкМ	400 мкМ	200 мкМ
Байкалин					
СД № 1	17,3±0,6	17,6±0,6	17,6±0,6	17,3±0,3	17,5±0,5
СД № 2	17,2±0,7	17,4±0,4	17,4±0,7	17,2±0,1	17,0±0,3
СД № 3	17,0±0,3	17,2±0,4	17,2±0,7	17,0±0,8	17,2±0,1
Кверцетин					
СД № 1	<23,0±0,5	<23,0±0,5	<23,0±0,5	<23,0±0,5	<23,0±0,5
СД № 2	<23,0±0,5	<23,0±0,5	<23,0±0,5	<23,0±0,5	<23,0±0,5
СД № 3	<23,0±0,5	<23,0±0,5	<23,0±0,5	<23,0±0,5	<23,0±0,5
Хлорогеновая кислота					
СД № 1	17,1±0,8	17,2±0,8	17,3±0,6	17,4±0,4	17,3±0,5
СД № 2	17,2±0,7	17,3±0,8	17,3±0,4	17,4±0,6	17,4±0,4
СД № 3	17,2±0,8	17,3±0,7	17,3±0,8	17,4±0,3	17,5±0,1

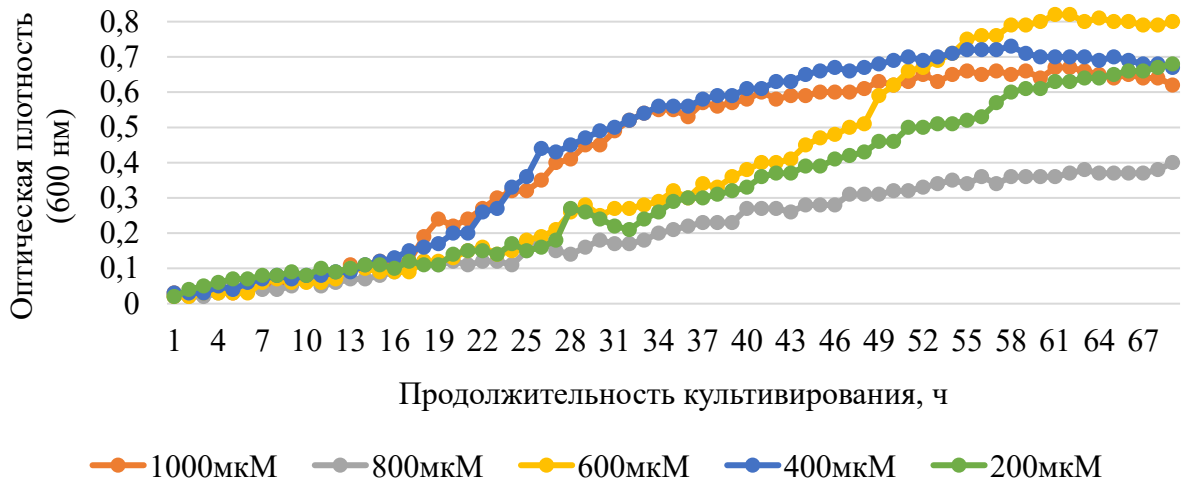
Ингибирующее действие растворов целевых БАВ на рост бактерий, входящих в состав СД, оказывает растворитель – 70 % водно-этанольный раствор, проявляющий высокую антимикробную активность. Из-за отсутствия возможно-

сти использовать нетоксичные растворители – в воде растворяется только хлореновая кислота [281], то необходимы дополнительные исследования по изучению *in vivo* влияния БАВ на пробиотические штаммы, например, на грызунах. Так как данные БАВ можно вводить в сухом виде перорально и т. п., избегая использования относительно токсичных растворителей.

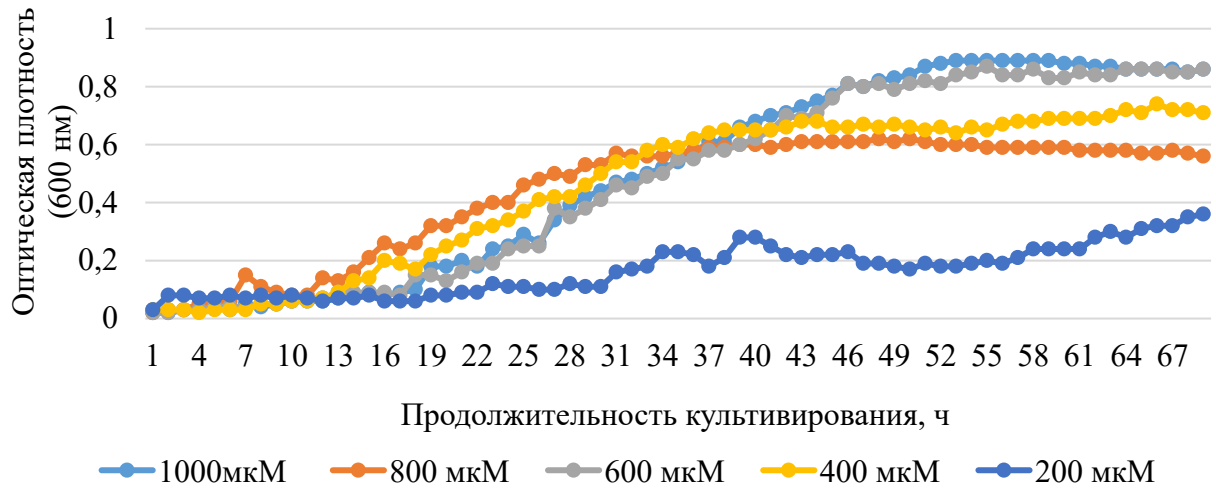
Результаты исследования влияния растворов целевых БАВ на СД отражены на рисунках 4.3.1–4.3.3.



а)



б)



в)

Рисунок 4.3.1 – Влияние растворов БАВ на прирост биомассы СД № 1:

а) байкалина; б) хлорогеновой кислоты; в) кверцетина

Результаты показали, что максимальный прирост биомассы СД № 1 наблюдался при добавлении 1,0 % от объема ПС:

- раствора байкалина концентрацией 800 мкМ, наступление экспоненциальной фазы начинается с $16,0 \pm 0,5$ ч. В сравнении с кривыми роста ПК № 1 видно, что наступление экспоненциальной фазы роста сдвинулось на $6,0 \pm 0,1$ ч, прирост биомассы в единицах оптической плотности меньше в $3,1 \pm 0,1$ раза;

- раствора хлорогеновой кислоты концентрацией 600,0 мкМ, наступление экспоненциальной фазы начинается с $17,0 \pm 0,8$ ч. В сравнении с кривыми роста ПК № 1 видно, что наступление экспоненциальной фазы роста сдвинулось на $6,5 \pm 0,3$ ч, прирост биомассы в единицах оптической плотности меньше в $2,4 \pm 0,1$ раза;

- растворов кверцетина концентрацией 1000,0 мкМ и 600,0 мкМ, наступление экспоненциальной фазы роста наблюдается в период 17,0–18,0 ч. В сравнении с кривыми роста ПК № 1 видно, что наступление экспоненциальной фазы роста сдвинулось на $7,0 \pm 1,5$ ч, прирост биомассы в единицах оптической плотности меньше в $2,2 \pm 0,4$ раза.

Максимальный прирост биомассы СД № 1 в единицах оптической плотности наблюдался при добавлении раствора кверцетина концентрацией 1000 мкМ.

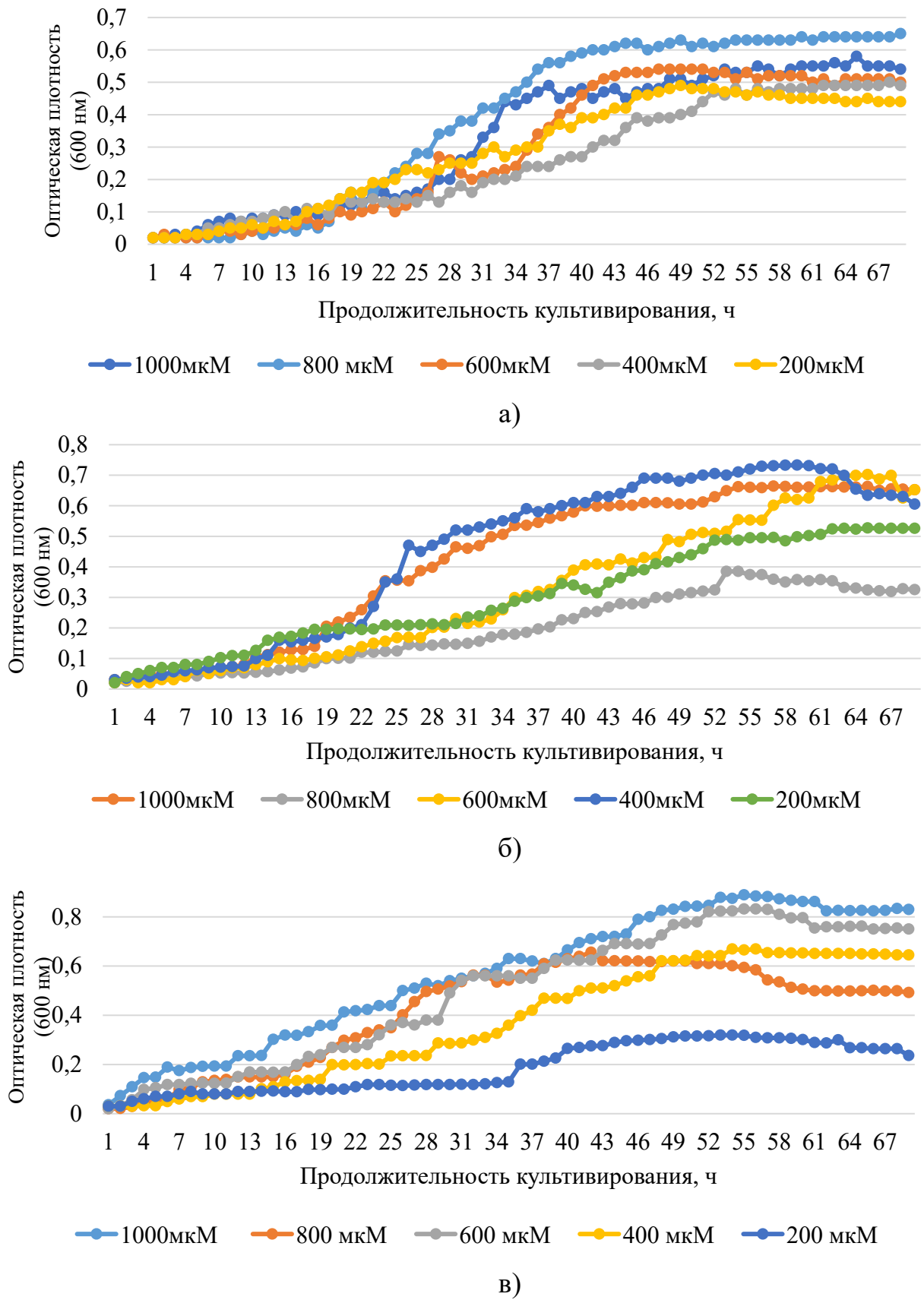


Рисунок 4.3.2 – Влияние растворов БАВ на кривые роста биомассы СД № 2:

а) байкалина; б) хлорогеновой кислоты; в) кверцетина

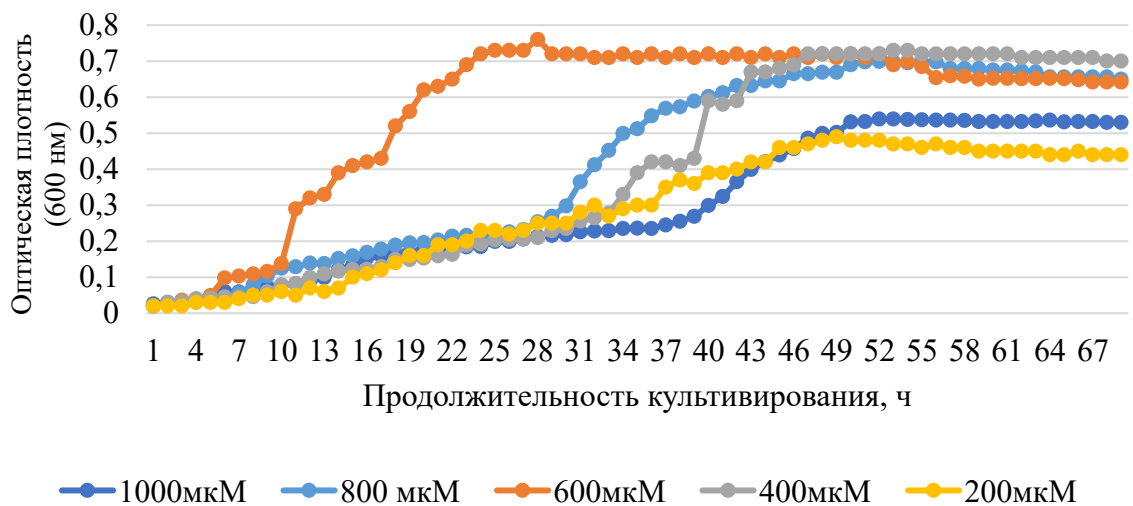
Результаты показали, что максимальный прирост биомассы СД № 2 наблюдался при добавлении 1,0 % от объема ПС:

– раствора байкалина концентрацией 800 мкМ, наступление экспоненциальной фазы начинается с $14,0 \pm 0,5$ ч. В сравнении с кривыми роста ПК № 2 видно, что наступление экспоненциальной фазы роста сдвинулось на $6,0 \pm 0,3$ ч, прирост биомассы в единицах оптической плотности меньше в $2,0 \pm 0,1$ раза;

– раствора хлорогеновой кислоты концентрацией 400,0 мкМ, наступление экспоненциальной фазы начинается с $12,0 \pm 0,2$ ч. В сравнении с кривыми роста ПК № 2 видно, что наступление экспоненциальной фазы роста сдвинулось на $4,5 \pm 0,3$ ч, прирост биомассы в единицах оптической плотности меньше в $2,1 \pm 0,1$ раза;

– раствора кверцетина 600,0 мкМ, наступление экспоненциальной фазы роста наблюдается с $11,0 \pm 0,1$ ч. В сравнении с кривыми роста ПК № 2 видно, что наступление экспоненциальной фазы роста сдвинулось на $3,5 \pm 0,5$ ч, прирост биомассы в единицах оптической плотности меньше в $1,8 \pm 0,5$ раза.

Максимальный прирост биомассы СД № 2 в единицах оптической плотности наблюдался при добавлении раствора кверцетина 600 мкМ.



а)

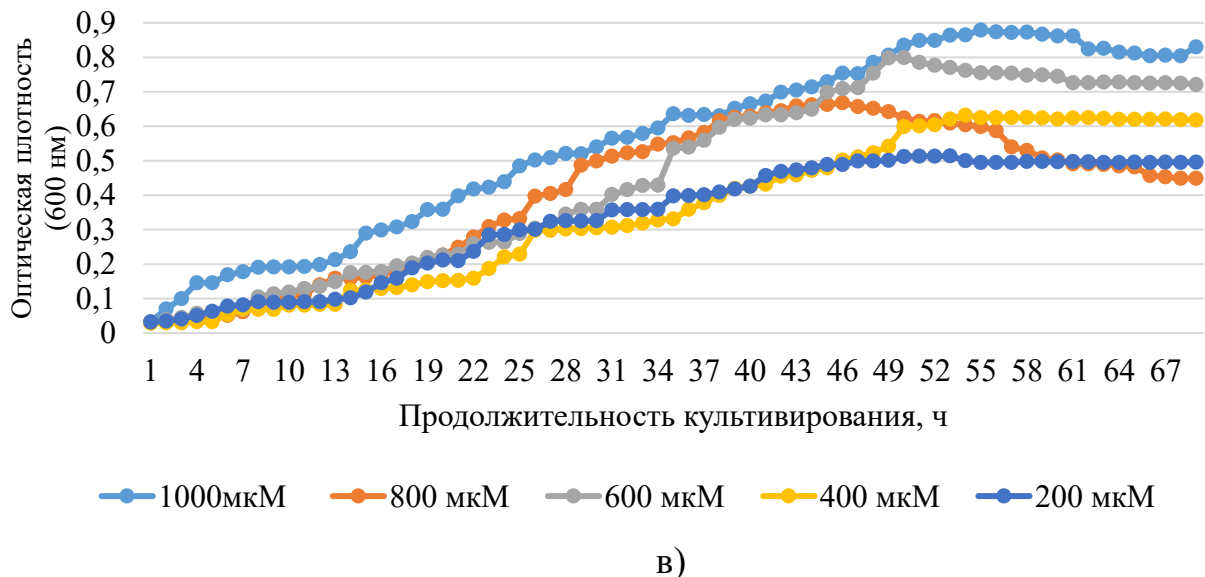
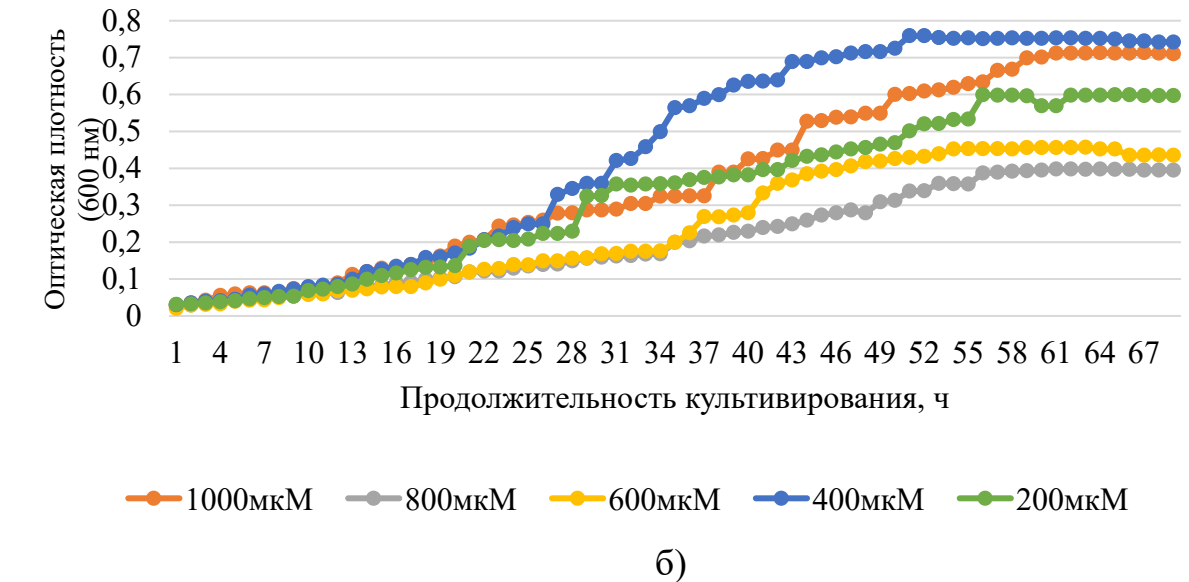


Рисунок 4.3.3 – Влияние растворов БАВ на кривые роста биомассы СД № 3:
а) байкалина; б) хлорогеновой кислоты; в) кверцетина

Результаты показали, что максимальный прирост биомассы СД № 3 наблюдался при добавлении 1,0 % от объема ПС:

- раствора байкалина концентрацией 600 мкМ, наступление экспоненциальной фазы начинается с $10,0 \pm 0,5$ ч. В сравнении с кривыми роста ПК № 3 видно, что наступление экспоненциальной фазы роста сдвинулось на $3,0 \pm 0,2$ ч, прирост биомассы в единицах оптической плотности меньше в $2,6 \pm 0,2$ раза;

- раствора хлорогеновой кислоты концентрацией 400,0 мкМ, наступление экспоненциальной фазы начинается с $13,0 \pm 0,3$ ч. В сравнении с кри-

выми роста ПК № 3 видно, что наступление экспоненциальной фазы роста сдвинулось на $5,5 \pm 0,2$ ч, прирост биомассы в единицах оптической плотности меньше в $2,5 \pm 0,1$ раза;

– раствора кверцетина $1000,0$ мкМ, наступление экспоненциальной фазы роста наблюдается с $13,0 \pm 0,1$ ч. В сравнении с кривыми роста ПК № 3 видно, что наступление экспоненциальной фазы роста сдвинулось на $6,0 \pm 0,5$ ч, прирост биомассы в единицах оптической плотности меньше в $2,2 \pm 0,2$ раза.

Максимальный прирост биомассы СД № 3 в единицах оптической плотности наблюдался при добавлении раствора кверцетина концентрацией 1000 мкМ.

Несмотря на ингибирующее действие, возникающее из-за растворителя, по отношению к росту пробиотических штаммов, растворы целевых БАВ могут оказывать положительное влияние на прирост биомассы. В результате были сформированы следующие смеси ФПИ (проценты добавляемых компонентов от объема ПС):

- № 1 (СД № 1+1,0 % 1000 мкМ раствора кверцетина);
- № 2 (СД № 1+1,0% 800 мкМ раствора кверцетина);
- № 3 (СД № 1+1,0 % 600 мкМ раствора кверцетина);
- № 4 (СД № 1+1,0 % 400 мкМ раствора кверцетина);
- № 5 (СД № 1+1,0% 200 мкМ раствора кверцетина);
- № 6 (СД № 1+1,0 % 1000 мкМ раствора хлорогеновой кислоты);
- № 7 (СД № 1+1,0 % 800 мкМ раствора хлорогеновой кислоты);
- № 8 (СД № 1+1,0 % 600 мкМ раствора хлорогеновой кислоты);
- № 9 (СД № 1+1,0 % 400 мкМ раствора хлорогеновой кислоты);
- № 10 (СД № 1+1,0 % 200 мкМ раствора хлорогеновой кислоты);
- № 11 (СД № 1+1,0 % 1000 мкМ раствора байкалина);
- № 12 (СД № 1+1,0 % 800 мкМ раствора байкалина);
- № 13 (СД № 1+1,0 % 600 мкМ раствора байкалина);
- № 14 (СД № 1+1,0 % 400 мкМ раствора байкалина);
- № 15 (СД № 1+1,0 % 200 мкМ раствора байкалина).

Результаты по оценке биоактивности разработанных смесей ФПИ отражены в таблице 4.3.2.

Таблица 4.3.2 – Биоактивность смесей ФПИ

Смесь ФПИ	Антимикробная активность					Антибиотикоустойчивость					Уровень холестерина, % от контроля	АОА на 7 ч культивирования, %
	диаметр зон подавления роста, мм											
	<i>E. coli</i> B-6645	<i>B. subtilis</i> B-110	<i>C. albicans</i> У-3108	<i>K. pneumoniae</i> К1 5054	<i>Ps. aeruginosa</i> В-6643	Стрептомицин	Тетрациклин	Ампициллин	Гентамицин	Хлорамфеникол		
№ 1	<30,0±1,1*					9,2±0,3					27,4±0,3*	62,8±2,4*
№ 2	<30,0±1,2*					9,3±0,4					27,2±0,6*	59,9±3,9
№ 3	<30,0±1,3*					9,2±0,4					27,1±0,5*	58,9±2,1*
№ 4	<30,0±1,1*					10,3±0,3					25,4±0,4*	56,5±2,0
№ 5	<30,0±1,1*					10,2±0,3					24,8±0,3*	55,9±2,9
№ 6	<30,0±1,4*					10,3±0,4					31,0±0,5*	55,3±2,9
№ 7	<30,0±1,5*					12,0±0,6					30,5±0,6*	52,4±2,9
№ 8	<30,0±1,4*					11,3±0,3					28,2±0,5*	52,1±2,6
№ 9	<30,0±1,4*					10,1±0,2					27,5±0,7*	49,9±2,6
№ 10	<30,0±1,5*					12,3±0,4					27,0±0,3*	46,2±2,6
№ 11	<30,0±1,3*					12,0±0,6					26,9±0,2*	57,5±1,9
№ 12	<30,0±1,3*					13,3±0,3					26,1±0,4*	56,5±2,0
№ 13	<30,0±1,2*					14,2±0,5					25,8±0,3*	57,5±1,4*
№ 14	<30,0±1,3*					14,3±0,4					25,5±0,3*	47,3±1,8
№ 15	<30,0±1,1*					14,4±0,4					24,3±0,2*	46,2±2,0

«*» – отражены статистически значимые значения ($p < 0,05$)

Все исследуемые образцы ФПИ проявляли высокую антимикробную активность по отношению к условно-патогенным штаммам (зоны подавления роста в среднем равнялись 30,0±1,1 мм), устойчивость к действию антибиотиков (зоны подавления роста в среднем 9,0±0,5 мм). АОА, значения которой в среднем соответствуют активности водных растворов витамина С (контроля) концентрациями от 400 до 600 мкМ. Максимальные значения АОА характерны для образцов, в состав которых входят растворы кверцетина (ФПИ № 1–5). Максимальная ак-

тивность по снижению уровня холестерина характерна для добавок, в состав которых входит хлорогеновая кислота (ФПИ № 6–10).

Результаты устойчивости смесей ФПИ к неблагоприятным условиям ЖКТ отражены в таблицах 4.3.3 и 4.3.4.

Таблица 4.3.3 – Устойчивость исследуемых ФПИ к рН

Смесь ФПИ	Выживаемость клеток (%)											
	30 мин			60 мин			90 мин			120 мин		
	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4
№ 1	68,8 ±2,6	79,1 ±2,8	88,3 ±3,1	67,2 ±1,6	77,4 ±1,7	86,8 ±3,1	67,1 ±2,4	78,4 ±2,8	83,4 ±2,9	65,2 ±2,1	74,3 ±2,4	82,6 ±3,4
№ 2	68,3 ±2,2	79,2 ±2,0	88,5 ±3,1	67,3 ±1,9	78,1 ±1,6	86,5 ±3,2	67,2 ±2,5	78,2 ±2,9	83,8 ±2,9	65,3 ±2,9	74,6 ±3,2	82,9 ±3,1
№ 3	68,5 ±2,3	77,3 ±1,9	87,8 ±3,3	67,5 ±2,1	78,0 ±1,7	85,9 ±3,1	66,9 ±2,3	78,6 ±2,8	83,4 ±3,1	64,9 ±2,6	74,2 ±3,3	82,8 ±2,4
№ 4	68,2 ±2,7	79,3 ±2,2	87,8 ±3,1	67,9 ±2,2	75,9 ±1,7	84,2 ±3,3	66,5 ±2,1	78,7 ±2,7	83,4 ±3,1	64,3 ±2,7	74,9 ±3,1	82,6 ±2,4
№ 5	68,0 ±2,8	77,9 ±2,0	88,1 ±3,0	68,0 ±2,0	76,3 ±1,8	84,3 ±3,0	66,4 ±2,2	78,3 ±2,9	83,0 ±2,9	64,9 ±2,2	74,1 ±3,0	82,4 ±2,6
№ 6	68,3 ±2,4	77,8 ±2,1	88,0 ±3,0	67,6 ±1,9	76,9 ±1,7	86,2 ±3,0	67,3 ±2,4	78,9 ±2,7	83,7 ±3,2	64,5 ±2,3	74,3 ±3,1	83,0 ±2,7
№ 7	68,7 ±2,6	77,6 ±2,0	88,3 ±3,2	67,4 ±1,8	77,2 ±2,2	86,4 ±3,4	66,1 ±2,6	78,5 ±3,1	84,1 ±3,3	65,5 ±2,5	74,7 ±2,9	84,5 ±2,4
№ 8	68,7 ±2,4	79,2 ±2,7	87,5 ±2,9	68,6 ±1,9	78,2 ±2	84,9 ±3,4	67,9 ±2,3	78,5 ±3,4	83,6 ±3,4	64,9 ±2,4	74,3 ±2,9	84,9 ±2,4
№ 9	68,5 ±2,3	81,1 ±3,1	87,4 ±3,1	68,7 ±1,6	75,3 ±2,4	85,1 ±3,5	65,9 ±2,1	78,4 ±3,2	83,9 ±2,9	64,5 ±2,4	74,5 ±2,6	84,8 ±3,0
№ 10	68,4 ±2,4	81,3 ±3,2	88,1 ±2,8	66,4 ±2,3	78,5 ±2,4	84,2 ±3,3	65,2 ±2,0	78,4 ±3,1	82,6 ±3,5	61,9 ±2,0	73,2 ±2,7	79,6 ±3,0
№ 11	68,3 ±2,7	81,2 ±2,9	88,3 ±3,0	66,9 ±2,4	78,6 ±2,6	83,9 ±3,1	66,3 ±2,0	78,8 ±3,0	81,9 ±3,6	61,5 ±2,3	73,8 ±2,3	79,2 ±3,1
№ 12	67,8 ±2,6	81,2 ±3,0	88,8 ±3,1	66,8 ±1,8	78,4 ±2,4	83,3 ±3,0	65,7 ±2,5	73,2 ±2,9	81,7 ±3,7	62,8 ±2,3	74,5 ±2,8	75,5 ±3,1
№ 13	68,1 ±2,5	80,9 ±2,7	88,8 ±3,0	66,4 ±2,3	78,5 ±2,3	83,4 ±3,4	65,2 ±2,3	76,5 ±2,7	82,1 ±2,4	61,9 ±2,3	71,6 ±2,4	78,9 ±2,4
№ 14	67,4 ±2,5	81,3 ±3,1	87,9 ±2,7	66,9 ±2,1	78,3 ±2,4	83,9 ±3,0	66,8 ±2,2	79,2 ±2,7	82,6 ±2,9	62,7 ±2,3	72,6 ±2,4	76,9 ±2,5
№ 15	67,9 ±2,1	81,4 ±3,2	87,9 ±3,1	67,0 ±2,5	78,0 ±1,9	83,7 ±3,3	65,9 ±2,7	73,6 ±2,8	81,9 ±2,9	62,8 ±2,0	71,9 ±3,3	78,2 ±2,6

Таблица 4.3.4 – Устойчивость исследуемых ФПИ к желчи

Смесь ФПИ	Выживаемость клеток (%)											
	30 мин			60 мин			90 мин			120 мин		
	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %
№ 1	72,1 ±3,5	83,1 ±3,4	92,0 ±4,2	70,0 ±2,4	82,4 ±2,1	90,8 ±5,2	66,4 ±3,4	78,3 ±3,4	87,8 ±3,2	63,0 ±2,0	74,7 ±2,4	84,4 ±4,2
№ 2	72,3 ±2,3	83,5 ±3,2	92,3 ±4,2	71,2 ±2,6	82,3 ±2,6	90,4 ±5,2	66,4 ±3,0	78,3 ±3,2	87,5 ±3,1	63,4 ±2,6	74,5 ±3,0	84,2 ±2,9
№ 3	72,1 ±2,1	83,2 ±3,0	93,5 ±4,0	69,3 ±1,5	82,5 ±2,4	91,3 ±5,0	65,7 ±3,4	77,9 ±3,4	87,5 ±3,0	63,1 ±2,4	74,6 ±2,4	84,1 ±2,4
№ 4	72,6 ±2,6	84,3 ±1,9	96,1 ±5,0	70,7 ±2,1	82,8 ±2,6	91,6 ±5,4	66,1 ±3,0	78,0 ±2,9	88,2 ±3,9	64,4 ±2,4	74,3 ±3,4	84,1 ±2,0
№ 5	71,7 ±2,4	83,4 ±3,2	92,4 ±4,3	69,5 ±3,1	82,7 ±2,4	90,5 ±4,9	66,1 ±3,2	77,4 ±3,4	87,8 ±3,7	63,9 ±2,4	74,7 ±3,1	84,6 ±2,4
№ 6	71,9 ±2,1	84,1 ±3,1	93,5 ±2,9	71,3 ±2,5	82,4 ±2,3	91,2 ±4,3	66,0 ±3,5	77,6 ±2,7	87,9 ±3,4	63,5 ±2,6	74,0 ±3,6	84,6 ±2,4
№ 7	72,3 ±2,1	83,5 ±2,4	94,4 ±2,6	70,5 ±3,2	82,6 ±3,6	91,8 ±2,4	66,3 ±3,4	77,5 ±2,6	87,3 ±3,5	64,2 ±2,6	73,9 ±2,4	84,1 ±2,9
№ 8	72,7 ±1,2	84,3 ±2,3	94,6 ±2,4	71,4 ±1,9	82,6 ±1,9	92,0 ±5,4	66,7 ±2,6	77,4 ±3,4	88,5 ±2,4	64,3 ±2,0	74,6 ±2,6	84,5 ±3,9
№ 9	72,9 ±2,6	84,5 ±2,3	94,6 ±2,9	71,9 ±2,6	82,6 ±2,1	90,9 ±4,3	66,9 ±3,4	77,6 ±3,4	88,4 ±2,6	64,0 ±3,4	74,6 ±2,4	84,4 ±4,0
№ 10	71,3 ±2,3	83,1 ±3,2	93,2 ±2,1	69,2 ±2,2	82,4 ±2,6	89,9 ±3,4	65,1 ±2,4	74,2 ±3,2	86,2 ±2,6	63,0 ±2,5	72,2 ±2,3	76,2 ±2,7
№ 11	71,7 ±2,7	83,4 ±3,4	92,4 ±2,3	68,5 ±2,1	82,7 ±3,6	90,5 ±3,9	66,1 ±3,0	74,6 ±2,7	86,6 ±3,1	63,0 ±2,4	72,7 ±2,4	76,1 ±3,1
№ 12	71,7 ±2,0	83,5 ±2,4	93,9 ±3,4	68,8 ±2,2	81,9 ±2,5	90,2 ±3,8	66,1 ±3,2	75,1 ±3,4	87,1 ±2,9	63,1 ±2,4	71,9 ±1,9	76,2 ±2,4
№ 13	71,7 ±2,6	83,1 ±2,1	93,0 ±2,9	68,2 ±2,3	82,9 ±2,4	89,9 ±3,5	65,9 ±3,4	75,3 ±3,2	86,2 ±3,6	63,2 ±2,0	72,1 ±2,3	76,3 ±3,4
№ 14	71,7 ±2,3	82,4 ±2,6	93,4 ±2,5	68,4 ±2,3	81,8 ±2,6	89,8 ±3,1	65,2 ±3,0	74,5 ±2,3	86,4 ±2,6	63,4 ±2,4	72,3 ±1,9	76,5 ±2,6
№ 15	71,7 ±2,4	82,6 ±2,9	93,8 ±2,3	70,7 ±3,5	82,0 ±2,4	89,8 ±3,4	65,4 ±2,7	74,7 ±2,3	86,9 ±2,7	63,5 ±2,4	72,3 ±2,4	76,1 ±1,5

Смеси ФПИ проявляли устойчивость к действию неблагоприятных факторов ЖКТ (различным значениям рН и концентрациям желчи в среде).

Разработанные смеси ФПИ проявляют способность нормализовать работу микробиоты ЖКТ добровольцев, ААЗ потенциалом. Следовательно, для профилактики целесообразен прием ФПД на основе данных ФПИ.

Содержание компонентов в разработанных ФПД зависит от суточной нормы потребления человеком ФПИ, установленных в методических рекомендациях МР 2.3.1.1915-04 [24] (таблица 4.3.5).

Таблица 4.3.5 – Состав функциональных добавок

№ ФПД	Консорциум	Пребиотик	БАВ	Масса ФПД
1	№ 1 (5×10^9 КОЕ/г (3,0 г))	Инулин 5,00 г	кверцетин 30,00 мг	8,030 г
2			кверцетин 50,00 мг	8,050 г
3			кверцетин 100,00 мг	8,100 г
4			байкалин 5,00 мг	8,005 г
5			байкалин 10,00 мг	8,010 г
6			байкалин 15,00 мг	8,015 г
7			хлорогеновая кислота 10,00 мг	8,010 г
8			хлорогеновая кислота 15,00 мг	8,015 г
9			хлорогеновая кислота 20,00 мг	8,020 г
10	№ 2 (5×10^9 КОЕ/г (3,0 г))	Инулин 5,00 г	кверцетин 30,00 мг	8,030 г
11			кверцетин 50,00 мг	8,050 г
12			кверцетин 100,00 мг	8,100 г
13			байкалин 5,00 мг	8,005 г
14			байкалин 10,00 мг	8,010 г
15			байкалин 15,00 мг	8,015 г
16			хлорогеновая кислота 10,00 мг	8,010 г
17			хлорогеновая кислота 15,00 мг	8,015 г
18			хлорогеновая кислота 20,00 мг	8,020 г
19	№ 3 (5×10^9 КОЕ/г (2,5 г))	ФОС 5,00 г	кверцетин 30,00 мг	7,530 г
20			кверцетин 50,00 мг	7,550 г
21			кверцетин 100,00 мг	7,500 г
22			байкалин 5,00 мг	7,505 г
23			байкалин 10,00 мг	7,510 г
24			байкалин 15,00 мг	7,515 г
25			хлорогеновая кислота 10,00 мг	7,510 г
26			хлорогеновая кислота 15,00 мг	7,515 г
27			хлорогеновая кислота 20,00 мг	7,520 г

В ходе работы получены двадцать семь индивидуально подобранных ФПД профилактической направленности, которые устойчивы к неблагоприятным условиям ЖКТ, проявляют АОА, способность снижать уровень холестерина *in vitro*.

4.4 Принципиальная схема получения и рекомендации по применению разработанных ФПД

По результатам работы составлена принципиальная схема получения индивидуальных ФПИ, ФПД профилактической направленности (рисунок 4.4.1).



Рисунок 4.4.1 – Принципиальная схема получения индивидуально подобранных ФПИ, ФПД профилактической направленности

ФПД можно употреблять в виде порошка, гранул, разбавляемых водой, в капсульном или таблетированном виде [45]. В рамках реализации результатов диссертационной работы сформированы технические условия

(ТУ 10.89.19-284-02068309-2023) и технологическая инструкция (ТИ 10.89.19-284-02068309-2023) (ПРИЛОЖЕНИЕ Б).

Разработанные ФПД, содержащие ФПИ могут быть рекомендованы к применению в дозе адекватного уровня потребления (ФПД № 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25) для группы добровольцев № 1, добровольцев из группы № 2, но не имеющих вредной привычки – курения.

Для группы добровольцев № 2, имеющих вредную привычку – курение; группы добровольцев № 3, имеющих средний генетический риск развития АЗ; добровольцев группы № 4, № 5 у которых средний генетический риск и, или вредная привычка – курение, – ФПД № 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, содержащих дозы ФПИ в пределах от адекватного до верхнего допустимого уровня потребления.

Для добровольцев, входящих в остальные группы, для которых характерны высокие риски развития АЗ (№ 4, № 6) – прием ФПД № 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, содержащих ФПИ в дозе верхнего допустимого уровня потребления.

Опытные и опытно промышленные образцы разработанных индивидуальных ФПД наработаны в АО «Кемеровская фармацевтическая фабрика» (г. Кемерово) и в ООО НПО «Здоровое питание» (г. Кемерово). (ПРИЛОЖЕНИЕ В).

На основании результатов диссертационной работы сформирован проект «Услуга по формированию комплексного подхода к питанию, опирающегося на персональные данные потребителя, как эффективного средства профилактики атеросклероза», получивший грантовую поддержку Всероссийского конкурса «Студенческий стартап» от Федерального государственного бюджетного учреждения «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (ПРИЛОЖЕНИЕ Г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проанализировано современное состояние ПП, являющегося эффективным средством для профилактики АЗ; выделены ФПИ с ААЗ потенциалом (пробиотики рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), пребиотики (инулин, ФОС), БАВ (кверцетин, байкалин, хлорогеновая кислота).

2. Изучены отдельные факторы риска развития АЗ – SNP генов *CAT* (rs1001179), *MnSOD* (rs4880), *GPx1* (rs1050450), *ADRB3* (rs4994), *PPARG* (rs1801282), *FABP2* (rs1799883), состояние здоровья и микробиоты ЖКТ, вредные привычки у 106 мужчин, проживающих на территории Кузбасса. По результатам работы добровольцы разделены на 6 групп риска развития АЗ, для которых разрабатывались индивидуальные ФПД профилактической направленности.

3. Подобран качественный и количественный состав ПС для выращивания hairy roots растений, позволяющий увеличить индекс роста биомассы шлемника байкальского на 9,09 %, левзеи сафлоровидной на 10,32 % и копеечника забытого на 7,80 %, в сравнении с результатами культивирования hairy roots на безгормональной ПС.

4. Получены водно-спиртовые экстракты биомассы hairy roots растений, проявляющих АОА потенциал, содержащие наибольшее количество целевых БАВ-антиоксидантов (байкалина, хлорогеновой кислоты и кверцетина). В экстракте шлемника байкальского обнаружено наличие ороксилена А – вещества с ААЗ потенциалом.

5. Выделены и очищены целевые БАВ из биомассы hairy roots; изучены их биофункциональные свойства – АОА, способность подавлять жизнедеятельность условно-патогенных штаммов, влиять на продолжительность жизни, выживаемость в стрессовых условиях, экспрессию гена антиоксидантной защиты *SOD-3*, изменения количества липидных включений в телах модельных организмов – *C. elegans*. Установлено, что хлорогеновая кислота (100 мкМ) способна увеличивать продолжительность жизни нематод, а кверцетин (100 мкМ) способен увеличить

процент выживших нематод в условиях окислительного стресса и увеличить экспрессию гена *SOD-3*. Растворы байкалина (10 мкМ и 200 мкМ) способны снижать содержание липидных включений в теле нематод. Растворы целевых БАВ проявляли АОА, схожую с активностью контрольного раствора – витамина С.

6. Сформировано девять ПК из молочнокислых бактерий, три СД на их основе с ААЗ потенциалом, проявляющих способность стимулировать жизнедеятельность представителей нормальной микробиоты ЖКТ потребителей, устойчивость к действию антибиотиков, неблагоприятным условиям ЖКТ, АОА и способность снижать уровень холестерина *in vitro*.

7. На основе СД и целевых БАВ из экстрактов hairy roots растений разработано пятнадцать смесей ФПИ проявляющих АОА, способность снижать уровень холестерина *in vitro*, подавлять жизнедеятельность условно-патогенных тест-штаммов, проявлять устойчивость к действию антибиотиков; на основе ФПИ сформировано двадцать семь ФПД профилактической направленности, которые можно реализовывать в виде порошка, гранул, разбавляемых водой, в капсульном или таблетированном виде.

8. Разработаны рекомендации по применению индивидуально подобранных ФПД для 6 групп добровольцев, имеющих факты риска развития АЗ, принимающих участие в данном исследовании.

9. Проведена промышленная апробация разработанной биотехнологии получения индивидуальных ФПД на АО «Кемеровская фармацевтическая фабрика» (г. Кемерово), ООО НПО «Здоровое питание» (г. Кемерово).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

GWAS – полногеномный поиск ассоциаций
NGM – среда для роста нематод
RE – относительная экспрессия генов
SNP – однонуклеотидный полиморфизм
ААЗ – антиатеросклеротический
АЗ – атеросклероз
АОА – антиоксидантная активность
АРОЕ – аполипопротеин Е
АРОА – липопротеин А
АФК – активные формы кислорода
БАВ – биологически активные вещества
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ДМСО – диметилсульфоксид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИМ – инфаркт миокарда
ИМТ – индекс массы тела
кДНК – комплементарная ДНК
ЛПВП – липопротеины высокой плотности
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
ЛПОНП – липопротеиды очень низкой плотности
ОХС – общий холестерин
ПК – пробиотические композиции
ПП – персональное питание / персонализированное питание
ПС – питательная среда
РНК – рибонуклеиновая кислота
СД – синбиотические добавки
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
ТГ – триглицериды
ТМАО – N-оксид триметиламин
ТСХ – тонкослойная хроматография
УЗ – ультразвуковая обработка
ФОС – фруктоолигосахариды
ФПД – функциональные пищевые добавки
ФПИ – функциональные пищевые ингредиенты

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ассоциация полиморфизма rs1799883 гена FABP2 с различными нарушениями углеводного обмена у жителей республики Татарстан / Ф. В. Валеева, К. Б. Хасанова, Е. В. Валеева [и др.] // Медицинский альманах. – 2018. – № 6 (57). – С. 118–122.
2. Асякина, Л. К. Оптимизация параметров экстракции корневых культур *in vitro* шлемника байкальского, шлемника обыкновенного и лапчатки белой / Л. К. Асякина, А. М. Федорова, Л. С. Дышлюк // Пищевая промышленность. – 2021. – № 10. – С. 82–85. – DOI:10.52653/PPI.2021.10.10.001.
3. Величко, Н. А. Влияние технологических параметров экстракции на выход экстрактивных веществ из левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*) / Н. А. Величко, Я. В. Смольникова // Вестник КрасГАУ. – 2017. – № 10 (133). – С. 73–78.
4. Влияние кверцетина на экспрессию генов ферментов углеводного и липидного обмена в печени у крыс с генетически обусловленным и алиментарным ожирением / К. В. Мжельская, Н. В. Трусов, С. А. Апрятин [и др.] // Вопросы питания. – 2019. – Т. 88. – № 2. – С. 6–16. – DOI:10.24411/0042-8833-2019-10012.
5. Возможности анализа полиморфизма генов липидного обмена для выявления факторов риска атеросклероза / Н. В. Кох, Г. И. Лифшиц, Е. Н. Воронина // Российский кардиологический журнал. – 2014. – Т. 19. – № 10. – С. 53–57. – DOI:10.15829/1560-4071-2014-10-53-057.
6. Волкова, Г. С. Изучение биологических межштаммовых взаимодействий и ростовых свойств производственных штаммов молочнокислых бактерий / Г. С. Волкова, Е. В. Куксова, Е. М. Сербя // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. – 2020. – Т. 1. – № 1 (1). – С. 104–109. – DOI:10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-104-109.
7. Ген FTO как генетический фактор риск развития ожирения / Е. И. Гречухина, М. И. Гречухина, Д. С. Кывыржик [и др.] // Медицина и фармакология: электронный научный журнал – 2019. – № 2(57). – С. 4–6.
8. Десять ведущих причин смерти в мире. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (дата обращения 26.01.2021).
9. Динамика инноваций в технологии производства пищевых продуктов: от специализации к персонализации / А. А. Кочеткова, В. М. Воробьева, В. А. Саркисян [и др.] // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89. – № 4. – С. 233–243. – DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10056.

10. Диткина, Е. Ю. Методы диагностики полиморфизма генов метаболизма липидов человека (обзор) / Е. Ю. Диткина, Е. С. Вашукова, А. С. Глотов [и др.] // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2012. – № 15. – С. 68–74.
11. Дифференциальная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях разной степени тяжести / Т. А. Дмитриади, Д. В. Бурцев, Е. А. Дженкова [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2020. – Т. 7. – № 2. – С. 47–61. – DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-47-61.
12. Дышлюк, Л. С. Подбор экстрагента для выделения биологически активных соединений из копеечника забытого / Л. С. Дышлюк, Н. В. Фотина, Н. В. Изгарышева // Все о мясе. – 2020. – № 5S. – С. 104–106. – DOI: 10.21323/2071-2499-2020-5S-104-106.
13. Здоровье 2020. Основы европейской политики и стратегия XXI века. URL: <https://clck.ru/TxYtM> (дата обращения 26.01.2021.).
14. Инулин как компонент обогащенных пищевых продуктов: влияние на микронутриентный статус организма / В. М. Коденцова, С. Н. Леоненко, Н. А. Бекетова [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Т. 25. – № 3. – С. 34–42. – DOI:10.29296/25877313-2022-03-05.
15. Использование биологически активных веществ лекарственных растений Сибири в функциональных напитках на основе молочной сыворотки / С. А. Иванова, И. С. Милентьева, Л. К. Асякина [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2019. – Т. 49. – № 1. – С. 14–22. – DOI:10.21603/2074-9414-2019-1-14-22.
16. Исследование АТЕРОГЕН-ИВАНОВО. Изучение особенностей развития и прогрессирования АТЕРОсклероза различной локализации, в том числе с учетом Генетических и эпигенетических факторов сердечно-сосудистого риска - субисследование ЭССЕ-ИВАНОВО - дизайн, алгоритмы биоинформационного анализа и результаты секвенирования экзонов пациентов пилотной группы / А. Н. Мешков, С. А. Бойцов, А. И. Ершова [и др.] // Профилактическая медицина. – 2013. – Т. 16, № 6. – С. 11–20.
17. Карамовой, Н. С. Антирадикальные свойства *Lactobacillus acidophilus* n.v. Ер. 317/402 *in vitro* / Н. С. Карамовой, Р. Э. Хабибуллина // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – № 23. – С. 127–129.
18. Кардиоваскулярная профилактика 2017. Российские национальные рекомендации. Российский кардиологический журнал. – 2018. – № 6. – С. 7–122. – DOI: 10.15829/1560-4071-2018-6-7-122.
19. Кардионутрициология: лечебное питание в профилактике и лечении ведущей патологии современности / А. В. Стародубова, Е. Н. Ливанцова, С. А. Дербенева [и др.] // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89. – № 4. – С. 146–160. – DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10049.

20. Кашух, Е. А. Пробиотики, метаболизм функциональное состояние сердечно-сосудистой системы / Е. А. Кашух, В. Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2016. – Т. 26. – № 1. – С. 8–14.
21. Ковтун, О. П. Связь носительства полиморфизма гена PPARC ранним дебютом ожирения у детей / О.П. Ковтун, М.А. Устюжанина // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2018. – № 1. – С. 42–47. – DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-1-42-47.
22. Косматые корни растений – важный инструментарий для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей / Б. Р. Кулуев, З. Р. Вершинина, А. В. Князев [и др.] // Биомика. – 2015. – Т. 7. – № 2. – С. 70–120.
23. Метаболизм холестерина в макрофагах / В. А. Хотина, В. Н. Сухоруков, Д. А. Каширских [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2020. – № 9(2). – С. 91–101. – DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-91-101.
24. МР 2.3.1.1915-04 «Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 2 июля 2004 г.) – Москва, 2004.
25. МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов» / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва, 2011.
26. Мухиярова, И. И. Биоинформатический анализ миссенс-мутации Arg51Gln гена грелина (GHRH) / И. И. Мухиярова, В. Ю. Горбунова, И. В. Николаев // Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы. – 2017. – № 4 (44). – С. 41–48.
27. Нетрусов, А. И. Микробиология / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – Москва : Академия, 2012. – 384 с.
28. Никитина, М. А. Информационные технологии, как инструмент, в оценке и анализе сбалансированности рационов питания / М. А. Никитина, А. Б. Лисицын, И. М. Чернуха // Все о мясе. – 2021. – № 3. – С. 36–39. – DOI:10.21323/2071-2499-2021-3-36-39.
29. Нутриом как направление «главного удара»: определение физиологических потребностей в макро- и микронутриентах, минорных биологически активных веществах пищи / В. А. Тутельян, Д. Б. Никитюк, А. К. Батулин [и др.] // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89. – № 4. – С. 24–34. – DOI:10.24411/0042-8833-2020-10039.
30. Особенности получения вторичных метаболитов в культуре клеток, тканей и органов *Hedysarum theinum* (Fabaceae) *in vitro* / А. А. Эрст, Т. В. Железниченко, Т. А. Кукушкина [и др.] // Turczaninowia. – 2015. – Т. 18. – № 4. – С. 26–35. – DOI:10.14258/turczaninowia.18.4.3.

31. Патент № 2497536 РФ, МПК А61К 35/74, А61К 35/66, А61К 1/00, А61К 3/06. Новое применение пробиотиков / К. Каяндер, Р. Корпела; патентообладатель ВАЛИО ЛТД. – № 2010136972/15; заявл. 04.02.2009; опубл. 10.11.2013.

32. Патент № 2536939 РФ, МПК С12N 1/20, А61К 35/74, А61К 38/40, А61К 31/733, А61Р 1/00. Композиции, содержащие пробиотические и пребиотические компоненты и неорганические соли с лактоферрином / В. Лонгони, М. Пенчи; патентообладатель Пфайзер Италия С.р.л. – № 2011128133/10; заявл. 12.01.2010; опубл. 27.12.2014.

33. Патент № 2571211 РФ, МПК С12N 1/20, А61К 35/74, А61Р 3/00. Артериальные композиции для профилактики и лечения дегенеративного заболевания / С. Пракаш, М. Л. Джоунс, К. Мартони; патентообладатель ЮАС ЛЭБОРЭТОРИЗ Эл-ЭлСи. – № 2011148944/10; заявл. 30.04.2010; опубл. 20.12.2015.

34. Патент № 2614116 РФ, МПК С12N 1/20, А23С 9/12. Способ получения пробиотической композиции / В. И. Ганина; патентообладатель М.А. Головин. – № 2015129989; заявл. 21.07.2015; опубл. 22.03.2017.

35. Патент № 2627651 РФ, МПК А61К 35/747, С07К 14/47, С12N 1/20, А61Р 37/02, А61Р 39/06, А61Р 9/12, А61Р 9/02, А61Р 1/14. Полибактериальный препарат с преимуществами для здоровья: с антиоксидантным эффектом, снижением концентрации холестерина, противовоспалительным иммуномодулирующим эффектом и высвобождением биоактивных пептидов, ингибирующих ангиотензин-конвертирующий фермент / Ж. Димитров, М. Михайлова; патентообладатель ЛБ БУЛГАРИКУМ ПЛС. – № 2013153578; заявл. 03.05.2012; опубл. 09.08.2017.

36. Патент № 2672571 РФ, МПК А61К 35/747, А61Р 3/00, А61Р 37/02. Штамм *Lactobacillus gasseri* и бактериальный препарат с гипохолестеринемической и противовоспалительной иммуномодулирующей активностями / Ж. Димитров, М. Михайлова; патентообладатель ЛБ БУЛГАРИКУМ ПЛС. – № 2017126392; заявл. 03.05.2012; опубл. 16.11.2018.

37. Патент № 2691145 РФ, МПК G01N 33/50, С12Q 1/6827, А23L 33/20. Способ формирования индивидуальных диетических рекомендаций на основе ДНК анализа / В. В. Волобуев, В. В. Полуновский, А. В. Цветкович, Л. А. Селедцова; патентообладатель ООО «Национальный центр генетических исследований». – № 2017135876; заявл. 09.10.2017; опубл. 11.06.2019.

38. Патент № 2692651 РФ, МПК А23L 33/10, А23L 33/125, А23L 33/15. Специализированный пищевой продукт для профилактики атеросклероза, сердечно-сосудистых заболеваний и коррекции обменных нарушений, и способ его получения / Е. Ю. Лобач, Б. Тохириён, Ю. Г. Гурьянов, В. М. Позняковский; патентообладатель ГБОУ ВО «УрГЭУ». – № 2018106412; заявл. 20.02.2018; опубл. 20.02.2018.

39. Патент № 2698092 РФ, МПК А23L 33/10, А23L 33/125, А23L 33/15. Способ выявления предрасположенности к заболеванию атеросклерозом на основе определения экспрессии генов, вовлеченных в накопление холестерина / Н. Г.

Никифоров, А. Н. Орехов, И. А. Собенин, В. П. Карагодин; патентообладатель ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии». – № 2018112967; заявл. 10.04.2018; опубл. 10.04.2018.

40. Патент № 2706069 РФ, МПК С12N 1/20, А61К 35/745, А61К 35/747, А61К 31/702. Иммунобиотический комплекс / В. В. Марченкова, Т. А. Чеботарева; патентообладатель В. В. Марченкова, Т. А. Чеботарева. – № 2016103964; заявл. 08.02.2016; опубл. 13.11.2019.

41. Патент № 2722038 РФ, МПК С12N 1/20, А61К 35/74, С12R 1/01, С12R 1/225. Пробиотические штаммы, обладающие способностью поглощать холестерин, способы и их применение / АИ. Саньюдо Отеро, Р. Криадо Гарсия, А. Родригес Ногалес [и др.]; заявитель и патентообладатель С.А. БИОСЕРЧ. – № 2017121227; заявл. 10.12.2015; опубл. 26.05.2020.

42. Пат. № 2200566 РФ, МПК А61К 35/74. Способ получения лактобактерина / В. А. Несчисляев, И. В. Фадеева; патентообладатель ПНПО «Биомед». – № 2001121098/14; заявл. 26.07.2001; опубл. 20.03.2003.

43. Патент № № 2490022 РФ, МПК А61К 36/48, В01D 11/02. Способ получения фитопрепаратов из растений рода *Hedysarum* (копеечник чайный *Hedysarum theinum*, копеечник забытый *Hedysarum neglectum*) / Ю. С. Федорова, П. В. Кузнецов, А. С. Сухих; патентообладатель ГБОУ ВПО «КемГМА» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации. – № 2012110749/15; заявл. 20.03.2012; опубл. 20.08.2013.

44. Патент № 2730853 РФ, МПК А61К 36/41, А61К 36/28, А61Р 21/00. Композиции и способы для улучшенного мышечного метаболизма / А. Ш. Били, М. Мейер, К. Шевалье [и др.]; патентообладатель НАТУРЕКС СА. – № 2017127509; заявл. 03.02.2016; опубл. 26.08.2020.

45. Патент № 2740096 РФ, МПК С12N 1/20, А61К 35/745, А61Р 37/02. *Bifidobacterium longum* для лечения ожирения и ассоциированных метаболических расстройств / Б. Къели, Э. Ф. Мерфи, С. Хили; патентообладатель ЭЛИМЕНТАРИ ХЕЛТ ЛИМИТЕД. – № 2018119287; заявл. 09.12.2016; опубл. 11.01.2021.

46. Перспективы использования растительных полифенолов в качестве функциональных пищевых ингредиентов / В. К. Мазо, Ю. С. Сидорова, В. А. Саркисян [и др.] // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87. – № 6. – С. 57–66. – DOI:10.24411/0042-8833-2018-10067.

47. Полиморфизм генов белков – регуляторов воспаления при атеросклерозе, осложненном развитием острого инфаркта миокарда / В. И. Коненков, А. В. Шевченко, В. Ф. Прокофьев [и др.] // Атеросклероз. – 2011. – Т. 7. – № 1. – С. 5–18.

48. Полиморфизмы генов *LEPR* (Arg223Gln), *FTO* (A23525T), *ADRB3* (Trp64Arg) и *PPARG* (Pro12Ala) в норме и при избыточной массе тела / Р. А. Тхакушинов, С. П. Лысенко, А. Р. Тугуз [и др.] // Ежеквартальный рецензируемый, реферируемый научный журнал «Вестник АГУ». – 2016. – № 4. – С. 80–87.

49. Получение пробиотического консорциума на основе выделенных из коровьего молока штаммов / А. Д. Веснина, Н. В. Фотина, А. Ю. Просеков [и др.] // Молочнохозяйственный вестник. – 2021. – № 2 (42). – С. 107–121. – DOI:10.52231/2225-4269_2021_2_107.
50. Применение специализированных пищевых продуктов в диетотерапии больных с сердечно-сосудистой патологией / С. А. Дербенева, А. В. Погожева, В. М. Воробьева [и др.]. – Санкт-Петербург: Научно-технологические технологии, 2021. – 187 с.
51. Проектирование персонализированных рационов с применением функциональных пищевых продуктов / В. Н. Иванова, И. А. Никитин, Н. М. Портнов [и др.] // Пищевая промышленность. – 2018. – № 11. – С. 10–16.
52. Разработка пробиотического консорциума для людей с онкологическими заболеваниями / А. Д. Веснина, А. Ю. Просеков, О. В. Козлова [и др.] // Вестник ВГУИТ. – 2021. – Т. 83. – № 1(87). – С. 219–232. – DOI:10.20914/2310-1202-2021-1-219-232.
53. Роль генов антиоксидантной системы в формировании клинических фенотипов ишемической болезни сердца / А. А. Подольская, А. С. Галявич, Е. В. Майкова [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2013. – Т. 94. – № 2. – С. 228–234.
54. Роль генов фиброгенеза в формировании подверженности к коронарному атеросклерозу / И. А. Гончарова, Т. Б. Печерина, А. В. Марков [и др.] // Кардиология. – 2018. – № 58(8). – С. 33–44. – DOI:10.18087/cardio.2018.8.10160.
55. Роль оптимального питания в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний / Н. С. Сметнева, А. В. Погожева, Ю. Л. Васильев [и др.] // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89. – № 3. – С. 114–124. – DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10035.
56. Сердечно-сосудистые заболевания. URL: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/cardiovascular-diseases2> (дата обращения 26.01.2021).
57. Скрипникова, И. А. Артериальная кальцификация, атеросклероз и остеопороз: только клинические ассоциации или генетическая платформа? / И. А. Скрипникова, М. А. Колчина, А. Н. Мешков [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2021. – № 20(7). – С. 3034. – DOI:10.15829/1728-8800-2021-3034.
58. Старостина, Н. П. Перспективы применения растений рода копеечник (*Hedysarum*) в медицине и фармации / Н. П. Старостина, Н. А. Дурнова // Дневник науки. – 2021. – № 4(52). – DOI:10.51691/2541-8327_2021_4_4.
59. Тутельян, В. А. Здоровое питание для общественного здоровья / В. А. Тутельян // Общественное здоровье. – 2021. – Т. 1. – № 1. – С. 56–64. – DOI:10.21045/2782-1676-2021-1-1-56-64.
60. Фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens*: новые перспективы в лечении атеросклероза / С. П. Крыжановский, Т. А. Кузнецова, Б. И. Гельцер [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16. – № 1. – С. 82–87. – DOI:10.17650/1726-9784-2017-16-1-82-87.

61. Цифровая нутрициология: спектральные портреты меню оптимального питания / Ю. Н. Орлов, А. А. Кислицын, А. О. Камбаров [и др.] // Научная визуализация. – 2020. – Т. 12. – № 2. – С. 139–150. – DOI:10.26583/sv.12.2.11.

62. A Combination of Prebiotic Inulin and Oligofructose Improve Some of Cardiovascular Disease Risk Factors in Women with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Clinical Trial / A. Aliasgharzadeh, M. Khalili, E. Mirtaheri [et al.] // Advanced pharmaceutical bulletin. – 2015. – № 5(4). – P. 507–514. – DOI:10.15171/apb.2015.069.

63. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels / L. Forsberg, L. Lyrenäs, U. de Faire [et al.] // Free radical biology & medicine. – 2001. – № 30(5). – P. 500–505. – DOI:10.1016/s0891-5849(00)00487-1.

64. A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis* / Z. L. Wang, S. Wang, Y. Kuang [et al.] // Pharmaceutical biology. – 2018. – № 56 (1). – P. 465–484. – DOI:10.1080/13880209.2018.1492620.

65. A developed high-performance thin-layer chromatography method for the determination of baicalin in *Oroxylum indicum* L. and its antioxidant activity / S. N. Adin, I. Gupta, A. Ahad [et al.] // Journal of Planar Chromatography-Modern TLC. – 2022. – № 35(4). – P. 383–393. – DOI:10.1007/s00764-022-00182-4.

66. A high intake of saturated fatty acids strengthens the association between the fat mass and obesity-associated gene and BMI / D. Corella, D. K. Arnett, K. L. Tucker [et al.] // J Nutr. – 2011. – № 141 (12). – P. 2219–2225. – DOI:10.3945/jn.111.143826.

67. A preparation of herbal medicine *Salvia miltiorrhiza* reduces expression of intercellular adhesion molecule-1 and development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice / S. Ling, A. Dai, Z. Guo [et al.] // J Cardiovasc Pharmacol. – 2008. – № 51. – P. 38–44.

68. A Randomized Controlled Clinical Trial Investigating the Effect of Synbiotic Administration on Markers of Insulin Metabolism and Lipid Profiles in Overweight Type 2 Diabetic Patients with Coronary Heart Disease / M. Tajabadi-Ebrahimi, N. Sharifi, A. Farrokhian [et al.] // Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association. – 2017. – № 125(1). – P. 21–27. – DOI:10.1055/s-0042-105441.

69. Abdullah, M. M. Nutrigenetics of cholesterol metabolism: observational and dietary intervention studies in the postgenomic era / M. M. Abdullah, P. J. Jones, P. K. Eck // Nutrition reviews. – 2015. – № 73(8). – P. 523–543. – DOI:10.1093/nutrit/nuv016.

70. Acetaldehyde dehydrogenase 2 interactions with LDLR and AMPK regulate foam cell formation / S. Zhong, L. Li, Y. L. Zhang [et al.] // The Journal of clinical investigation. – 2019. – № 129(1). – P. 252–267. – DOI:10.1172/JCI122064.

71. Aged Garlic Extract Suppresses the Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice / N. Morihara, A. Hino, T. Yamaguchi [et al.] // *The Journal of nutrition*. – 2016. – № 146(2). – P. 460S–463S. – DOI:10.3945/jn.114.206953.

72. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Scutellaria baicalensis* and production of flavonoids in hairy roots / R. K. Tiwari, M. Trivedi, Z. C. Guang [et al.] // *Biol Plant*. – 2008. – № 52. – P. 26–35. – DOI:10.1007/s10535-008-0004-9.

73. *Akkermansia muciniphila* Exerts Lipid-Lowering and Immunomodulatory Effects without Affecting Neointima Formation in Hyperlipidemic APOE*3-Leiden.CETP Mice / S. Katiraei, M. R. de Vries, A. H. Costain [et al.] // *Molecular nutrition & food research*. – 2020. – № 64(15). – P. e1900732. – DOI:10.1002/mnfr.201900732.

74. *Akkermansia Muciniphila* Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in Apoe^{-/-} Mice / J. Li, S. Lin, P. M. Vanhoutte [et al.] // *Circulation*. – 2016. – № 133(24). – P. 2434–2446. – DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.019645.

75. Ala54Thr fatty acid-binding protein 2 (FABP2) polymorphism in recurrent depression: associations with fatty acid concentrations and waist circumference / R. J. Mocking, A. Lok, J. Assies [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – № 8(12). – P. e82980. – DOI:10.1371/journal.pone.0082980.

76. Ala54Thr polymorphism of the fatty acid binding protein 2 gene and saturated fat intake in relation to lipid levels and insulin resistance: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study / A. M. Chamberlain, P. J. Schreiner, M. Fornage [et al.] // *Metabolism: clinical and experimental*. – 2009. – № 58(9). – P. 1222–1228. – DOI:10.1016/j.metabol.2009.04.007.

77. An in vivo assessment of the cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults / A. Costabile, I. Buttarazzi, S. Kolida [et al.] // *PloS one*. – 2017. – № 12(12). – P. e0187964. – DOI:10.1371/journal.pone.0187964.

78. Analysis of the genetic variants associated with circulating levels of sgp130. Results from the IMPROVE study / A. Bonomi, F. Veglia, D. Baldassarre [et al.] // *Genes and immunity*. – 2020. – № 21(2). – P. 100–108. – DOI:10.1038/s41435-019-0090-z.

79. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology / V. A. Ivanisenko, O. V. Saik, N. V. Ivanisenko [et al.] // *BMC systems biology*. – 2015. – 9 Suppl 2 (Suppl 2). – S2. – DOI:10.1186/1752-0509-9-S2-S2.

80. Anti-atherogenic effect of *Humulus japonicus* in apolipoprotein E-deficient mice / H. Lim, J. R. Noh, Y. H. Kim [et al.] // *International journal of molecular medicine*. – 2016. – № 38(4). – P. 1101–1110. – DOI:10.3892/ijmm.2016.2727.

81. Anti-atherosclerotic effect of traditional fermented cheese whey in atherosclerotic rabbits and identification of probiotics / X. H. Nabi, C. Y. Ma, T. Manaer [et

al.] // BMC complementary and alternative medicine. – 2016. – № 16(1). – P. 309. – DOI:10.1186/s12906-016-1285-8.

82. Anti-atherosclerotic potential of baicalin mediated by promoting cholesterol efflux from macrophages via the PPAR γ -LXR α -ABCA1/ABCG1 pathway / X. W. He, D. Yu, W. L. Li [et al.] // Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. – 2016. – № 83. – P. 257–264. – DOI:10.1016/j.biopha.2016.06.046.

83. Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria / A. Davoodabadi, M.M. Dallal, A.R. Foroushani [et al.] // Anaerobe. – 2015. – № 34. – P. 53–58. – DOI:10.1016/j.anaerobe.2015.04.014.

84. Antibiotic activity and resistance of lactic acid bacteria and other antagonistic bacteriocin-producing microorganisms / Y. Yang, O. Babich, S. Sukhikh [et al.] // Foods and Raw Materials. – 2020. – № 8(2). – P. 377–384. – DOI:10.21603/2308-4057-2020-2-377-384.

85. Antimicrobial and antioxidant activity of *Panax ginseng* and *Hedysarum neglectum* root crop extracts / L. S. Dyshlyuk, N. V. Fotina, I. S. Milentyeva, [et al.] // Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia. – 2022. – № 84. – P. e256944. – DOI:10.1590/1519-6984.256944.

86. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente [et al.] // Free radical biology & medicine. – 1999. – № 26(9–10). – P. 1231–1237. – DOI:10.1016/s0891-5849(98)00315-3.

87. Antioxidant and DNA Repair Stimulating Effect of Extracts from Transformed and Normal Roots of *Rhaponticum carthamoides* against Induced Oxidative Stress and DNA Damage in CHO Cells / E. Skała, P. Sitarek, M. Różalski [et al.] // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2016. – P. 5753139. – DOI:10.1155/2016/5753139.

88. Antioxidant Peptides from *Sepia esculenta* Hydrolyzate Attenuate Oxidative Stress and Fat Accumulation in *Caenorhabditis elegans* / X. Yu, Q. Su, T. Shen [et al.] // Marine drugs. – 2020. – № 18(10). – P. 490. – DOI:10.3390/md18100490.

89. Anti-oxidant response of lipidom modulates lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans* and in OxLDL-induced human macrophages by tuning inflammatory mediators / A. Balkrishna, V. Gohel, N. Pathak [et al.] // Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. – 2023. – № 160. – P. 114309. – DOI:10.1016/j.biopha.2023.114309.

90. Association between Polymorphisms of Antioxidant Gene (*MnSOD*, *CAT* and *GPx1*) and Risk of Coronary Artery Disease / H. L. Yeh, L. T. Kuo, F. C. Sung [et al.] // BioMed research international. – 2018. – P. 5086869. – DOI:10.1155/2018/5086869.

91. Association between PPAR γ genetic polymorphisms and ischemic stroke risk in a northern Chinese Han population: a case-control study / Y. Z. Wang, H. Y. Zhang, F. Liu [et al.] // Neural regeneration research. – 2019. – № 14(11). – P. 1986–1993. – DOI:10.4103/1673-5374.259621.

92. Association between taste receptor (TAS) genes and the perception of wine characteristics / M. Carrai, D. Campa, P. Vodicka [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – № 7 (1). – P. 9239. – DOI:10.1038/s41598-017-08946-3.
93. Associations between Single Nucleotide Polymorphisms and Total Energy, Carbohydrate, and Fat Intakes: A Systematic Review / T. Drabsch, J. Gatzemeier, L. Pfadenhauer [et al.] // *Adv Nutr.* – 2018. – № 9 (4). – P. 425–453.
94. Baik, J. H. Dopamine signaling in reward-related behaviors / J. H. Baik // *Front Neural Circuits.* – 2013. – № 7. – P. 152. – DOI:10.3389/fncir.2013.00152.
95. Bandera Merchan, B. Commonalities in the Association between PPARG and Vitamin D Related with Obesity and Carcinogenesis / B. Bandera Merchan, F.J. Tinahones, M. Macías-Gonzalez // *PPAR Res.* – 2016. – № 2016. – P. 2308249. – DOI:10.1155/2016/2308249.
96. Baradaran Rahimi, V. Promising influences of *Scutellaria baicalensis* and its two active constituents, baicalin, and baicalein, against metabolic syndrome: A review / V. Baradaran Rahimi, V. R. Askari, H. Hosseinzadeh // *Phytotherapy research : PTR.* – 2021. – № 35(7). – P. 3558–3574. – DOI:10.1002/ptr.7046.
97. Barrington, W. T. Atherosclerosis: Association between the gut microbiome and atherosclerosis / W. T. Barrington, A. J. Lusis // *Nature reviews. Cardiology.* – 2017. – № 14(12). – P. 699–700. – DOI:10.1038/nrcardio.2017.169.
98. Beneficial Effects of Resveratrol Administration-Focus on Potential Biochemical Mechanisms in Cardiovascular Conditions / M. Wiciński, M. Socha, M. Walczak [et al.] // *Nutrients.* – 2018. – № 10(11). – P. 1813 – DOI:10.3390/nu10111813.
99. Berberine-sonodynamic therapy induces autophagy and lipid unloading in macrophage / J. Y. Kou, Y. Li, Z. Y. Zhong [et al.] // *Cell death & disease.* – 2017. – № 8(1). – P. e2558. – DOI:10.1038/cddis.2016.354.
100. *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis LKM512 reduces levels of intestinal trimethylamine produced by intestinal microbiota in healthy volunteers: A double-blind, placebo-controlled study / M. Matsumoto, Y. Kitada, Y. Shimomura [et al.] // *Journal of Functional Foods.* – 2017. – № 36. – P. 94–101. – DOI:10.1016/j.jff.2017.06.032.
101. Bilberry anthocyanin-rich extract alters expression of genes related to atherosclerosis development in aorta of apo E-deficient mice / A. Mauray, C. Felgines, C. Morand [et al.] // *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD.* – 2012. – № 22(1). – P. 72–80. – DOI:10.1016/j.numecd.2010.04.011.
102. Bonnefont-Rousselot, D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases / D. Bonnefont-Rousselot // *Nutrients.* – 2016. – № 8(5). – P. 250. – DOI:10.3390/nu8050250.
103. CD36 and macrophages in atherosclerosis / S. Collot-Teixeira, J. Martin, C. McDermott-Roe [et al.] // *Cardiovascular research.* – 2007. – № 75(3). – P. 468–477. – DOI:10.1016/j.cardiores.2007.03.010.

104. Characterization of different plaque forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains / G. Vervliet, M. Holsters, H. Teuchy [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 1975. – № 26. – P. 33–48. – DOI:10.1099/0022-1317-26-1-33.

105. Chen, Y. Ultrasound-Assisted Aqueous Extraction of Chlorogenic Acid and Cynarin with the Impact of Inulin from Burdock (*Arctium lappa* L.) Roots / Y. Chen, J. Y. Su, C. Y. Yang // *Antioxidants* (Basel, Switzerland). – 2022. – № 11(7). – P. 1219. – DOI:10.3390/antiox11071219.

106. Chlorogenic acid protects against atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice and promotes cholesterol efflux from RAW264.7 macrophages / C. Wu, H. Luan, X. Zhang [et al.] // *PloS one.* – 2014. – № 9(9). – P. e95452. – DOI:10.1371/journal.pone.0095452.

107. Chlorogenic Acid Stimulates the Thermogenesis of Brown Adipocytes by Promoting the Uptake of Glucose and the Function of Mitochondria / X. Han, Y. Zhang, J. Guo [et al.] // *Journal of food science.* – 2019. – № 84(12). – P. 3815–3824. – DOI:10.1111/1750-3841.14838.

108. Cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults / M. C. Fuentes, T. Lajo, J. M. Carrion [et al.] // *The British journal of nutrition.* – 2013. – № 109(10). – P. 1866–1872. – DOI:10.1017/S000711451200373X.

109. Clinical Advances in Immunonutrition and Atherosclerosis: A Review / A. M. Ruiz-León, M. Lapuente, R. Estruch [et al.] // *Frontiers in immunology.* – 2019. – № 10. – P. 837. – DOI:10.3389/fim-mu.2019.00837.

110. CMO1 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabolism in mice / S. Hessel, A. Eichinger, A. Isken [et al.] // *The Journal of biological chemistry.* – 2007. – № 282(46). – P. 33553–33561. – DOI:10.1074/jbc.M706763200.

111. Comparison of Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Effects between Fresh and Aged Black Garlic Extracts / Y. Y. Jeong, J. H. Ryu, J. H. Shin [et al.] // *Molecules* (Basel, Switzerland). – 2016. – № 21(4). – P. 430. – DOI:10.3390/molecules21040430.

112. Comparison of Artificial Neural Networks and Response Surface Methodology towards an Efficient Ultrasound-Assisted Extraction of Chlorogenic Acid from *Lonicera japonica* / H. C. Yu, S. M. Huang, W. M Lin [et al.] // *Molecules* (Basel, Switzerland). – 2019. – № 24(12). – P. 2304. – DOI:10.3390/molecules24122304.

113. Cortisol promotes stress tolerance via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans* / K. Yasuda, Y. Kubo, H. Murata [et al.] // *Biochem Biophys Rep.* – 2021. – № 8(26). – P.100961. – DOI:10.1016/j.bbrep.2021.100961.

114. Curcumin induces paraoxonase 1 in cultured hepatocytes in vitro but not in mouse liver in vivo / C. Schrader, C. Schiborr, J. Frank [et al.] // *The British journal of nutrition.* – 2011. – № 105(2). – P. 167–170. – DOI:10.1017/S0007114510004356.

115. Dairy Fats and Cardiovascular Disease: Do We Really Need to be Concerned? / R. Lordan, A. Tsoupras, B. Mitra [et al.] // *Foods* (Basel, Switzerland). – 2018. – № 7(3). – P. 29. – DOI:10.3390/foods7030029.

116. Danaher, J. Similarities in Metabolic Flexibility and Hunger Hormone Ghrelin Exist between FTO Gene Variants in Response to an Acute Dietary Challenge/ J. Danaher, C. G. Stathis, M. B. Cooke // *Nutrients*. – 2019. – № 11 (10). – P. 2518. – DOI:10.3390/nu11102518.

117. De Caterina, R. Moving towards Specific Nutrigenetic Recommendation Algorithms: Caffeine, Genetic Variation and Cardiovascular Risk / R. De Caterina, A. El-Sohemy // *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*. – 2016. – № 9(2–4). – P. 106–115. – DOI:10.1159/000446801.

118. Dietary Mannan Oligosaccharides Modulate Gut Microbiota, Increase Fecal Bile Acid Excretion, and Decrease Plasma Cholesterol and Atherosclerosis Development / L. R. Hoving, S. Katiraei, M. Heijink [et al.] // *Molecular nutrition & food research*. – 2018. – № 62(10). – P. e1700942. – DOI:10.1002/mnfr.201700942.

119. Dietary quality indices modifies the effects of melanocortin-4 receptor (MC4R) rs17782313 polymorphism on cardio-metabolic risk factors and hypothalamic hormones in obese adults / M. Khodarahmi, H. Kahroba, M.A. Jafarabadi [et al.] // *BMC Cardiovasc Disord*. – 2020. – № 20 (1). – P. 57. – DOI:10.1186/s12872-020-01366-8.

120. Dietary rice protein isolate attenuates atherosclerosis in apoE-deficient mice by upregulating antioxidant enzymes / R. L. Burriss, C. H. Xie, P. Thampi [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2010. – № 212(1). – P. 107–115. – DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.018.

121. Dietary α -cyclodextrin reduces atherosclerosis and modifies gut flora in apolipoprotein E-deficient mice / T. Sakurai, A. Sakurai, Y. Chen [et al.] // *Molecular nutrition & food research* – 2017. – № 61(8). – DOI:10.1002/mnfr.201600804.

122. Direct-to-Consumer Nutrigenetics Testing: An Overview / M. Floris, A. Cano, L. Porru [et al.] // *Nutrients*. – 2020. – № 12(2). – P. 566. – DOI:10.3390/nu12020566.

123. Effect of Berberine on Atherosclerosis and Gut Microbiota Modulation and Their Correlation in High-Fat Diet-Fed ApoE^{-/-} Mice / M. Wu, S. Yang, S. Wang [et al.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2020. – № 11. – P. 223. – DOI:10.3389/fphar.2020.00223.

124. Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria / T. F. Tsao, M. G. Newman, Y. Y. Kwok [et al.] // *J Dental Res*. – 1982. – № 61. – P. 1103–1106.

125. Effect of Momordica saponin- and Cyclocarya paliurus polysaccharide-enriched beverages on oxidative stress and fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* / C. Lin, Y. Lin, J. Xiao [et al.] // *Journal of the science of food and agriculture*. – 2021. – № 101(8). – P. 3366–3375. – DOI:10.1002/jsfa.10966.

126. Effect of probiotic supplementation along with calorie restriction on metabolic endotoxemia, and inflammation markers in coronary artery disease patients: a double blind

placebo controlled randomized clinical trial / J. Moludi, H. S. Kafil, S. A. Qaisar // Nutrition journal. – 2021. – № 20(1). – P. 47. – DOI:10.1186/s12937-021-00703-7.

127. Effect of *Rhaponticum carthamoides* extract on structural and metabolic parameters of erythrocytes in rats with cerebral ischemia / M. B. Plotnikov, O. I. Aliev, A. S. Vasil'ev [et al.] // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2008. – № 146(1). – P. 45–48. – DOI:10.1007/s10517-008-0202-7.

128. Effects and Mechanisms of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Postbiotics on Metabolic Diseases Targeting Gut Microbiota: A Narrative Review / H. Y. Li, D. D. Zhou, R. Y. Gan [et al.] // Nutrients. – 2021. – № 13(9). – P. 3211. – DOI:10.3390/nu13093211.

129. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: a randomized double-blind study / D. C. Cavallini, R. Bedani, L. Q. Bomdespacho [et al.] // Lipids in health and disease. – 2009. – № 8. – P. 1. – DOI:10.1186/1476-511X-8-1.

130. Effects of red wine polyphenolic compounds on paraoxonase-1 and lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in hyperhomocysteinemic mice / C. Noll, J. Hamelet, E. Matulewicz [et al.] // The Journal of nutritional biochemistry. – 2009. – № 20(8). – P. 586–596. – DOI:10.1016/j.jnutbio.2008.06.002.

131. Effects of regular and decaffeinated roasted coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) extracts and bioactive compounds on in vitro probiotic bacterial growth / A. L. Sales, J. dePaula, C. Mellinger Silva [et al.] // Food & function. – 2020. – № 11(2). – P. 1410–1424. – DOI:10.1039/c9fo02589h.

132. Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives / E. Skąła, A. Kicel, M. A. Olszewska [et al.] // BioMed research international. – 2015. – P. 181098. – DOI:10.1155/2015/181098.

133. Ethanolic extract of propolis inhibits atherosclerosis in ApoE-knockout mice / Y. Fang, H. Sang, N. Yuan // Lipids in health and disease. – 2013. – № 12. – P. 123. – DOI:10.1186/1476-511X-12-123.

134. Evaluation of *FTO* rs9939609 and *MC4R* rs17782313 Polymorphisms as Prognostic Biomarkers of Obesity: A Population-based Cross-sectional Study / M. Mozafarizadeh, M. Mohammadi, S. Sadeghi [et al.] // Oman Med J. – 2019. – № 34 (1). – P. 56–62.

135. Evaluation of the Cholesterol-Lowering Mechanism of *Enterococcus faecium* Strain 132 and *Lactobacillus paracasei* Strain 201 in Hypercholesterolemia Rats / L. Yang, X. Xie, Y. Li [et al.] // Nutrients. – 2021. – № 13(6). – P. 1982. – DOI:10.3390/nu13061982.

136. Extracts from *Astragalus membranaceus* limit myocardial cell death and improve cardiac function in a rat model of myocardial ischemia / X. Ma, K. Zhang, H. Li [et al.] // Journal of ethnopharmacology. – 2013. – № 149(3). – P. 720–728. – DOI:10.1016/j.jep.2013.07.036.

137. Farhud, D. Nutrigenomics and nutrigenetics / D. Farhud, M. Zarif Yeganeh, M. Zarif Yeganeh // Iranian journal of public health. – 2010. – № 39(4). – P. 1–14.

138. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol / I. Erlund, R. Koli, G. Alfthan [et al.] // The American journal of clinical nutrition. – 2008. – № 87(2). – P. 323–331. – DOI:10.1093/ajcn/87.2.323.

139. Flavonoid Production in Transformed *Scutellaria baicalensis* Roots and Ways of Its Regulation / I. N. Kuzovkina, A. V. Guseva, I. E. Alterman [et al.] // Russian Journal of Plant Physiology. – 2001. – № 48. – P. 448–452.

140. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi / Z. H. Gao, K. X. Huang, X. L. Yang [et al.] // BBA-Gen Subjects. – 1999. – № 1472. – P. 643–650.

141. From Neighborhood to Genome: Three Decades of Nutrition-Related Research from the Atherosclerosis Risk in Communities Study / M. R. Savoca, L. M. Steffen, A. G. Bertoni [et al.] // Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics. – 2017. – № 117(12). – P. 1881–1886.e10. – DOI:10.1016/j.jand.2017.08.008.

142. Functional foods and cardiometabolic diseases* International Task Force for Prevention of Cardiometabolic Diseases / G. Assmann, P. Buono, A. Daniele [et al.] // Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases – 2014. – № 24(12). – P. 1272–1300. – DOI:10.1016/j.numecd.2014.10.010.

143. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients / T. Hamanishi, H. Furuta, H. Kato [et al.] // Diabetes. – 2004. – № 53(9). – P. 2455–2460. – DOI:10.2337/diabetes.53.9.2455.

144. Gaboon, N. E. A. Nutritional genomics and personalized diet / N. E. A. Gaboon // Egyptian Journal of Medical Human Genetics. – 2012. – № 12 (1). – P. 1–7. – DOI:10.1016/j.ejmhg.2011.02.001.

145. Gamborg, O.L. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells / O. L. Gamborg, R. A. Miller, O. Ojima // Exp. Cell Res. – 1968. – № 50 (1) – P. 151–158.

146. Gene Polymorphisms of *FABP2*, *ADIPOQ* and ANP and Risk of Hypertriglyceridemia and Metabolic Syndrome in Afro-Caribbeans. / L. Larifla, C. Rambhojan, M.O. Joannes [et al.] // PLoS One. – 2016. – № 11 (9). – P. e0163421. – DOI:10.1371/journal.pone.0163421.

147. Genes and Eating Preferences, Their Roles in Personalized Nutrition / A. Vesnina, A. Prosekov, O. Kozlova [et al.] // Genes. – 2020. – № 11 (4). – P. 34. – DOI:10.3390/genes11040357.

148. Genetic test for the prescription of diets in support of physical activity / Z. Naureen, G. Miggiano, B. Aquilanti [et al.] // Acta bio-medica : Atenei Parmensis. – 2020. – № 91(13-S). – P. e2020011. – DOI:10.23750/abm.v91i13-S.10584.

149. Genetic variant in the glucose transporter type 2 is associated with higher intakes of sugars in two distinct populations / K. M. Eny, T. M. Wolever, B. Fontaine-Bisson [et al.] // *Physiol Genomics*. – 2008. – № 33 (3). – P. 355–360. – DOI:10.1152/physiolgenomics.00148.2007.

150. Genetic variant *SLC2A2* Is associated with risk of cardiovascular disease – assessing the individual and cumulative effect of 46 type 2 diabetes related genetic variants / A. Borglykke, N. Grarup, T. Sparso [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – № 7 (11). – P. e50418. – DOI:10.1371/journal.pone.0050418.

151. Ghrelin enhances food intake and carbohydrate oxidation in a nitric oxide dependent manner / S. Abtahi, A. Mirza, E. Howell [et al.] // *General and comparative endocrinology*. – 2017. – № 250. – P. 9–14. – DOI:10.1016/j.ygcen.2017.05.017.

152. Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, inhibits LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein E-deficient mice / B. Fuhrman, M. Rosenblat, T. Hayek [et al.] // *The Journal of nutrition*. – 2000. – № 130(5). – P. 1124–1131. – DOI:10.1093/jn/130.5.1124.

153. Gluskin, B.S. Genetic variation and dopamine D2 receptor availability: a systematic review and meta-analysis of human in vivo molecular imaging studies / B. S. Gluskin, B. J. Mickey // *Transl Psychiatry*. – 2016. – № 6 (3) – P. e747. – DOI:10.1038/tp.2016.22.

154. Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction: results from the AtheroGene study / R. Schnabel, K. J. Lackner, H. J. Rupprecht [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2005. – № 45(10). – P. 1631–1637. – DOI:10.1016/j.jacc.2005.02.053.

155. Guide and Position of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics on Personalised Nutrition: Part 1 – Fields of Precision Nutrition / L. R. Ferguson, R. De Caterina, U. Görman [et al.] // *J Nutrigenet Nutrigenomics*. – 2016. – № 9(1). – P.12–27. – DOI:10.1159/000445350.

156. Guiding Global Best Practice in Personalized Nutrition Based on Genetics: The Development of a Nutrigenomics Care Map / J. R. Horne, D. E. Nielsen, J. Madill [et al.] // *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. – 2021. – P. S2212-2672(21)00099-X. – DOI:10.1016/j.jand.2021.02.008.

157. Hairy Roots of *Scutellaria* spp. (Lamiaceae) as Promising Producers of Antiviral Flavones / A. Y. Stepanova, A. I. Solov'eva, M. V. Malunova [et al.] // *Molecules* (Basel, Switzerland). – 2021. – № 26(13). – P. 3927. – DOI:10.3390/molecules26133927.

158. High fat diet induced atherosclerosis is accompanied with low colonic bacterial diversity and altered abundances that correlates with plaque size, plasma A-FABP and cholesterol: a pilot study of high fat diet and its intervention with *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) or telmisartan in ApoE^{-/-} mice / Y. K. Chan, M. S. Brar,

P. V. Kirjavainen [et al.] // *BMC microbiology*. – 2016. – № 16(1). – P. 264. – DOI:10.1186/s12866-016-0883-4.

159. Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk / A. Sharma, M. Lavania, R. Singh [et al.] // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2021. – № 28 (3). – P. 1622–1632. – DOI:10.1016/j.sjbs.2020.11.062.

160. Impact of apolipoprotein E genotype and dietary quercetin on paraoxonase 1 status in apoE3 and apoE4 transgenic mice / C. Boesch-Saadatmandi, J. Niering, A. M. Minihane [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2010. – № 211(1). – P. 110–113. – DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2010.02.027.

161. In situ visualization of carbonylation and its co-localization with proteins, lipids, DNA and RNA in *Caenorhabditis elegans* / M. Kuzmic, H. Javot, J. M. Bonzom [et al.] // *Free radical biology & medicine*. – 2016. – № 101. – P. 465–474. – DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.004.

162. Inflammation inhibition and gut microbiota regulation by TSG to combat atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice / F. Li, T. Zhang, Y. He, [et al.] // *Journal of ethnopharmacology*. – 2020. – № 247. – P. 112232. – DOI:10.1016/j.jep.2019.112232.

163. Inhibition of human glioma cell proliferation by altered Bax/Bcl-2-p53 expression and apoptosis induction by *Rhaponticum carthamoides* extracts from transformed and normal roots / E. Skąła, P. Sitarek, M. Toma [et al.] // *The Journal of pharmacy and pharmacology*. – 2016. – № 68(11). – P. 1454–1464. – DOI:10.1111/jphp.12619.

164. Inhibitive effects of mulberry leaf-related extracts on cell adhesion and inflammatory response in human aortic endothelial cells / P. Y. Chao, K. H. Lin, C. C. Chiu [et al.] // *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. – 2013. – P. 267217. – DOI:10.1155/2013/267217.

165. Inhibitory Effect of Delphinidin on Monocyte–Endothelial Cell Adhesion Induced by Oxidized Low-Density Lipoprotein via ROS/p38MAPK/NF-κB Pathway / C. Chen, L. Yi, X. Jin [et al.] // *Cell Biochem Biophys*. – 2011. – № 61. – P. 337–348. – DOI:10.1007/s12013-011-9216-2.

166. Integrative studies implicate matrix metalloproteinase-12 as a culprit gene for large-artery atherosclerotic stroke / H. Mahdessian, L. Perisic Matic, M. Lengquist [et al.] // *Journal of internal medicine*. – 2017. – № 282(5). – P. 429–444. – DOI:10.1111/joim.12655.

167. Interaction of serum vitamin B12 and folate with MTHFR genotypes on risk of ischemic stroke / X., Qin, J. D. Spence, J. Li [et al.] // *Neurology*. – 2020. – № 94(11). – P. e1126–e1136. – DOI:10.1212/WNL.0000000000008932.

168. Intestinal fatty acid-binding protein mediates atherosclerotic progress through increasing intestinal inflammation and permeability / L. Zhang, F. Wang, J. Wang [et al.] // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2020. – № 24(9). – P. 5205–5212. – DOI:10.1111/jcmm.15173.

169. Inulin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice / M. Rault-Nania, E. Gueux, C. Demougeot [et al.] // *British Journal of Nutrition*. – 2006. – № 96(5). – P. 840–844. – DOI:10.1017/BJN20061913.

170. Isolation and identification of potential probiotic *Lactobacillus* species from feces of infants in southwest Iran / N. Jomehzadeh, H. Javaherizadeh, M. Amin [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – № 96. – P. 524–530. – DOI:10.1016/j.ijid.2020.05.034.

171. Jaiswal, N. Onion extract (*Allium cepa* L.), quercetin and catechin up-regulate paraoxonase 1 activity with concomitant protection against low-density lipoprotein oxidation in male Wistar rats subjected to oxidative stress / N. Jaiswal, S. I. Rizvi // *Journal of the science of food and agriculture*. – 2014. – № 94(13). – P. 2752–2757. – DOI:10.1002/jsfa.6620.

172. Jones, M. L. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial / M. L. Jones, C. J. Martoni, S. Prakash // *European journal of clinical nutrition*. – 2012. – № 66(11). – P. 1234–1241. – DOI:10.1038/ejcn.2012.126.

173. Kokoska, L. Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: a review / L. Kokoska, D. Janovska // *Phytochemistry*. – 2009. – № 70(7). – P. 842–855. – DOI:10.1016/j.phytochem.2009.04.008.

174. Kuhl, G. C. Biohydrogenation of Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria for the Production of Functional Cultured Dairy Products: A Review / G. C. Kuhl, J. De Dea Lindner // *Foods* (Basel, Switzerland). – 2016. – № 5(1). – P. 13. – DOI:10.3390/foods5010013.

175. Kumar, R. Evaluation of Antioxidant, Hypolipidemic, and Antiatherogenic Property of Lycopene and Astaxanthin in Atherosclerosis-induced Rats / R. Kumar, K. J. Salwe, M. Kumarappan // *Pharmacognosy research*. – 2017. – № 9(2). – P. 161–167. – DOI:10.4103/0974-8490.204654.

176. Kumar, S. A. Inulin oligofructose attenuates metabolic syndrome in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats / S. A. Kumar, L. C. Ward, L. Brown // *The British journal of nutrition*. – 2016. – № 116(9). – P. 1502–1511. – DOI:10.1017/S0007114516003627.

177. Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content / D. K. Lee, S. Jang, E. H. Baek [et al.] // *Lipids in health and disease*. – 2009. – № 8. – P. 21. – DOI:10.1186/1476-511X-8-21.

178. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 prevents atherosclerosis via inhibition of intestinal cholesterol absorption in apolipoprotein E-knockout mice / Y. Huang, J. Wang, G. Quan [et al.] // *Applied and environmental microbiology*. – 2014. – № 80(24). – P. 7496–7504. – DOI:10.1128/AEM.02926-14.

179. *Lactobacillus acidophilus* CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters / L.

G. Ooi, R. Ahmad, K. H. Yuen [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2010. – № 93(11). – P. 5048–5058. – DOI:10.3168/jds.2010-3311.

180. *Lactobacillus plantarum* 299v Supplementation Improves Vascular Endothelial Function and Reduces Inflammatory Biomarkers in Men With Stable Coronary Artery Disease / M. Malik, T. M. Suboc, S. Tyagi [et al.] // Circulation research. – 2018. – № 123(9). – P. 1091–1102. – DOI:10.1161/CIRCRESAHA.118.313565.

181. *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity / Y. Huang, X. Wang, J. Wang [et al.] // Journal of dairy science. – 2013. – № 96(5). – P. 2746–2753. – DOI:10.3168/jds.2012-6123.

182. *Lactobacillus rhamnosus* BFE 5264 and *Lactobacillus plantarum* NR74 Promote Cholesterol Excretion Through the Up-Regulation of ABCG5/8 in Caco-2 Cells / H. S. Yoon, J. H. Ju, H. Kim [et al.] // Probiotics and antimicrobial proteins. – 2011. – № 3(3–4). – P. 194–203. – DOI:10.1007/s12602-011-9086-3.

183. Large-scale separation of baicalin and wogonoside from *Scutellaria baicalensis* Georgi by the combination of pH-zone-refining and conventional counter-current chromatography / C. Wang, W. Sun, X. Wang [et al.] // Journal of chromatography. A. – 2019. – № 1601. – P. 266–273. – DOI:10.1016/j.chroma.2019.05.028.

184. Letexier, D. Addition of inulin to a moderately high-carbohydrate diet reduces hepatic lipogenesis and plasma triacylglycerol concentrations in humans / D. Letexier, F. Diraison, M. Beylot // The American journal of clinical nutrition. – 2003. – № 77(3). – P. 559–564. – DOI:10.1093/ajcn/77.3.559.

185. Li, Y. Association of the PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism with increased risk of cardiovascular diseases / Y. Li, J. Zhu, J. Q. Ding // Genetics and molecular research: GMR. – 2015. – № 14(4). – P. 18662–18674. – DOI:10.4238/2015.December.28.15.

186. Lingonberries reduce atherosclerosis in Apoe(-/-) mice in association with altered gut microbiota composition and improved lipid profile / C. Matziouridou, N. Marungruang, T. D. Nguyen [et al.] // Molecular nutrition & food research. – 2016. – № 60(5). – P. 1150–1160. – DOI:10.1002/mnfr.201500738.

187. Lipoteichoic acid from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BPL1: a novel postbiotic that reduces fat deposition via IGF-1 pathway / F. Balaguer, M. Enrique, S. Llopis [et al.] // Microbial biotechnology. – 2022. – № 15(3). – P. 805–816. – DOI:10.1111/1751-7915.13769.

188. Liu, Y. Optimization of the extraction of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi using the response surface methodology / Y. Liu, H. Wang, X. Cai // Journal of food science and technology. – 2015. – № 52(4). – P. 2336–2343. – DOI:10.1007/s13197-014-1275-0.

189. Loktionov, A. Common gene polymorphisms and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifactorial chronic diseases (review) / A. Loktionov // The Journal of Nutritional Biochemistry. – 2003. – № 14 (8). – P. 426–451. – DOI:10.1016/S0955-2863(03)00032-9.

190. Lupin protein isolate and cysteine-supplemented casein reduce calcification of atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice / K. Weisse, C. Brandsch, F. Hirche [et al.] // *The British journal of nutrition*. – 2010. – № 103(2). – P. 180–188. – DOI:10.1017/S0007114509991565.

191. Malhotra, A. An Organ System Approach to Explore the Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Cytoprotective Actions of Resveratrol / A. Malhotra, S. Bath, F. Elbarbry // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2015. – P. 803971. – DOI:10.1155/2015/803971.

192. Markers of Atherosclerosis: Part 2 - Genetic and Imaging Markers / M. Tibaut, M. Caprnda, P. Kubatka [et al.] // *Heart, lung & circulation*. – 2019. – № 28(5). – P. 678–689. – DOI:10.1016/j.hlc.2018.09.006.

193. Mathematical Modelling of Ultrasound-Assisted Extraction Kinetics of Bioactive Compounds from Artichoke By-Products / C. Reche, C. Rosselló, M. M. Umaña [et al.] // *Foods (Basel, Switzerland)*. – 2021. – № 10(5). – P. 931. – DOI:10.3390/foods10050931.

194. Meng, T. Common variants in the CD36 gene are associated with dietary fat intake, high-fat food consumption and serum triglycerides in a cohort of Quebec adults / T. Meng, S. Kubow, D. E. Nielsen // *International journal of obesity (2005)*. – 2021. – № 45(6). – P. 1193–1202. – DOI:10.1038/s41366-021-00766-w.

195. Metabolic and Vascular Effect of the Mediterranean Diet / A. Tuttolomondo, I. Simonetta, M. Daidone [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – №20(19). – P. 4716. – DOI:10.3390/ijms20194716.

196. Microbiome and metabonomics study of quercetin for the treatment of atherosclerosis / D. N. Wu, L. Guan, Y. X. Jiang [et al.] // *Cardiovascular diagnosis and therapy*. – 2019. – № 9(6). – P. 545–560. – DOI:10.21037/cdt.2019.12.04.

197. Miller, S. A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells / S. A. Miller, D. D. Dykes, H. F. Polesky // *Nucleic acids research*. – 1988. – № 16(3). – P. 1215. – DOI:10.1093/nar/16.3.1215.

198. Mishra S. Salt sensitivity and its implication in clinical practice / S. Mishra, S. Ingole, R. Jain // *Indian Heart J*. – 2018. – № 70 (4). – P. 556–564. – DOI:10.1016/j.ihj.2017.10.006.

199. *MnSOD* and *GPx1* polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity / Y. Souiden, H. Mallouli, S. Meskhi [et al.] // *Biological research*. – 2016. – № 49. – P. 22. – DOI:10.1186/s40659-016-0083-6.

200. Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis* / H. Xu, N. I. Park, X. Li [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2010. – № 101(24). – P. 9715–9722. – DOI:10.1016/j.biortech.2010.07.083.

201. Murashige, T. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – № 15. – P. 473–497. – DOI:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

202. Nakata, Y. Vulnerable atherosclerotic plaque morphology in apolipoprotein E-deficient mice unable to make ascorbic Acid / Y. Nakata, N. Maeda // *Circulation.* – 2002. – № 105(12). – P. 1485–1490. – DOI:10.1161/01.cir.0000012142.69612.25.

203. New insight into human sweet taste: a genome-wide association study of the perception and intake of sweet substances / L.D. Hwang, C. Lin, P. Gharahkhani [et al.] // *Am J Clin Nutr.* – 2019. – № 109 (6). – P. 1724–1737. – DOI:10.1093/ajcn/nqz043.

204. Niacin Suppresses Progression of Atherosclerosis by Inhibiting Vascular Inflammation and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells / G. Su, G. Sun, H. Liu [et al.] // *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research.* – 2015. – № 21. – P. 4081–4089. – DOI:10.12659/msm.895547.

205. Nigon, V. M. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms / V. M. Nigon, M. A. Félix // *WormBook:the online review of C. elegans biology.* – 2017. – P. 1–84. – DOI:10.1895/wormbook.1.181.1.

206. Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials / P. Putnik, J. M. Lorenzo, F. J. Barba [et al.] // *Foods (Basel, Switzerland).* – 2018. – № 7(7). – P. 106. – DOI:10.3390/foods7070106.

207. Nutraceutical formulations combining *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin, and or resveratrol with beneficial impacts on the abundance of intestinal bacterial populations, metabolite production, and antioxidant capacity during colonic fermentation / K. B. Sampaio, K. B. Sampaio, J. L. de Brito Alves [et al.] // *Food research international.* – 2022. – № 161. – P. 111800. – DOI:10.1016/j.foodres.2022.111800.

208. Nutrigenetics-personalized nutrition in obesity and cardiovascular diseases / L. Barrea, G. Annunziata, L. Bordonì [et al.] // *International journal of obesity supplements.* – 2020. – № 10(1). – P. 1–13. – DOI:10.1038/s41367-020-0014-4.

209. Nutrigenomics, the Microbiome, and Gene-Environment Interactions: New Directions in Cardiovascular Disease Research, Prevention, and Treatment: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* / J. F. Ferguson, H. Allayee, R. E. Gerszten [et al.] // *Cardiovascular genetics.* – 2016. – № 9(3). – P. 291–313. – DOI:10.1161/HCG.0000000000000030.

210. Nutrition and Atherosclerosis / N. Torres, M. Guevara-Cruz, L. A. Velázquez-Villegas [et al.] // *Archives of Medical Research.* – 2015. – № 46(5). – P. 408–426. – DOI:10.1016/j.arcmed.2015.05.010.

211. Nutrition and Cardiovascular Health / R. Casas, S. Castro-Barquero, R. Estruch [et al.] // *International journal of molecular sciences.* – 2018. – № 19(12). – P. 3988. – DOI:10.3390/ijms19123988.

212. Obesity and addiction: neurobiological overlaps / N. D. Volkow, G. J. Wang, D. Tomasi [et al.] // *Obes Rev.* – 2013. – № 14(1). – P. 2–18. – DOI:10.1111/j.1467-789X.2012.01031.x.

213. Olas, B. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics-A Promising Strategy in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases? / B. Olas // *International journal of molecular sciences.* – 2020. – № 21(24). – P. 9737. – DOI:10.3390/ijms21249737.

214. Optimization of parameters for obtaining callus, suspension, and root cultures of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) to isolate the largest number of biologically active substances with geroprotective properties / L. S. Dyshlyuk, A. D. Vesnina, A. I. Dmitrieva [et al.] // *Brazilian journal of biology.* – 2022. – № 84. – P. e257074. – DOI:10.1590/1519-6984.257074.

215. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Chlorogenic Acid from Tobacco Waste / G. Zeng, Y. Ran, X. Huang [et al.] // *International journal of environmental research and public health.* – 2022. – № 19(3). – P. 1555. – DOI:10.3390/ijerph19031555.

216. Oral Fat Sensing and CD36 Gene Polymorphism in Algerian Lean and Obese Teenagers / H. Daoudi, J. Plesnik, A. Sayed [et al.] // *Nutrients.* – 2015. – № 7(11). – P. 9096–9104. – DOI:10.3390/nu7115455.

217. Overexpression of phenylalanine ammonia-lyase improves flavones production in transgenic hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* / N. I. Park, H. Xu, X. Li [et al.] // *Process Biochemistry.* – 2012. – № 47(12). – P. 2575–2580. – DOI:10.1016/j.procbio.2012.09.026.

218. Pan, D. D. Characterisation of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects / D. D. Pan, X. Q. Zeng, Y. T. Yan // *Journal of the science of food and agriculture.* – 2011. – № 91(3). – P. 512–518. – DOI:10.1002/jsfa.4214.

219. Park, H. H. Survival assays using *Caenorhabditis elegans* / H. H. Park, Y. Jung, S. V. Lee // *Molecules and cells.* – 2017. – № 40(2). – P. 90–99. – DOI:10.14348/molcells.2017.0017.

220. Parkar, S. G. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health / S. G. Parkar, D. E. Stevenson, M. A. Skinner // *International journal of food microbiology.* – 2008. – 124(3). – P. 295–298. – DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.017.

221. Patent BG1873U1, IPC A61K35/74, A61K36/73, C12R1/225. Synbiotic food additive / G. Georgiev, E. Karaivanova, N. Rumyan; applicant OOD LAKTINA. – № 255913; stated 05.07.2013; published 30.04.2014.

222. Patent CN104789488, IPC A23C11/10, A61K35/747, A61P3/06, C12N1/20, C12R1/225. *Lactobacillus rhamnosus* having cholesterol lowering effect, and uses thereof / J. Zou, H. Liu, C. Sun [et al.]; applicant UNIV HEILONGJIANG. – № 201510088464.7; stated 26.02.2015; published 04.05.2018.

223. Patent CN107441080, IPC A61K31/353, A61P1/16, A61P3/06, A61P9/08, A61P9/10. Application of rhodiola rosea oligomer procyanidine in preparing medicine for treating atherosclerosis disease / Q. Zhou, W. Zhao, X. Han, B. Bai, C. Yan, X. Dong; applicant AGRICULTURAL UNIVERSITY OF HEBEI. – № 201710684812.6; stated 11.08.2017; published 11.08.2017.

224. Patent CN109182225, IPC A23L33/135, A61K35/744, A61P3/06, A61P9/10, C12N1/20, C12R1/01. *Pediococcus lactis* strain and application thereof in anti-atherosclerosis / S. Li, C. Wang, Z. Zhao, Y. Zhao, C. Duan, L. Gao; applicant JILIN ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES. – № 201811273945.5; stated 30.10.2018; published 11.01.2019.

225. Patent CN110496192, IPC A61K36/899, A61K36/48, A61P9/10, A61K31/353, A61K31/12. Natural medicine preparation for preventing and treating atherosclerosis by regulating intestinal flora balance / K. Yuan, Y. Luo, J. Fang; applicant JIYANG COLLEGE OF ZHEJIANG A&F UNIVERSITY. – № 201910150700.1; stated 28.02.2019; published 26.11.2019.

226. Patent CN111671078, IPC A23L11/00, A23L19/00, A23L33/00, A23L33/10, A23L33/105, A23L33/15, A23L33/16. Vascular maintenance composition containing Kefir fermented milk powder and preparation method of vascular maintenance composition/ Z.Hu, H.Wu, X.Wang, H. Liu, A. Wang; applicant SHANDONG HAWEI PHARMACEUTICAL CO., LTD. – № 202010307023.2; stated 17.04.2020; published 18.09.2020.

227. Patent CN111671797, IPC A61K35/62, A61K36/8988, A61P7/10. Pharmaceutical composition for preventing and treating atherosclerosis as well as preparation method and application method thereof / Z. Luo, W. Wang, L. Zhang, Y. Bao, J. Wang; applicant GUANGZHOU BAIYUNSHAN PHARMACEUTICAL HOLDINGS CO., LTD. BAIYUNSHAN PHARMACEUTICAL GENERAL FACTORY. – № 202010552685.6; stated 17.06.2020; published 18.09.2020.

228. Patent CN111714589, IPC A61K35/62, A61K36/8988, A61P7/10. Traditional Chinese medicine composition and traditional Chinese medicine preparation for resisting atherosclerosis / S. CAO; applicant HENAN UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE. – № 202010814755.0; stated 13.08.2020; published 29.09.2020.

229. Patent CN111759830, IPC A61K31/12, A61P9/10. Medicine for treating atherosclerosis and protecting blood vessels, preparation method and application / D. Shi, J. Liu, H. Chai., Y. Cui, X. Liang, J. Feng, Y. Liu; applicant XIYUAN HOSPITAL OF CHINA ACAD OF CHINESE MEDICAL SCIENCES. – № 202010798705.8; stated 11.08.2020; published 13.10.2020.

230. Pazhoohan, M. Antimicrobial and antiadhesive effects of *Lactobacillus* isolates of healthy human gut origin on Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) / M. Pazhoohan, F. Sadeghi, M. Moghadami // Microbial Pathogenesis. – 2020. – V. 148. – P. 104271.

231. *Pediococcus acidilactici* AS185 attenuates early atherosclerosis development through inhibition of lipid regulation and inflammation in rats / W. Chao, W. Han, Z. Zijian [et al.] // Journal of Functional Foods. – 2019. – № 60. – P.103424. – DOI:10.1016/j.jff.2019.103424.

232. Perilla Oil Reduces Fatty Streak Formation at Aortic Sinus via Attenuation of Plasma Lipids and Regulation of Nitric Oxide Synthase in ApoE KO Mice / S. H. Hong, M. Kim, J. S. Noh [et al.] // Lipids. – 2016. – № 51(10). –P. 1161–1170. – DOI:10.1007/s11745-016-4188-z.

233. Personalised nutrition and health / J. M. Ordovas, L. R. Ferguson, E. S. Tai [et al.] // BMJ (Clinical research ed.). – 2018. – № 361. – P. bmj.k2173. – DOI:10.1136/bmj.k2173.

234. Pharmacogenomics And Hypertension: Current Insights / G. H Oliveira-Paula, S. C. Pereira, J. E. Tanus-Santos [et al.] // Pharmgenomics Pers Med. – 2019. – № 12. – P. 341–359. – DOI:10.2147/PGPM.S230201.

235. Phycoerythrin extends life span and health span of *Caenorhabditis elegans* / R. R. Sonani, N.K. Singh, A. Awasthi [et al.] // Age (Dordr). – 2014. – № 36(5). – P. 9717. – DOI:10.1007/s11357-014-9717-1.

236. Physical Activity and the Association of Common *FTO* Gene Variants With Body Mass Index and Obesity / E. Rampersaud, B. D. Mitchell, T. I. Pollin [et al.] // Arch Intern Med. – 2013. – № 168 (16). – P. 1791–1797.

237. Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum* / Y. Dong, D. Tang, N. Zhang [et al.] // Chemistry Central journal. – 2013. – № 7(1). – P. 124. – DOI:10.1186/1752-153X-7-124.

238. Plant Adaptogens-History and Future Perspectives / V. Todorova, K. Ivanov, C. Delattre [et al.] // Nutrients. – 2021. – № 13(8). – P. 2861. – DOI:10.3390/nu13082861.

239. Plant hairy roots enable high throughput identification of antimicrobials against *Candidatus liberibacter* spp. / S. Irigoyen, M. Ramasamy, S. Pant [et al.] // Nature communications. – 2020. – № 11(1). – P. 5802. – DOI:10.1038/s41467-020-19631-x.

240. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (*MnSOD*), glutathione peroxidase-1 (*GPXI*), and catalase (*CAT*) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease / H. Chen, M. Yu, M. Li [et al.] // Molecular and cellular biochemistry. – 2012. – № 363(1–2). – P. 85–91. – DOI:10.1007/s11010-011-1160-3.

241. Polymorphism of the *FABP2* gene: a population frequency analysis and an association study with cardiovascular risk markers in Argentina / L. C. Gomez, S. M. Real, M. S. Ojeda [et al.] // BMC medical genetics. – 2007. – № 8. – P. 39. – DOI:10.1186/1471-2350-8-39.

242. Polymorphisms of the *PPAR-γ* (rs1801282) and Its Coactivator (rs8192673) Have a Minor Effect on Markers of Carotid Atherosclerosis in Patients

with Type 2 Diabetes Mellitus / A. Pleskovič, M. Šantl Letonja, A. Cokan Vujkovic, [et al.] // *PPAR research*. – 2016. – P. 4934251. – DOI:10.1155/2016/4934251.

243. *PPAR γ* Gene and Atherosclerosis: Genetic Polymorphisms, Epigenetics and Therapeutic Implications / E. Grbić, A. Peterlin, T. Kunej [et al.] // *Balkan journal of medical genetics:BJMG*. – 2018. – № 21(1). – P. 39–46. – DOI:10.2478/bjmg-2018-0011.

244. Prasad, K. Resveratrol, wine, and atherosclerosis / K. Prasad // *The International journal of angiology : official publication of the International College of Angiology, Inc.* – 2012. – № 21(1). – P. 7–18. – DOI:10.1055/s-0032-1306417.

245. Prebiotic Therapy with Inulin Associated with Low Protein Diet in Chronic Kidney Disease Patients: Evaluation of Nutritional, Cardiovascular and Psychocognitive Parameters / S. Lai, S. Mazzaferro, M. Muscaritoli [et al.] // *Toxins*. – 2020. – № 12(6). – P. 381. – DOI:10.3390/toxins12060381.

246. Prevention of atherosclerosis progression by 9-cis- β -carotene rich alga *Dunaliella* in apoE-deficient mice / A. Harari, R. Abecassis, N. Relevi [et al.] // *BioMed research international*. – 2013. – P. 169517. – DOI:10.1155/2013/169517.

247. Proposed guidelines to evaluate scientific validity and evidence for genotype-based dietary advice / K. A. Grimaldi, B. van Ommen, J. M. Ordovas [et al.] // *Genes & nutrition*. – 2017. – № 12. – P. 35. – DOI:10.1186/s12263-017-0584-0.

248. Quantification of Caffeine and Chlorogenic Acid in Green and Roasted Coffee Samples Using HPLC-DAD and Evaluation of the Effect of Degree of Roasting on Their Levels / S. Awwad, R. Issa, L. Alnsour [et al.] // *Molecules*. – 2021. – № 26(24). – P. 7502. – DOI:10.3390/molecules26247502.

249. Quercetin protects against atherosclerosis by regulating the expression of *PCSK9*, *CD36*, *PPAR γ* , *LXR α* and *ABCA1* / Q. Jia, H. Cao, D. Shen [et al.] // *International journal of molecular medicine*. – 2019. – № 44(3). – P. 893–902. – DOI:10.3892/ijmm.2019.4263.

250. Quercetin Suppresses the Progression of Atherosclerosis by Regulating MST1-Mediated Autophagy in ox-LDL-Induced RAW264.7 Macrophage Foam Cells. / H. Cao, Q. Jia, L. Yan [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – № 20(23). – P. 6093. – DOI:10.3390/ijms20236093.

251. Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine / D. Yang, T. Wang, M. Long [et al.] // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2020. – P. 8825387. – DOI:10.1155/2020/8825387.

252. Recovery of Chlorogenic Acids from Agri-Food Wastes: Updates on Green Extraction Techniques / I. Frosi, I. Montagna, R. Colombo // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2021. – № 26(15). – P. 4515. – DOI:10.3390/molecules26154515.

253. Reduction of intestinal trimethylamine by probiotics ameliorated lipid metabolic disorders associated with atherosclerosis / X. Liang, Z. Zhang, Y. Lv [et al.] // *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*. – 2020. – № 79–80. – P. 110941. – DOI:10.1016/j.nut.2020.110941.

254. Regulatory Mechanisms of Baicalin in Cardiovascular Diseases: A Review / L. Xin, J. Gao, H. Lin [et al.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2020. – № 11. – P. 583200. – DOI:10.3389/fphar.2020.583200.

255. Relationships among endogenous ouabain, alpha-adducin polymorphisms and renal sodium handling in primary hypertension / P. Manunta, M. Maillard, C. Tantardini [et al.] // *J Hypertens*. – 2008. – № 26 (5). – P. 914–920. – DOI:10.1097/HJH.0b013e3282f5315f.

256. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation / Y. Zhu, X. Xian, Z. Wang [et al.] // *Biomolecules*. – 2018. – № 8(3). – P. 80. – DOI:10.3390/biom8030080.

257. Resveratrol ameliorates atherosclerosis induced by high-fat diet and LPS in ApoE^{-/-} mice and inhibits the activation of CD4⁺ T cells / L. Zhou, J. Long, Y. Sun [et al.] // *Nutrition & metabolism*. – 2020. – № 17. – P. 41. – DOI:10.1186/s12986-020-00461-z.

258. Resveratrol Attenuates Trimethyl-amine-N-Oxide (TMAO)-Induced Atherosclerosis by Regulating TMAO Synthesis and Bile Acid Metabolism via Remodeling of the Gut Microbiota / M. L. Chen, L. Yi, Y. Zhang [et al.] // *mBio*. – 2016. – № 7(2). – P. e02210–e2215. – DOI:10.1128/mBio.02210-15.

259. *Rhaponticum carthamoides* improved energy metabolism and oxidative stress through the SIRT6/Nrf2 pathway to ameliorate myocardial injury / Z. Zheng, Y. Xian, Z. Jin [et al.] // *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. – 2022. – № 105. – P. 154197. – DOI:10.1016/j.phymed.2022.154197.

260. *Rhaponticum carthamoides* Transformed Root Extract Has Potent Anti-cancer Activity in Human Leukemia and Lung Adenocarcinoma Cell Lines / E. Skała, E. Synowiec, T. Kowalczyk [et al.] // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2018. – P. 8198652. – DOI:10.1155/2018/8198652.

261. *Rhaponticum carthamoides* transformed root extract inhibits human glioma cells viability, induces double strand DNA damage, H2A.X phosphorylation, and PARP1 cleavage. / E. Skała, M. Toma, T. Kowalczyk [et al.] // *Cytotechnology*. – 2018. – № 70(6). – P. 1585–1594. – DOI:10.1007/s10616-018-0251-3.

262. Riscuta G. Nutrigenomics at the Interface of Aging, Lifespan, and Cancer Prevention / G. Riscuta // *The Journal of nutrition*. – 2016. – № 146 (10). – P. 1931–1939. – DOI:10.3945/jn.116.235119.

263. Role of Personalized Nutrition in Chronic-Degenerative Diseases / L. Di Renzo, P. Gualtieri, L. Romano [et al.] // *Nutrients*. – 2019. – № 11(8). – P. 1707. – DOI:10.3390/nu11081707.

264. Roy, H. Molecular genetics of atherosclerosis / H. Roy, S. Bhardwaj, S. Ylä-Herttuala // *Hum. Genet*. – 2009. – № 125. – P. 467–491. – DOI:10.1007/s00439-009-0654-5.

265. Salivary markers of taste sensitivity to oleic acid: A combined proteomics and metabolomics approach / R. Mounayar, M. Morzel, H. Brignot [et al.] // *Metabolomics*. – 2014. – № 10. – P. 688–696. – DOI:10.1007/s11306-013-0602-1.

266. Sanada, H. Genetics of salt-sensitive hypertension / H. Sanada, J. E. Jones, P.A. Jose // *Curr Hypertens Rep*. – 2011. – № 13 (1). – P.55–66. – DOI:10.1007/s11906-010-0167-6.

267. Science and Healthy Meals in the World: Nutritional Epigenomics and Nutrigenetics of the Mediterranean Diet / F. Caradonna, O. Consiglio, C. Luparello [et al.] // *Nutrients*. – 2020. – № 12(6). – P. 1748. – DOI:10.3390/nu12061748.

268. Seamans, K. M. Nutrition and Health | Nutrigenomics and Nutrigenetics. Editor(s): John W. Fuquay. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* / K. M. Seamans, K. D. Cashman // Academic Press. – 2011. – P. 1056–1061. – DOI:10.1016/B978-0-12-374407-4.00381-2.

269. Sevov, M. Resveratrol regulates the expression of LXR-alpha in human macrophages / M. Sevov, L. Elfineh, L. B. Cavelier // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2006. – № 348(3). – P. 1047–1054. – DOI:10.1016/j.bbrc.2006.07.155.

270. Significant role of *ADRB3* rs4994 towards the development of coronary artery disease / S. Kumar, A. Mishra, A. Srivastava, [et al.] // *Coronary artery disease*. – 2014. – № 25(1). – P. 29–34. – DOI:10.1097/MCA.000000000000056.

271. Skilton, M. R. ω -3 Fatty Acids, Impaired Fetal Growth, and Cardiovascular Risk: Nutrition as Precision Medicine / M. R. Skilton // *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*. – 2018. – № 9(2). – P. 99–104. – DOI:10.1093/advances/nmx012.

272. *SLC2A2 (GLUT2)* as a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma / Y. H. Kim, D. C. Jeong, K. Pak [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – № 8 (40). – P. 68381–68392. – DOI:10.18632/oncotarget.20266.

273. Stojakowska, A. Flavonoid Production in Transformed Root Cultures of *Scutellaria baicalensis* / A. Stojakowska, J. Malarz // *Journal of Plant Physiology*. – 2000. – № 156(1). – P. 121–125. – DOI:10.1016/S0176-1617(00)80282-5.

274. Study of Baicalin hydrolysis kinetics in the process of its extraction from *Scutellaria baicalensis* Georgi roots / N. N. Boyko, D. I. Pisarev, E. T. Zhilyakova [et al.] // *Фармация и фармакология*. – 2019. – № 7(3). – P. 129–137. – DOI:10.19163/2307-9266-2019-7-3-129-137.

275. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein e deficient mice / M. Xia, W. H. Ling, J. Ma [et al.] // *The Journal of nutrition*. – 2003. – № 133(3). – P. 744–751. – DOI:10.1093/jn/133.3.744.

276. Synergistic effects of liposomes encapsulating atorvastatin calcium and curcumin and targeting dysfunctional endothelial cells in reducing atherosclerosis / X.

Li, H. Xiao, C. Lin [et al.] // International journal of nanomedicine. – 2019. – № 14. – P. 649–665. – DOI:10.2147/IJN.S189819.

277. *T64A* polymorphism in beta3-adrenergic receptor gene (ADRB3) and coronary heart disease: a case-cohort study and meta-analysis / M. H. Zafarmand, Y. T. van der Schouw, D. E. Grobbee [et al.] // Journal of internal medicine. – 2008. – № 263(1). – P. 79–89. – DOI:10.1111/j.1365-2796.2007.01876.x.

278. Tackling Atherosclerosis via Selected Nutrition / A. Vesnina, A. Prosekov, V. Atuchin [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – № 23(15). – P. 8233. – DOI:10.3390/ijms23158233.

279. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation / P. Marchio, S. Guerra-Ojeda, J. M. Vila [et al.] // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2019. – P. 8563845. – DOI:10.1155/2019/8563845.

280. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria / A. Sutton, H. Khoury, C. Prip-Buus [et al.] // Pharmacogenetics. – 2003. – № 13(3). – P. 145–157. – DOI:10.1097/01.fpc.0000054067.64000.8f.

281. The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review / L. Wang, X. Pan, L. Jiang [et al.] // Frontiers in nutrition. – 2022. – № 9. – P. 943911. – DOI:10.3389/fnut.2022.943911.

282. The *C. elegans* lifespan assay toolkit / F. R. Amrit, R. Ratnappan, S. A. Keith [et al.] // Methods (San Diego, Calif.). – 2014. – № 68(3). – P. 465–475. – DOI:10.1016/j.ymeth.2014.04.002.

283. The challenges for molecular nutrition research 1: linking genotype to healthy nutrition / M. Williams, J. M. Ordovas, D. Lairon [et al.] // Genes Nutr. – 2007. – № 3. – P. 41–49.

284. The effect of grape seed extracts on serum paraoxonase activities in streptozotocin-induced diabetic rats / A. Kiyici, N. Okudan, H. Gökbel [et al.] // Journal of medicinal food. – 2010. – № 13(3). – P. 725–728. – DOI:10.1089/jmf.2009.0232.

285. The effect of probiotic-fermented soy milk on enhancing the NO-mediated vascular relaxation factors / C. P. Cheng, S. W. Tsai, C. P. Chiu [et al.] // Journal of the science of food and agriculture. – 2013. – № 93(5). – P. 1219–1225. – DOI:10.1002/jsfa.5880.

286. The Effects and Mechanisms of Flavonoids on Cancer Prevention and Therapy: Focus on Gut Microbiota / M. Wang, F. Yu, Y. Zhang [et al.] // International journal of biological sciences. – 2022. – № 18(4). – P. 1451–1475. – DOI:10.7150/ijbs.68170.

287. The effects of probiotic supplementation on metabolic status in type 2 diabetic patients with coronary heart disease / F. Raygan, Z. Rezavandi, F. Bahmani [et al.] // Diabetology & metabolic syndrome. – 2018. – № 10. – P. 51. – DOI:10.1186/s13098-018-0353-2.

288. The efficacy and safety of probiotics intervention in attenuating cardiac remodeling following myocardial infraction: Literature review and study protocol for a randomized, double-blinded, placebo controlled trial / J. Moludi, M. Alizadeh, M. Davari [et al.] // Contemporary clinical trials communications. – 2019. – № 15. – P. 100364. – DOI:10.1016/j.conctc.2019.100364.

289. The Essential Oils of *Rhaponticum carthamoides* Hairy Roots and Roots of Soil-Grown Plants: Chemical Composition and Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities / E. Skała, P. Rijo, C. Garcia [et al.] // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2016. – P. 8505384. – DOI:10.1155/2016/8505384.

290. The In Vitro Analysis of Prebiotics to Be Used as a Component of a Synbiotic Preparation / K. Śliżewska, A. Chlebicz-Wójcik // Nutrients. – 2020. – № 12(5). – P. 1272. – DOI:10.3390/nu12051272.

291. The meta-analysis of the association of *PPARG* P12A, *CI61T* polymorphism and coronary heart disease / S. Ding, L. Liu, Q. C. Zhuge [et al.] // Wiener klinische Wochenschrift. – 2012. – № 124(19–20). – P. 671–677. – DOI:10.1007/s00508-012-0223-0.

292. The Probiotic *Lactobacillus fermentum* Prevents Dysbiosis and Vascular Oxidative Stress in Rats with Hypertension Induced by Chronic Nitric Oxide Blockade / I. Robles-Vera, M. Toral, N. de la Visitación [et al.] // Molecular nutrition & food research. – 2018. – № 62(19). – P. e1800298. – DOI:10.1002/mnfr.201800298.

293. The role of nutrition related genes and nutrigenetics in understanding the pathogenesis of cancer / A. Z. Elsamanoudy, M. A. Mohamed Neamat-Allah, H. Mohammad [et al.] // Journal of microscopy and ultrastructure. – 2016. – № 4(3). – P. 115–122. – DOI:10.1016/j.jmau.2016.02.002.

294. The Search for Dietary Supplements to Elevate or Activate Circulating Paraoxonases / J. M. Lou-Bonafonte, C. Gabás-Rivera, M. A. Navarro [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – № 18(2). – P. 416. – DOI:10.3390/ijms18020416.

295. The Therapeutic Effects and Mechanisms of Quercetin on Metabolic Diseases: Pharmacological Data and Clinical Evidence / H. Yi, H. Peng, X. Wu [et al.] // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2021. – P. 6678662. – DOI:10.1155/2021/6678662.

296. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials / A. Y. Berman, R. A. Motechin, M. Y. Wiesenfeld [et al.] // NPJ precision oncology. – 2017. – № 1. – P. 35. – DOI:10.1038/s41698-017-0038-6.

297. Todorova, V. Comparison between the Biological Active Compounds in Plants with Adaptogenic Properties (*Rhaponticum carthamoides*, *Lepidium meyenii*, *Eleutherococcus senticosus* and *Panax ginseng*) / V. Todorova, K. Ivanov, S. Ivanova // Plants (Basel, Switzerland). – 2021. – № 11(1). – P. 64. – DOI:10.3390/plants11010064.

298. Trautwein, E. A. Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in hamsters / E. A. Trautwein, D.

Rieckhoff, H. F. Erbersdobler // The Journal of nutrition. – 1998. – № 128(11). – P. 1937–1943, – DOI:10.1093/jn/128.11.1937.

299. Ulrikh, E. Determination of the Qualitative Composition of Biologically Active Substances of Extracts of In Vitro Callus, Cell Suspension, and Root Cultures of the Medicinal Plant *Rhaponticum carthamoides* / E. Ulrikh, O. Babich, S. Sukhikh // Appl. Sci. – 2021. – № 11. – P. 2555. – DOI:10.3390/app11062555.

300. Ultrasound-Assisted Extraction of Taxifolin, Diosmin, and Quercetin from *Abies nephrolepis* (Trautv.) Maxim: Kinetic and Thermodynamic Characteristics / M. Wei, R. Zhao, X. Peng [et al.] // Molecules (Basel, Switzerland). – 2020. – № 25(6). – P. 1401. – DOI:10.3390/molecules25061401.

301. Variants in the *CD36* gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol / L. Love-Gregory, R. Sherva, L. Sun [et al.] // Human molecular genetics. – 2008. – № 17(11). – P. 1695–1704. – DOI:10.1093/hmg/ddn060.

302. Vitamin A-deficient diet accelerated atherogenesis in apolipoprotein E(-/-) mice and dietary β -carotene prevents this consequence / N. Z. Relevy, D. Harats, A. Harari [et al.] // BioMed research international. – 2015. – P. 758723. – DOI:10.1155/2015/758723.

303. Wang, E. Chlorophyll enhances oxidative stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* and extends its lifespan / E. Wang, M. Wink // PeerJ. – 2016. – № 7(4). – P. e1879. – DOI:10.7717/peerj.1879.

304. Wong, K. S. In vitro antifungal activity of the aqueous extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi root against *Candida albicans* / K. S. Wong, W. K. Tsang // Int J Antimicrob Agents. – 2009. – № 34. – P. 284–285. – DOI:10.1016/j.ijantimicag.2009.03.007.

305. Yang, Y. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb / Y. Yang, F. Zhang // Ultrasonics sonochemistry. – 2008. – № 15(4). – P. 308–313. – DOI:10.1016/j.ultsonch.2007.05.001.

306. Zhao, Q. *Scutellaria baicalensis*, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants / Q. Zhao, X. Y. Chen, C. Martin // Science bulletin. – 2016. – № 61(18). – P. 1391–1398. – DOI:10.1007/s11434-016-1136-5.

307. Zhu, Y. Gut microbiota in atherosclerosis: focus on trimethylamine N-oxide / Y. Zhu, Q. Li, H. Jiang // APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. – 2020. – № 128(5). – P. 353–366. – DOI:10.1111/apm.13038.

308. A decade of genome-wide association studies for coronary artery disease: the challenges ahead / J. Erdmann, T. Kessler, L. Munoz Venegas [et al.] // Cardiovascular research. – 2018. – № 114(9). – P. 1241–1257. – DOI:10.1093/cvr/cvy084.

309. Genetics of coronary artery disease in the post-GWAS era / Z. Chen, H. Schunkert // Journal of internal medicine. – 2021. – № 290(5). – P. 980–992. – DOI:10.1111/joim.13362.

310. Lu, L. Overview of Oroxylin A: A Promising Flavonoid Compound / L. Lu, Q. Guo, L. Zhao // *Phytotherapy research : PTR.* – 2016. – № 30(11). – P. 1765–1774. – DOI:10.1002/ptr.5694.

311. Oroxylin A: A Promising Flavonoid for Prevention and Treatment of Chronic Diseases / A. Sajeev, M. Hegde, S. Girisa, [et al.]. // *Biomolecules.* – 2020. – № 12(9). – P. 1185. – DOI:10.3390/biom12091185.

312. Ultrasound-assisted extraction and properties of polysaccharide from Ginkgo biloba leaves / J. Li, Z. Chen, H. Shi [et al.] // *Ultrasonics sonochemistry.* – 2023. – № 93. – P. 106295. – DOI:10.1016/j.ultsonch.2023.106295.

313. Ultrasound-Assisted Extraction and Identification of Natural Antioxidants from the Fruit of Melastoma sanguineum Sims / T. Zhou, D. P. Xu, S. J. Lin [et al.] // *Molecules* (Basel, Switzerland). – 2017. – № 22(2). – P. 306. – DOI:10.3390/molecules22020306.

ПРИЛОЖЕНИЯ



АНКЕТА

1. Пол

- мужской женский

Номер анкеты _____

2. Антропометрические параметры

рост _____ вес _____

3. Национальность

4. Курите ли Вы?

- да
 нет
 бросил

 5. Каков Ваш стаж курения (сколько лет курите) или как давно бросили?

6. Какое количество сигарет в день Вы выкуриваете? _____

7. Наличие хронических заболеваний:

- | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| Гиперлипидемия | <input type="checkbox"/> да | <input type="checkbox"/> нет |
| Артериальная гипертензия | <input type="checkbox"/> да | <input type="checkbox"/> нет |
| Заболевания щитовидной железы | <input type="checkbox"/> да | <input type="checkbox"/> нет |
| Заболевания мочевыводящих путей | <input type="checkbox"/> да | <input type="checkbox"/> нет |
| Сахарный диабет | <input type="checkbox"/> да (тип) | <input type="checkbox"/> нет |
| Хронические заболевания легких | <input type="checkbox"/> да | <input type="checkbox"/> нет |
| Ишемическая болезнь сердца | <input type="checkbox"/> да | <input type="checkbox"/> нет |
| Инфаркт миокарда | <input type="checkbox"/> да | <input type="checkbox"/> нет |
| Заболевания ЖКТ | <input type="checkbox"/> да | <input type="checkbox"/> нет |
| Наличие <i>Helicobacter pylori</i> | <input type="checkbox"/> да | <input type="checkbox"/> нет |

8. Уровень С-реактивного белка: _____

8. Уровень общего холестерина _____

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Кемеровский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.89.19.210

ОКС 01.040.67



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по НИР, д.э.н.

Е.А. Жидкова

» 06 октября 2023 г.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ПИЩЕВАЯ ДОБАВКА С АНТИАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМ
ПОТЕНЦИАЛОМ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭКСТРАКТОВ HAIRY ROOTS РАСТЕНИЙ

Технические условия
ТУ 10.89.19-284-02068309-2023

Дата введения в действие – «25» 10 2023 г.

РАЗРАБОТАНО:

Младший научный сотрудник лаборатории
биотестирования природных нутрицевтиков
ФГБОУ ВО «КемГУ»

Веснина А. Д. Веснина
личная подпись

Профессор кафедры бионанотехнологии,
доктор технических наук ФГБОУ ВО «КемГУ»

Просеков А. Ю. Просеков
личная подпись

Кемерово 2023

Продолжение приложения Б

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Кемеровский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.89.19.210

ОКС 01.040.67



УТВЕРЖДАЮ

Директор по НИР, д.э.н.

Е.А. Жидкова

« 25 » октября 2023 г.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ПИЩЕВАЯ ДОБАВКА С АНТИАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМ
ПОТЕНЦИАЛОМ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭКСТРАКТОВ HAIRY ROOTS РАСТЕНИЙ

Технологическая инструкция
ТИ 10.89.19-284-02068309-2023

Дата введения в действие – «25» 10 2023 г.

РАЗРАБОТАНО:

Младшим научным сотрудником лаборатории
биотестирования природных нутрицевтиков
ФГБОУ ВО «КемГУ»

Веснина А. Д. Веснина
личная подпись

Профессор кафедры бионанотехнологии,
доктор технических наук ФГБОУ ВО «КемГУ»

А. Ю. Просеков А. Ю. Просеков
личная подпись

Кемерово 2023

ПРИЛОЖЕНИЕ В

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
 ОАО «Кемеровская
 фармацевтическая фабрика»
 В. И. Голубков
 «25» ноября 2022 г.



АКТ

наработки опытных образцов функциональных пищевых добавок с антиатеросклеротическим потенциалом на основе комплекса биологически активных веществ, выделенных из экстрактов hairy roots растений от «25» ноября 2022 г.

Комиссия в составе:

Председатель	Главный инженер	Юдин И.В.
члены комиссии	Старший научный сотрудник	Драгунская Е.В.
	Научный сотрудник	Чубачинова О.А.

назначенная приказом по ОАО «Кемеровская фармацевтическая фабрика» от «20» ноября 2022 г. № 6, в период с «14» ноября 2022 г. по «23» ноября 2023 г. проверила факт наработки опытных образцов объектов испытаний.

1. Комиссии предъявлены:

1.1. Объекты испытания: функциональные пищевые ингредиенты – биологически активные вещества (байкалин, хлорогеновая кислота, кверцетин), выделенные из экстрактов hairy roots шлемника байкальского, левзеи сафлоровидной, копеечника забытого, соответственно, в количестве 5 г; пробиотические консорциумы (№ 1 (*L. acidophilus* В-3190 + *L. plantarum* В-11007 + *B. animalis* АС-1560), № 6 (*L. plantarum* В-11007 + *L. fermentum* В-7574 + *B. bifidum* АС-1579), № 8 (*L. acidophilus* В-3190 + *L. plantarum* В-11007 + *B. bifidum* АС-1579 + *B. animalis* АС-1560) в количестве 350 г пребиотики – инулин в количестве 950 г и фруктоолигосахариды в количестве 500 г.

1.2. Техническая документация: технические условия (ТУ 10.89.19 – 284 – 02068309 – 2023) и технологические инструкции (ТИ 10.89.19 – 284 – 02068309 – 2023) по производству функциональных пищевых добавок с антиатеросклеротическим потенциалом на основе комплекса биологически

Продолжение приложения В

активных веществ, выделенных из экстрактов hairy roots растений.

1.3. Программа и методики исследовательских испытаний опытных образцов.

2. В результате проверки установлено:

Наработаны опытные образцы двадцати семи функциональных пищевых добавок в виде порошков в соответствии с предоставленными Техническими условиями и Технологическими инструкциями.

3. Вывод

Выработанные функциональные пищевые добавки на основе комплекса биологически активных веществ, выделенных из экстрактов hairy roots растений, проявляют заявленные биоактивные свойства, соответствуют требованиям качества и безопасности, что позволяет рекомендовать их к внедрению в производство.

Председатель

Члены комиссии



Юдин И.В.

Дрогунская Е.В.

Чубачинова О.А.

Продолжение приложения В



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ООО НПО
«Здоровое питание»

А. А. Попов

«28» января 2023 г.

АКТ

выработки опытно-промышленной партии функциональных пищевых добавок с антиатеросклеротическим потенциалом на основе комплекса биологически активных веществ, выделенных из экстрактов hairy roots растений

Мы, нижеподписавшиеся, председатель: заместитель директора Кравченко С.Н., главный технолог Петушкова Е.Е. составили настоящий акт о том, что январе 2023 г. в производственных условиях ООО НПО «Здоровое питание» выработана опытно-промышленная партия функциональных пищевых добавок на основе комплекса биологически активных веществ, выделенных из экстрактов hairy roots растений для использования в пищевой промышленности в соответствии с ТУ 10.89.19 – 284 – 02068309 – 2023. Выработка осуществлялась по технологии, разработанной в лаборатории биотестирования природных нутрицевтиков ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» младшим научным сотрудником Весниной А. Д.

Для производства опытно-промышленной партии двадцати семи видов функциональных пищевых добавок производилось смешивание сухих функциональных пищевых ингредиентов: биологически активных веществ (байкалина, кверцетина и хлорогеновой кислоты), выделенных из экстрактов hairy roots шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi.), копеечника забытого (*Hedysarum neglectum* Ledeb) и левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides* Pjin.), соответственно; сухих пребиотических консорциумов (№ 1 (*L. acidophilus* B-3190 + *L. plantarum* B-11007 + *B. animalis* AC-1560), № 6 (*L. plantarum* B-11007 + *L. fermentum* B-7574 + *B. bifidum* AC-1579), № 8 (*L. acidophilus* B-3190 + *L. plantarum* B-11007 + *B. bifidum* AC-1579 + *B. animalis* AC-1560); инулина и фруктоолигосахаридов, их капсулирование и фасовка.

Установлено, что опытно-промышленная партия функциональных пищевых добавок на основе комплекса биологически активных веществ, выделенных из экстрактов hairy roots растений по показателям качества, безопасности и биологической активности соответствует требованиям технических условий ТУ 10.89.19 – 284 – 02068309 – 2023 и рекомендуется к внедрению в производство.

Заместитель директора

Кравченко С.Н.

Главный технолог

Петушкова Е.Е.

ДИПЛОМ

победителя конкурса «Студенческий стартап»

Веснина Анна

Дмитриевна

Договор № 371ГССС15-Л/78879



Генеральный директор С. Г. Поляков



2022



Продолжение приложения Г

СтС-210233
0078879

ДОГОВОР (СОГЛАШЕНИЕ) №371ГССС15-L/78879**о предоставлении гранта**

на выполнение работ по разработке новых товаров, изделий, технологий или услуг с использованием результатов научно-технических и технологических исследований, имеющих потенциал коммерциализации и находящихся на самой ранней стадии развития

г. Москва

01 сентября 2022 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям), далее именуемое «Фонд», в лице заместителя генерального директора Антропова Алексея Петровича, действующего на основании доверенности от 14.06.2022 г., с одной стороны, и гражданин Российской Федерации Веснина Анна Дмитриевна, далее именуемый «Грантополучатель», с другой стороны, совместно именуемые в дальнейшем «Стороны», заключили настоящий Договор (Соглашение), именуемый в дальнейшем «Договор», о нижеследующем:

1. Предмет Договора

1.1 Фонд выделяет Грантополучателю денежные средства (далее – Грант) на условиях, указанных в настоящем Договоре, на выполнение работ по разработке новых товаров, изделий, технологий или услуг с использованием результатов научно-технических и технологических исследований, имеющих потенциал коммерциализации и находящихся на самой ранней стадии развития (далее – Работы), по теме «Услуга по формированию комплексного подхода к питанию, опирающегося на персональные данные потребителя, как эффективного средства профилактики атеросклероза» по итогам конкурса в рамках программы «Студенческий стартап» (далее – Конкурс).

1.2 Грантополучатель принимает Грант от Фонда на реализацию Договора и выполняет Работы.

1.3 Основанием для заключения Договора является: Протокол заседания дирекции Фонда содействия инновациям №6 от 06 июля 2022 г.

1.4 Исполнение Договора осуществляется за счет бюджетных ассигнований в виде субсидий, предоставляемых Фонду из средств федерального бюджета на основании Федерального закона Российской Федерации о федеральном бюджете на соответствующий финансовый год.

1.5 Итогом сотрудничества Сторон по Договору должны стать результаты, заявленные Грантополучателем в заявке при подаче документов на участие в Конкурсе, проводимом Фондом.

1.6 Предусмотренные Договором Работы выполняются Грантополучателем в соответствии с техническим заданием (Приложение № 1) и календарным планом (Приложение № 2), являющимися неотъемлемой частью Договора.

2. Сроки исполнения Работ

2.1 Грантополучатель обязуется в течение 12 месяцев со дня подписания Договора выполнить Работы и представить в Фонд документы, подтверждающие выполнение вышеуказанных Работ.

2.2 Содержание и сроки выполнения основных этапов Работ определяются календарным планом (Приложение № 2), являющимся неотъемлемой частью Договора.

2.3 В случае выполнения Грантополучателем Работ ранее срока, предусмотренного календарным планом (Приложение № 2), Грантополучатель вправе представить в Фонд

СтС-210233
0078879

отчет о выполнении Работ, финансовый отчет о расходовании средств Гранта и акт о выполнении Работ, подписанные усиленной квалифицированной электронной подписью со своей стороны, а также другие документы, подтверждающие выполнение Работ, предусмотренных календарным планом (Приложение № 2).

3. Объем и порядок финансирования

3.1 Объем Гранта установлен в размере 1 000 000 (один миллион) рублей 00 копеек.

3.2 Перечисление Гранта осуществляется в соответствии с календарным планом (Приложение № 2) в следующие сроки:

3.2.1 первый платеж – не позднее 30 (тридцати) рабочих дней после подписания настоящего Договора;

3.2.2 следующий платеж – не позднее 30 (тридцати) рабочих дней после подписания Сторонами акта о выполнении Работ по 1 (первому) этапу.

3.3 Первый платеж по настоящему Договору составляет 300 000 (триста тысяч) рублей 00 копеек.

3.4 Денежные средства перечисляются на счет Грантополучателя, открытый в российской кредитной организации.

3.5 Средства Гранта могут быть использованы для финансового обеспечения расходов на выполнение Работ по следующим направлениям:

– затраты Грантополучателя в рамках 1 (первого) этапа Работ, связанные с реализацией стартап-проекта (вознаграждение Грантополучателя за выполнение 1 (первого) этапа Работ, не более 30% от суммы Гранта)¹;

– расходы, связанные с регистрацией юридического лица, в том числе взносы в уставный капитал;

– выплата заработной платы, вознаграждений физическим лицам по договорам гражданско-правового характера и начислений на такие выплаты²;

– приобретение/аренда оборудования, материалов, сырья, комплектующих, программного обеспечения, регистрация прав на созданную интеллектуальную собственность;

– оплата работ, выполняемых сторонними юридическими лицами, индивидуальными предпринимателями и физическими лицами – плательщиками налога на профессиональный доход (не более 25% от суммы Гранта);

– прочие экономически обоснованные затраты, связанные с реализацией стартап-проекта.

3.6 Взносы Грантополучателя в уставный капитал и/или на расчетный счет созданного в рамках стартап-проекта юридического лица в любой удобной форме (и затраты, осуществленные за счет указанных средств с расчетного счета юридического лица) должны составлять от 50% до 100% от размера Гранта.

3.7 В случае отказа Грантополучателя от исполнения принятых на себя по Договору обязательств по выполнению Работ, перечисленные денежные средства должны быть возвращены Фонду в месячный срок с момента сообщения об отказе от исполнения Работ и подписания Сторонами соглашения о расторжении Договора.

¹ Подтверждением данных затрат Грантополучателя в рамках 1 (первого) этапа Работ, связанных с реализацией стартап-проекта, и целевого использования указанных средств является отчет о выполнении Работ по 1 (первому) этапу (промежуточный), представленный Грантополучателем в соответствии с календарным планом (Приложение № 2).

² Выплата заработной платы, вознаграждений по договорам гражданско-правового характера и начислений на такие выплаты членам команды проекта (сотрудникам стартап-проекта) может осуществляться только из средств Гранта, переданных Грантополучателем на счет юридического лица, созданного в рамках 1 (первого) этапа.