

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 027364

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2017.07.31
- (21) Номер заявки
201491050
- (22) Дата подачи заявки
2012.11.28

- (51) Int. Cl. **A23L 1/29** (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23L 1/308 (2006.01)

(54) НАБОР ПРОДУКТОВ ДЛЯ ПОЛНОГО ЗАВТРАКА, ОБЕДА И УЖИНА

- (31) 11191182.2
(32) 2011.11.29
(33) ЕР
(43) 2014.09.30
(86) РСТ/ЕР2012/073846
(87) WO 2013/079536 2013.06.06
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
УНИЛЕВЕР Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Берри Марк Джон, Блай Хизер
Фрэнсис Дженифер, Фаулер Марк
Иан, Хантер Карл Джон, Маколей
Катрина (GB)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2011147862
JEW S. ET AL.: "Evolution of the human diet: linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic diseases prevention", JOURNAL OF MEDICINAL FOOD, MARY ANN LIEBERT, LARCHMONT, NY, US, vol. 12, no. 5, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 925-934, XP002616612, ISSN: 1096-620X, DOI: 10.1089/JMF.2008.0268 [retrieved on 2009-10-26], cited in the application, page 930-932; table 3

FRASSETTO L.A. ET AL.: "Metabolic and physiologic improvements from consuming a paleolithic, hunter-gatherer type diet", EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 63, no. 8, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 947-955,

XP008131253, ISSN: 0954-3007, DOI: 10.1038/EJCN.2009.4 [retrieved on 2009-02-11], cited in the application, page 952-954; table 2

JÖNSSÖN T. ET AL.: "Beneficial effects of a Paleolithic diet on cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: a randomized cross-over pilot study", CARDIOVASCULAR DIABETOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 8, no. 35, 16 July 2009 (2009-07-16), pages 1-14, XP002616615, ISSN: 1475-2840, DOI: 10.1186/1475-2840-8-35, cited in the application, table 5

JÖNSSÖN TOMMY ET AL.: "A paleolithic diet is more satiating per calorie than a mediterranean-like diet in individuals with ischemic heart disease", NUTRITION & METABOLISM, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 7, no. 1, 30 November 2010 (2010-11-30), page 85, XP021089866, ISSN: 1743-7075, DOI: 10.1186/1743-7075-7-85, cited in the application, table 1

LINDEBERG S. ET AL.: "A Palaeolithic diet improves glucose tolerance more than a Mediterranean-like diet in individuals with ischaemic heart disease", DIABETOLOGIA, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 50, no. 9, 1 September 2007 (2007-09-01), pages 1795-1807, XP002616613, ISSN: 0012-186X, DOI: 10.1007/S00125-007-0716-Y [retrieved on 2007-06-22], cited in the application, tables 5, 6

DILLARD C.J. ET AL.: "Review Phytochemicals: nutraceuticals and human health", JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE, WILEY & SONS, CHICHESTER, GB, vol. 80, no. 12, 15 September 2000 (2000-09-15), pages 1744-1756, XP002616614, ISSN: 0022-5142, DOI: [retrieved on 2000-07-28], page 1747-1748

(57) Изобретение относится к набору продуктов для полного завтрака, обеда и ужина, исключая напитки для диетотерапии, и его применению для предупреждения или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа, и также для предупреждения и/или контроля ожирения, и для контроля и снижения веса. Следовательно, обеспечен набор, содержащий (а) 250-650 килокалорий (1045-4180 кДж); (б) 10-50 г пищевых волокон; (с) 10-50 г белка; (д) до 5 г крахмала; (е) до 2 г лактозы; (ф) 20-250 мг любого агликона флавоноидов и (г) 30-250 мг любого глюкозида флавоноидов, где набор содержит в сумме 75-1000 мг агликонов флавоноидов и глюкозидов флавоноидов.

B1

027364

027364
B1

Изобретение относится к набору продуктов для полного завтрака, обеда и ужина, исключая напитки, для диетотерапии и их применению для предупреждения или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа и ожирения; и для контроля и снижения веса.

Эволюция человека - очень медленный процесс в противоположность недавним быстрым изменениям в нашей диете, начиная с революции неолита, которая около 10000 лет назад ознаменовала переход от охотников-собирателей к сельскохозяйственному образу жизни. Дополнительно, геном не имел времени, чтобы эволюционировать в такой степени и, следовательно, предполагается, что наш организм будет работать более эффективно при потреблении диеты наших предков каменного века (палеолит) - диеты Cordain (J. Am. Nutraceutical Ass., 5, 3, 15-24 (Summer 2002)).

Cordain (J. Am. Nutraceutical Ass., 5, 3, 15-24 (Summer 2002)) описывает современный ужин на основе групп пищевых продуктов Палеолита, приведенный в табл. 1. В табл. 2 приведен нутритивный анализ при использовании Национальной базы данных питательных веществ (National Nutrient Database for Standard Reference) Министерства Сельского хозяйства США (US Department of Agriculture) и базы данных Phenol-Explorer (<http://www.phenol-explorer.eu>). Cordain разъясняет, что разница между типичной западной диетой и указанной выше диетой на основе группы пищевых продуктов Палеолита состоит в том, что последняя имеет значительно более высокий уровень белка. Поскольку белок имеет в три раза больший термический эффект (thermic effect) и больший показатель сытости, чем жир или углеводы, то богатая белком диета может быть эффективной для контроля или снижения веса. Затем Cordain ссылается на клинические исследования, в которых показано, что для снижения веса у субъектов с избыточным весом более эффективны богатые белком диеты с ограниченной калорийностью, чем богатые углеводами диеты с ограниченной калорийностью.

Torronen et al. (British J. Nutrition, 1-7 (2011)) указывает, что пищевые полифенолы могут влиять на метаболизм сахарозы. Torronen et al. также указывает, что многие полифенолы ингибируют активность альфа-глюкозидазы или транспорт глюкозы in-vitro и снижают у животных повышенные уровни глюкозы в крови после перорального введения глюкозы или сахарозы. В их исследовании было установлено, что пик глюкозы в капиллярной и венозной плазме и концентрация инсулина снижаются после потребления блюда из смеси ягод (черная смородина, черника, клюква и клубника) на натуральном сахаре. Jew et al. (J. Medicinal Food, 12 (5), 925-934 (2009)) указывают, что произошли сдвиги от диеты с высоким содержанием фруктов, овощей, постного мяса и морепродуктов в сторону прошедших технологическую обработку продуктов с высоким содержанием натрия и гидрогенизованных жиров и низким содержанием пищевых волокон. Эти изменения в диете оказали негативное влияние на диетические параметры, как известно, связанные со здоровьем, что в результате приводит к повышению ожирения и хроническим заболеваниям, включая сердечно-сосудистые, диабеты и рак. Дополнительно, Jew et al. приводят в табл. 3 образец меню для современной диеты, основанной на группе продуктов Палеолита. Нутритивный анализ завтрака, обеда и ужина приведен в табл. 3 при использовании Национальной базы данных питательных веществ (National Nutrient Database for Standard Reference) Министерства Сельского хозяйства США (US Department of Agriculture) и базы данных Phenol-Explorer (<http://www.phenol-explorer.eu>), информация приведена в табл. 2.

Таблица 1

Завтрак, обед и ужин, приведенный в табл. 3, Jew et al.
 (J. Medicinal Food, 12 (5), 925-934 (2009)) и частично Cordain
 (J. Am. Nutraceutical Ass., 5, 3, 15-24 (Summer 2002))

Ингредиенты	Масса (грамм)
Завтрак	
Мускусная дыня	276
Атлантический лосось (вареный)	333
Обед (овощной салат с грецкими орехами)	
Измельченный салат ромэн	68
Морковь, нарезанная ломтиками	61
Огурец, нарезанный ломтиками	78
Томаты, разрезанные на четыре части	246
Заправка из лимонного сока	31
Грецкие орехи	11
Вареная постная свиная корейка	86
Ужин (овощной салат с авокадо/миндалем)	
Смесь измельченной зелени	112
Томаты	123
Авокадо	85
Дробленый миндаль	45
Красный лук, нарезанный ломтиками	29
Заправка из лимонного сока	31
Вареная на пару брокколи	468
Постная говяжья вырезка, жареная на вертеле	235
Десерт (клубника)	130

Табл. 2: нутритивные показатели завтрака, обеда и ужина, приведенные в табл. 3, Jew et al. (J. Medicinal Food, 12 (5), 925-934 (2009)) и частично Cordain (J. Am. Nutraceutical Ass., 5, 3, 15-24 (Summer 2002)), как описано и нормализовано до 650 ккал. Показатели рассчитали при использовании Национальной базы данных питательных веществ (National Nutrient Database for Standard Reference) Министерства Сельского хозяйства США (US Department of Agriculture) и базы данных Phenol-Explorer (<http://www.phenol-explorer.eu>)

Таблица 2

Нутритивный индикатор	Нутритивные показатели			
	Завтрак	Обед	Ужин	
	Нормализованный до 650 ккал			
Калории (ккал)	780	650	272	650
Пищевые волокна (г)	2,5	2,1	7,3	17,4
Белок (г)	75,9	63,3	23,9	57,1
Крахмал (г)	0,1	0,1	1,5	3,6
Лактоза (г)	0,0	0,0	0,0	0,0
Флавоноид агликон (г)	0,00	0,00	0,03	0,07
Флавоноид глюкозид (г)	0,00	0,00	0,59	1,41
Антоцианидин (мг)	0,00	0,00	0,00	0,00
Цианидин (мг)	0,00	0,00	0,00	0,65
Дельфинидин (мг)	0,00	0,00	0,00	0,00
Эпикатехин (мг)	0,00	0,00	0,00	0,603
Каэмпферол (мг)	0,00	0,00	0,02	0,05
Пеларгонидин (мг)	0,00	0,00	0,00	0,014
Кверцетин (мг)	0,00	0,00	0,01	0,02
Цианидин-3-глюкозид (мг)	0,00	0,00	0,00	3,76
Пеларгонидин-3-глюкозид (мг)	0,00	0,00	0,00	60,9
Кверцетин-3,4-глюкозид (мг)	0,00	0,00	0,00	0,897
Кверцетин-3-глюкозид (мг)	0,00	0,00	0,25	0,60
Кверцетин-4-глюкозид (мг)	0,00	0,00	0,00	0,665
Углеводы (г)	24,3	20,3	25,6	61,2
Энергетическая ценность (ккал/г)	1,28	1,28	0,47	0,47
			1,06	1,06

Пищевой продукт, стандартизованный до 650 ккал на порцию пищевого продукта, имеет относительно низкое содержание пищевых волокон и флавоноидов и высокое содержание белка по сравнению с пищевым продуктом по настоящему изобретению. Уровни углеводов, в общем, сравнимы. Из данных, доступных из базы данных Phenol Explorer database, наблюдается большой недостаток флавоноидов агликонов, глюкозидов и антоцианидинов в завтраке, низкое присутствие в обеде и относительно высокое в ужине.

Frassetto et al. (Eur. J. Clinical Nut., 63, 947-955 (2009)) описывают исследование, направленное на выявление оказания положительного воздействия на здоровье диеты, аналогичной таковой диете предшественников земледельцев охотников-собирателей. Результаты показали улучшение артериального давления крови и толерантности к глюкозе, снижение секреции инсулина и повышение чувствительности к инсулину, и улучшенный липидный профиль без потери веса у здоровых людей с малоподвижным образом жизни. В табл. 2 приведены данные по блюдам при проведении теста-когорты на ежедневной основе, но недостаточно подробно, чтобы быть воспроизведенным. Jonsson et al. (Cardiovascular Diabetology, 8:35 (2009)) приводят исследование воздействия на факторы риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний диеты Палеолита и диабетической диеты у пациентов со вторым типом диабета, не получающих инсулин. Результаты показали, что диета Палеолита улучшает гликемический контроль и ослабляет некоторые факторы риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний по сравнению с диабетической диетой у пациентов с диабетом 2 типа. В табл. 5 приведено среднее количество пищи, съедаемое в день в тестируемой когорте, но недостаточно детально, чтобы воспроизвести отдельные

блюда.

Jonsson et al. (Nutrition and Metabolism, 7:85 (2010)) приведены результаты исследования воздействия диеты Палеолита у пациентов с ишемической болезнью сердца по сравнению со Среднеземноморской диетой на сытость. Было установлено, что диета Палеолита более сытная на калорию по сравнению со Среднеземноморской диетой. В табл. 2 приведены пищевые продукты, получаемые тестируемой когортой ежедневно, но недостаточно детально, чтобы воспроизвести отдельные блюда.

Lindeberg et al. (Diabetologica, 50:1795-1807 (2007)) описывают сравнительное исследование диеты Палеолита и Среднеземноморской диеты у пациентов с ишемической болезнью сердца плюс или с нетолерантностью к глюкозе или с диабетом 2 типа. Было заключено, что диета Палеолита может улучшить толерантность к глюкозе независимо от уменьшения окружности талии. В табл. 5 приведена средняя композиция ежедневной диеты, но недостаточно детально, чтобы воспроизвести отдельные блюда.

Jew et al. указали, что диета Палеолита богата растениями. Однако авторы настоящего изобретения также предполагают, что растения времен Палеолита обладали иной питательностью. В частности, они содержали больше флавоноидов и пищевых волокон, чем современные культуры. Это происходит из-за того, что содержание флавоноидов и пищевых волокон во многих современных культурах снижено из-за селекционных программ, нацеленных на изменение вкуса и аромата и текстуры (некоторые флавоноиды имеют горький вкус; некоторые пищевые волокна "волокнистые" "stringy"). Следовательно, авторы настоящего изобретения выбирали современные растения, как с относительно высоким содержанием флавоноидов, так и пищевых волокон для пищевого продукта, описанного в настоящей патентной заявке.

Следовательно, нутритивное содержание полученного в результате пищевого продукта ближе к питанию Палеолита, до потребления которого человек эволюционировал и, следовательно, оно более совместимо с физиологией человека и соответственно полезно для здоровья, как проиллюстрировано в примерах. Продолжают прилагаться усилия по обеспечению пищевых продуктов с положительным воздействием на здоровье и обладающим дополнительными выгодами.

Краткое описание

В первом аспекте настоящее изобретение относится к пищевому продукту, предназначенному для потребления человеком, где пищевой продукт содержит:

- (a) 250-650 килокалорий (1045-4180 килоджоулей);
- (b) 10-50, предпочтительно 20-50, более предпочтительно 30-50 г пищевых волокон;
- (c) 10-50, предпочтительно 10-30, более предпочтительно 10-20 г белка;
- (d) от 0 до 5, предпочтительно менее чем 3 г крахмала;
- (e) от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1, наиболее предпочтительно от 0 до 0,5 г лактозы;
- (f) по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 30, наиболее предпочтительно по меньшей мере 40 мг любого агликона флавоноидов; и
- (g) по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 40, наиболее предпочтительно по меньшей мере 50 мг любого глюкозида флавоноидов;

где пищевой продукт содержит

75-1000 мг общих агликов и глюкозида флавоноида,
не более чем 250 мг любого агликона флавоноида,
не более чем 250 мг любого глюкозида флавоноида.

Используемый в описании настоящей патентной заявки термин "пищевой продукт" относится к полному (все блюда, включая десерт) завтраку, обеду и ужину, исключая напитки.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к пищевому продукту, предназначенному для потребления человеком, где пищевой продукт имеет калорийность 650 килокалорий:

- (a) 10-50, предпочтительно 20-50, более предпочтительно 30-50 г пищевых волокон;
- (b) 10-50, предпочтительно 10-30, более предпочтительно 10-20 г белка;
- (c) от 0 до 5, предпочтительно менее чем 3 г крахмала;
- (d) от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1, наиболее предпочтительно от 0 до 0,5 г лактозы;
- (e) по меньшей мере 450, предпочтительно по меньшей мере 500, наиболее предпочтительно 700 мг агликона флавоноида и/или глюкозида флавоноида, выраженных в эквивалентах галловой кислоты (GAE); и

(f) необязательно не более чем 2000, предпочтительно 1500 мг агликона флавоноида и/или глюкозида флавоноида, выраженных в эквивалентах галловой кислоты (GAE).

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа и ожирения; и контроля веса и снижения веса, включающему стадии введения субъекту, нуждающемуся в этом, пищевого продукта по первому аспекту настоящего изобретения.

Краткое описание фигур

Изобретение иллюстрируют следующие фигуры.

Фиг. 1 - результаты инсулина венозной плазмы, выраженные как площадь чистого приращения концентрации по времени (кривой времени) в течение 0-2 ч (мин·мкЕд/л). Гистограммы на фиг. слева показывают средние значения \pm стандартная ошибка среднего, гистограммы справа показывают изменения по сравнению с контрольным пищевым продуктом (мин·мкЕд/л) и \pm стандартная ошибка среднего. Данные основываются на 18, 20 и 20 кривых инсулина, полученных от PAL1, PAL2 и контрольного пищевого продукта соответственно;

фиг. 2 - изменения инсулина венозной плазмы от базовых (мин·мкЕд/л) в течение от 0 (базовые показатели перед потреблением пищевого продукта) до 180 мин после начала потребления пищевого продукта;

фиг. 3 - изменения инсулина венозной плазмы от базовых (ммоль/л) в течение от 0 (базовые показатели перед потреблением пищевого продукта) до 180 мин после начала потребления пищевого продукта;

фиг. 4 - изменения PYY венозной плазмы от базовых (пмоль/мл) в течение от 0 (базовые показатели перед потреблением пищевого продукта) до 180 мин после начала потребления пищевого продукта;

фиг. 5 - изменения GLP-1 венозной плазмы от базовых (пмоль/мл) в течение от 0 (базовые показатели перед потреблением пищевого продукта) до 180 мин после начала потребления пищевого продукта;

фиг. 6 - изменения GIP венозной плазмы от базовых (пмоль/мл) в течение от 0 (базовые показатели перед потреблением пищевого продукта) до 180 мин после начала потребления пищевого продукта;

фиг. 7 - самостоятельная оценка признаков "голодный", "сытый" и "хочу есть" (%) в течение от 0 (базовые показатели перед потреблением пищевого продукта) до 180 мин после начала потребления пищевого продукта;

фиг. 8 - активация рецептора GPR14 экстрактами контрольного ужина, PAL2 ужина и Jew et al. ужина, выраженная в процентах относительно активации концентрации EC₈₀ контрольного агониста (40 мкг/мл водного экстракта метанола, 8 мкг/мл экстракта петролейного эфира, 8 мкг/мл экстракта дихлорметана, 4 мкг/мл экстракта этилацетата, 40 мкг/мл экстракта 1-бутанола и 40 мкг/мл водного экстракта);

фиг. 9 - активация M1 мускаринового рецептора экстрактами контрольного ужина, PAL2 ужина и Jew et al. ужина, выраженная в процентах относительно активации концентрации EC₈₀ контрольного агониста (40 мкг/мл водного экстракта метанола, 8 мкг/мл экстракта петролейного эфира, 8 мкг/мл экстракта дихлорметана, 4 мкг/мл экстракта этилацетата, 40 мкг/мл экстракта 1-бутанола и 40 мкг/мл водного экстракта);

фиг. 10 - активация M3 мускаринового рецептора экстрактами контрольного ужина, PAL2 ужина и Jew et al. ужина, выраженная в процентах относительно активации концентрации EC₈₀ контрольного агониста (40 мкг/мл водного экстракта метанола, 8 мкг/мл экстракта петролейного эфира, 8 мкг/мл экстракта дихлорметана, 4 мкг/мл экстракта этилацетата, 40 мкг/мл экстракта 1-бутанола и 40 мкг/мл водного экстракта); и

фиг. 11 - ингибирование транспорта глюкозы дихлорметановыми экстрактами (75 мкг/мл) контрольного ужина, PAL2 ужина и Jew et al. ужина, выраженные в процентах относительно контроля с растворителем.

Детальное описание

В первом аспекте настоящее изобретение относится к пищевому продукту, предназначенному для потребления человеком, пищевой продукт содержит:

- (a) 250-650 килокалорий (1045-4180 килоджоулей);
- (b) 10-50, предпочтительно 20-50, более предпочтительно 30-50 г пищевых волокон;
- (c) 10-50, предпочтительно 10-30, более предпочтительно 10-20 г белка;
- (d) от 0 до 5, предпочтительно менее чем 3 г крахмала; и
- (e) от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1, наиболее предпочтительно от 0 до 0,5 г лактозы;
- (f) по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 30, наиболее предпочтительно по меньшей мере 40 мг любого агликона флавоноидов; и
- (g) по меньшей мере 30, предпочтительно по меньшей мере 40, наиболее предпочтительно по меньшей мере 50 мг любого глюкозида флавоноидов;

где пищевой продукт содержит

75-1000 мг общих агликов и глюкозида флавоноида,
не более чем 250 мг любого агликона флавоноида,
не более чем 250 мг любого глюкозида флавоноида.

Верхний предел пищевых волокон ограничен риском расстройства кишечника выше указанного предела. Верхний предел общих агликона флавоноида и глюкозида флавоноида ограничены необходимостью маскировать повышение горечи, связанное с агликоном флавоноида и глюкозидом флавоноида.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к пищевому продукту для потребления человеком, когда пищевой продукт имеет калорийность 650 килокалорий:

- (a) 10-50, предпочтительно 20-50, более предпочтительно 30-50 г пищевых волокон;
- (b) 10-50, предпочтительно 10-30, более предпочтительно 10-20 г белка;
- (c) от 0 до 5, предпочтительно менее чем 3 г крахмала;
- (d) от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1, наиболее предпочтительно от 0 до 0,5 г лактозы;
- (e) по меньшей мере 450, предпочтительно по меньшей мере 500, наиболее предпочтительно 700 мг агликона флавоноида и/или глюкозида флавоноида, выраженных в эквивалентах галловой кислоты (GAE); и
- (f) необязательно не более чем 2000, предпочтительно 1500 мг агликона флавоноида и/или глюкозида флавоноида, выраженных в эквивалентах галловой кислоты (GAE).

Следовательно, во втором аспекте настоящее изобретение выражено термином пищевой продукт с уровнями нутриентов, только когда пищевой продукт нормализован по калорийности 650 килокалорий. Следовательно, объем притязаний настоящего изобретения включает пищевой продукт с калорийностью более чем или менее чем 650 килокалорий, но когда нормализовано до уровня 650 килокалорий, имеет уровни нутриентов, как указано в функциональных признаках (a)-(f). Было установлено, что уровни сытости гораздо выше при использовании пищевого продукта по настоящему изобретению по сравнению с контрольным пищевым продуктом на основе руководства по правильному питанию (WHO technical report series no. 916 "Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases" (2003)) Всемирной Организации Здравоохранения (WHO). Неожиданно это достигается даже при уровнях белка в контролльном пищевом продукте, то есть при гораздо более низком уровне, чем уровни в пищевом продукте на основе принципов диеты Палеолита, например пищевом продукте, описанном Cordain и в Jew et al. ранее. Как правило, белок обеспечивается мясом. Животноводство требует значительных ресурсов и, следовательно, одним из преимуществ пищевого продукта с низким уровнем белка является то, что он более экологичен. Также белок может быть обеспечен соей, но она не может быть выращена во всех регионах мира. Другое неожиданное наблюдение состоит в том, что высокие уровни флавоноидов (агликон и глюкозиды) в пищевом продукте по настоящему изобретению в результате приводят к снижению пиков уровня инсулина при отсутствии снижения пиков уровней глюкозы для заданного уровня общих углеводов. Послеобеденные пики глюкозы ассоциируются с повышенным риском развития диабета 2 типа и сердечно-сосудистых заболеваний. Следовательно, считается, что диета по настоящему изобретению направлена на пищевой продукт, который приводит к более низкому послеобеденному пику инсулина с потреблением более сбалансированных калорий между белками и углеводами по сравнению с таковым с повышенным уровнем белка, наблюдавшимся ранее при питании на основе принципов диеты Палеолита, например Cordain.

Предпочтительно экстракт петролейного эфира (40-60°C) водного экстракта метанола пищевого продукта по второму аспекту настоящего изобретения имеет эквивалент галловой кислоты 5-40, предпочтительно 15-30, более предпочтительно 20-30 мг, где экстракт дихлорметана водного экстракта метанола после экстракции петролейным эфиром (40-60°C) водного экстракта метанола имеет эквивалент галловой кислоты 5-25, предпочтительно 10-20, более предпочтительно 13-18 мг, где экстракт этилацетата (40-60°C) водного экстракта метанола после последовательной экстракции петролейным эфиром (40-60°C) и дихлорметаном имеет эквивалент галловой кислоты 20-40, предпочтительно 25-35 мг, где экстракт 1-бутанола водного экстракта метанола после последовательной экстракции петролейным эфиром (40-60°C), дихлорметаном и этилацетатом имеет эквивалент галловой кислоты 100-400, предпочтительно 150-350, более предпочтительно 200-300 мг, где водный экстракт водного экстракта метанола после последовательной экстракции петролейным эфиром (40-60°C), дихлорметаном, этилацетатом и 1-бутанолом имеет эквивалент галловой кислоты 400-1200, предпочтительно 600-1000, более предпочтительно 700-900 мг. Предпочтительно агликон флавоноида в первом или втором аспекте настоящего изобретения содержит по меньшей мере 0,05 мг, предпочтительно по меньшей мере 0,25 мг, более предпочтительно по меньшей мере 0,5 мг по меньшей мере одного антоцианидина. В частности, пищевой продукт может содержать любое из группы, состоящей из апигенина, лютеолина, мирицетина, кверцетина, цианидин-3-глюкозида, малвидин-3-глюкозида, пеларгонидин-3-глюкозида и их смесей.

Было отмечено, что энергетическая ценность 0,25-1 килокалория (4,18 килоджоулей)/г пищевого продукта является, по существу, преимущественной в отношении сытости и, следовательно, показателя предупреждения или лечения ожирения, контроля веса и снижения веса.

В другом аспекте пищевой продукт по настоящему изобретению может быть использован в качестве лекарственного средства, в частности для предупреждения или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа и ожирения; и контроля веса и снижения веса.

В качестве альтернативы в другом аспекте настоящее изобретение относится к применению пищевого продукта по настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для предупреждения или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа и ожирения; и для контроля веса и снижения веса.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа и ожирения; и контроля веса и снижения веса, включающему стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, пищевого продукта по настоящему изобрете-

нию.

В другом аспекте настояще изобретение относится к применению пищевого продукта по настоящему изобретению для предупреждения или лечения ожирения; и для контроля веса и снижения веса.

Приведенное ниже исследование показало, что пищевой продукт по Палеолиту (PAL1 и PAL2) оказывает положительное воздействие на послеобеденные показатели и на состояние здоровья по сравнению с пищевым продуктом, составленным согласно рекомендациям правильного питания ВОЗ (контрольный пищевой продукт). Три тестируемых пищевых продукта были нормализованы до содержания 50 г доступных углеводов. Два пищевых продукта по типу палеолита и третий пищевой продукт на основе рекомендаций ВОЗ. Все блюда потреблялись как завтрак.

Контрольный пищевой продукт был составлен на основе рекомендаций по правильному питанию ВОЗ для белков, жира и углеводов и содержит каждодневные "современные" ингредиенты, такие как белый рис.

Современная в большей степени прошедшая технологическую обработку диета исключает множество фитохимических веществ, считающихся полезными для здоровья и стимулирующими жизненную силу. В основном прошедшие технологическую обработку пищевые продукты имеют выхолощенную структуру и получены из рафинированных ингредиентов (в частности крахмалы) с высоким содержанием простых сахаров и не сопровождаются пищевыми волокнами и фитохимическими веществами. Пищевой продукт по Палеолиту 1 (PAL1) основывается на расчетных соотношениях белка, жира и углеводов типичного для охотников-собирателей и в нее не входят ингредиенты не доступные во времена Палеолита (например, отсутствуют злаки, молочные продукты). Этот пищевой продукт содержит большое количество фруктов и овощей, высокую пропорцию белка и жира и очень низкие уровни крахмала. Пищевой продукт по Палеолиту 2 (PAL2) основывается на рекомендациях по правильному питанию ВОЗ для белка, жира и углеводов, но также в его состав не входят ингредиенты, которые не были бы доступны во времена Палеолита (например, PAL2 не содержит злаков или молочных продуктов). PAL2 также имеет уровни фруктов и овощей аналогичные PAL1.

Пример 1.

1.1. Получение пищевого продукта.

Получили, как описано ниже, три разновидности пищевого продукта, приведенных в табл. 3.

Таблица 3

Описание пищевого продукта

	Единицы	Контроль	PAL 1	PAL 2
Белый рис, длиннозерный, обычный, прошедший тепловую обработку	г	90	-	-
Клубника, сырая	г	-	100	120
Яблоки сырье с кожурой	г	-	110	110
Перец сладкий желтый сырой	г	-	100	100
Рыба пикша, прошедшая тепловую обработку и обработку сухим теплом	г	-	90	-
Лук сладкий сырой	г	-	60	60
Манго замороженное	г	65	-	-
Морковь, прошедшая тепловую обработку, варку, дренирование без соли	г	50	-	-
Баклажан сырой	г	-	50	50
Грибы белые сырье	г	-	50	50
Рыба лосось атлантическая, выращенная на ферме, прошедшая тепловую обработку	г	39	39	39
изюм без косточек	г	-	25	25
орехи, миндаль бланшированный	г	-	14	-
масло оливковое, салат или другие блюда	г	4	-	-
кабачок	г	-	150	150
корица	г	-	5	5
каперсы	г	-	5	5
масло из семян льна	г		4	4
общий вес перечисленных ингредиентов	г	248	802	732

1.1.1. Приготовление рыбы.

Цельные пластины филе лосося запекали завернутыми в фольгу при температуре 200°C в течение 40 мин до полной готовности. Это легко определить: мясо должно легко разделяться на кусочки в виде хлопьев и быть непрозрачным. Затем розовое мясо рыбы отделяли от кожи и разделяли на кусочки в виде хлопьев перед разделением на порции по 39 г (R2) в чистую тару (в некоторой уже находится морковь (R3)) и охлаждали на столе. Затем отдельные порции заморозили в интенсивном потоке воздуха с температурой -28°C в течение по меньшей мере 2 ч до момента перехода их в твердое замороженное состояние и затем хранили при температуре -20°C до дня проведения исследования.

Кусочки пикши завернули в фольгу и запекали при температуре 200°C в течение 30 мин до момента готовности. Затем мясо отделяют от кожи и разделяют на кусочки в виде хлопьев перед разделением на порции по 90 г в чистую тару и добавляли в боксы, уже содержащие лосось (R1), и охлаждали на столе. Затем отдельные порции заморозили в интенсивном потоке воздуха с температурой -28°C в течение по меньшей мере 2 ч до момента перехода их в твердое замороженное состояние и затем хранили при температуре -20°C до дня проведения исследования.

1.1.2. Получение контрольного пищевого продукта.

Морковь очистили и нарезали на ломтики 1 см, сварили в кипящей воде в течение 10 мин до момента готовности. Затем прошедшую тепловую обработку морковь охладили и развесили на отдельные порции в чистую тару, в которой уже находился лосось, образцы R3. Также в эту тару добавили 4 г оливкового масла и затем заморозили в интенсивном потоке воздуха с температурой -28°C в течение по меньшей мере 2 ч до момента перехода их в твердое замороженное состояние и затем хранили при температуре -20°C до дня проведения исследования. Манго было заморожено, порции оттаивали, когда требовалось, в ночь перед проведением исследования при температуре 4°C и подавали холодным.

В ночь перед исследованием в течение ночи в холодильнике при температуре не выше 4°C разморозили требуемое количество манго, лосося и моркови (R3). На утро исследования оттаившую порцию лосося и моркови подвергли обработке в микроволновой печи при 800 Вт в течение 3 мин (75°C, как измерено в центре при использовании термодатчика) в той же самой таре. В день исследования рис подвергли тепловой обработке при использовании 350 мл воды для 265 г (2 чашки) сухого риса. Рис подавали, когда он был горячим в течение 30 мин после тепловой обработки. Холодное манго помещали на тарелку и добавили 90 г свежесваренного риса.

1.1.3. Получение пищевого продукта по Палеолиту (PAL) Лук очистили от кожуры, из перца удалили сердцевину, у баклажанов и кабачков отрезали переднюю и заднюю часть, из яблок удалили сердцевину, но не удаляли кожуру. С клубники удалили зеленые листики. Каперсы промыли водой для удаления жидкости, в которой они хранились. Все овощи/фрукты/миндаль измельчили с получением крупных кусков по меньшей мере 1 см длиной. Как только провели измельчение, отвесили количество для каждой порции, таким образом, что все отдельные блюда могли быть приготовлены по отдельности. Масло, ко-рицу и каперсы для одной порции добавили в сковороду и туда же добавили остальные измельченные отвешенные овощи/фрукты/миндаль. Все ингредиенты проходили тепловую обработку на сильном огне в течение 15-20 мин до момента их готовности. Затем каждую отдельную порцию поместили в чистую, не использованную тару, которая может быть использована в микроволновой печи, укупорили и охладили при комнатной температуре в течение более чем 90 мин. Затем тару с индивидуальными порциями поместили в скороморозильный аппарат с интенсивным движением воздуха с температурой -28°C на 90 мин и оставили на ночь. Тару хранили при температуре -20°C до дня проведения исследования. В ночь перед исследованием требуемые овощные смеси стир-фрай (быстрая жарка на раскаленном масле при непрерывном перемешивании) (P1 и P2) и порции рыбы (R1 и R2) удалили из морозильника и оставили в холодильнике при температуре не более чем 4°C в течение ночи. В день исследования одну часть овощной смеси (P1 и P2) и одну часть каждой требуемой рыбы (R2 или R1) удалили из холодильника и смешали подходящую порцию рыбы с овощной смесью. Затем смесь подвергли обработке в микроволновой печи в течение 3 мин при полной мощности 800 Вт, перемешали и затем снова подвергли обработке в микроволновой печи в течение дополнительных 3 мин на полной мощности. Температура в толще в центре составила 75°C при использовании термодатчика.

1.2. Химический анализ пищевого продукта.

Пищевой продукт на каждый день заморозили в жидком азоте, подвергли лиофильной сушке, измельчили в гомогенизаторе и хранили при температуре -70°C в азоте. Ниже приведены исследования пищевого продукта.

1.2.1. Анализ на отдельные флавоноиды.

Определение апигенина, цианидин-3-глюкозида, дельфинидин-3-глюкозида, гесперетина, каэмфериола, лютеолина, малвидин-3-глюкозида, мирицетина, налингенина, пелагонидин-3-глюкозида и кверцетина провели удалением липидов из прошедшего лиофильную сушку измельченного пищевого продукта при использовании метода Meyer M.D. et al. (J. Agric. Food Chem., 56, 7439-7445 (2008)) и анализировали экстрагированные флавоноиды при использовании ВЭЖХ, как описано в Downes K. et al. (Postharvest Biol. Technol., 54, 80-86 (2009)) для флавоноидов и, как описано в Gine Bordonaba J. et al. (J. Agric. Food Chem., 56, 7422-7430 (2008)) для антоцианидинов. Компоненты определили при использовании диодной матрицы с контролем в виде известных стандартов и выразили в единицах мг пищевого продукта⁻¹ (mg.meal⁻¹).

Определение дельфинидина, эпикатехина, лютеолил-7-O-глюкозида, флоретина, флуоридзина и кверцетин-3-O-глюкозида провели последующей экстракцией этанолом после лиофильной сушки пищевого продукта. Кратко: 20 г прошедшего лиофильную сушку пищевого продукта экстрагировали 200 мл 70% водного этанола, содержащего 5 г/л аскорбиновой кислоты, в течение 2 ч при комнатной температуре при перемешивании. Суспензию отфильтровали, фильтр промыли дополнительными 50 мл водного этанола, содержащего аскорбиновую кислоту, фильтраты скомбинировали и удалили этанол вращательным испарением при температуре 40°C. Раствор добавили до 100 мл водой и отрегулировали pH до 7,0. Раствор пропустили через 50 мл колонку Amberchrom CG300C, промыли 500 мл воды (pH 7,0) и элюировали флавоноиды 750 мл абсолютного этанола. Элюат высушали вращательным испарением для удаления этанола и остаточную воду удалили лиофильной сушкой. Экстракты анализировали при использовании жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖК-МС) с МС детекцией при использовании электрораспыления отрицательных ионов и количественно определили при использовании известных стандарт-

тов. Показатели выражены в единицах мг пищевого продукта⁻¹ (mg.meal⁻¹).

1.2.2. Анализ сахаров.

Сахара экстрагировали водой, осветили и хроматографически разделили на аминной колонке с мобильной фазой ацетонитрил/вода. Сахара определяли при использовании испарительного нефелометрического детектора и количественно определили при использовании калибровочных стандартов. Показатели выражены в единицах г пищевого продукта⁻¹ (g.meal⁻¹).

1.2.3. Анализ крахмала.

Способ состоит из двух отдельных определений. Образец обработали теплой разведенной хлористо-водородной кислотой, осветили и отфильтровали; определяли вращение плоскости поляризации света полученного в результате раствора. Во втором определении образец экстрагировали 40% водным этанолом и отфильтровали. Фильтрат подкислили хлористо-водородной кислотой, осветили и снова отфильтровали; определяли вращение плоскости поляризации света полученного в результате раствора при температуре 20±2°C. Показатели выражены в единицах г пищевого продукта⁻¹ (g.meal⁻¹).

1.2.4. Белок.

Белок определили при использовании метода Кельдаля. Кратко: образец гидролизовали смесью концентрированной серной кислоты и сульфата калия при использовании сульфата меди(II) в качестве катализатора, превращая присутствующий органический азот в сульфат аммония. Избыток гидроксида натрия был автоматически добавлен в охлажденный перевар для освобождения аммония из сульфата аммония. Аммиак был автоматически разведен в избытке автоматически поданного индикатора - раствора борной кислоты, затем его автоматически титровали при использовании стандарта - раствора серной кислоты. Содержание азота в образце рассчитали из количества продуцированного аммония. Содержание белка определили при использовании переводного коэффициента 6,25. Показатели выражены в единицах г пищевого продукта⁻¹ (g.meal⁻¹).

1.2.5. Общий жир и жирные кислоты.

Образцы подвергли кислотному гидролизу при использовании хлористо-водородной кислоты, охладили, отфильтровали и высушили. Жир экстрагировали из осадка петролейным эфиром, и высушенный жир определили гравиметрически. Показатели выражены в единицах мг пищевого продукта⁻¹ (mg.meal⁻¹).

Липидные фракции образца экстрагировали растворителем. Выделенный жир переэтерифицировали метанольным метилатом натрия с получением метильных эфиров жирных кислот (FAMES). Профиль FAME определили при использовании капиллярной газовой хроматографии (ГХ). Количественное определение и определение отдельных FAME в тестируемом материале провели при использовании калибровочных стандартов. Показатели выражены в единицах мг пищевого продукта⁻¹ (mg.meal⁻¹).

1.1.2.6. Анализ пищевых волокон.

Пищевые волокна определяли при использовании метода АОАС. Кратко: образец взвесили и обезжирили. Затем он был желирован и обработан α -амилазой и дополнительно ферментативно переварен протеазой и амилоглюкозидазой для удаления крахмала и белка. Суспензию отфильтровали для удаления нерастворимых пищевых волокон, которые промыли, высушили и взвесили. Затем нерастворимые пищевые волокна определили гравиметрически и скорректировали по белку и золе. Оставшиеся в фильтрате пищевые волокна осадили этанолом, отфильтровали, промыли, высушили и взвесили. Затем гравиметрически определили растворимые пищевые волокна и скорректировали по белку и золе. Общие пищевые волокна определили осаждением растворимых пищевых волокон перед удалением нерастворимых пищевых волокон, полученный в результате преципитат промыли, высушили и взвесили. Затем общие пищевые волокна определили гравиметрически и скорректировали по белку и золе. Показатели выражены в единицах г пищевого продукта⁻¹ (g.meal⁻¹).

1.2.7. Натрий.

Анализ натрия провели при использовании спектрофотометрии индуктивно сопряженной плазмы и показатели выражены в единицах мг пищевого продукта⁻¹ (mg.meal⁻¹).

1.2.8. Результаты.

В табл. 4 приведены результаты химических анализов.

Таблица 4

Химический анализ пищевого продукта

Компонент	Единицы	Контроль	PAL1	PAL2
Нерастворимые пищевые волокна	г. пищевого продукта ⁻¹	1,42	11,7	12,5
Растворимые пищевые волокна	г. пищевого продукта ⁻¹	1,57	3,1	5,9
Общие пищевые волокна	г. пищевого продукта ⁻¹	2,99	14,8	17,7
Фруктоза	г. пищевого продукта ⁻¹	2,07	21,9	22,8
Глюкоза	г. пищевого продукта ⁻¹	0,689	15,7	14,3
Лактоза	г. пищевого продукта ⁻¹	но	но	но
Мальтоза	г. пищевого продукта ⁻¹	но	но	но
Сахароза	г. пищевого продукта ⁻¹	5,58	3,86	3,51
Общие сахара	г. пищевого продукта ⁻¹	8,34	41,5	40,6

Крахмал	г. пищевого продукта ⁻¹	41,5	но	но
Общие углеводы (по анализу) ^a	г. пищевого продукта ⁻¹	49,8	41,5	40,6
Белок	г. пищевого продукта ⁻¹	12,1	37,3	17,9
Энергия (рассчитанная)	ккал. пищевого продукта ⁻¹	331	553	378
Натрий	мг. пищевого продукта ⁻¹	57,8	278	96
Мононенасыщенные жирные кислоты	г. пищевого продукта ⁻¹	5,03	7,51	4,72
Полиненасыщенные жирные кислоты	г. пищевого продукта ⁻¹	1,65	3,74	7,09
Насыщенные жирные кислоты	г. пищевого продукта ⁻¹	1,53	1,96	2,47
Транс-жирные кислоты	г. пищевого продукта ⁻¹	0,009	<0,14	<0,11
Общий жир	мг. пищевого продукта ⁻¹	9,04	14,0	15,4
Омега-3/омега-6 ^b	Соотношение	1,22	0,61	2,18
Апигенин	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000	20,7	24,4
Дельфинидин	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,0697	0,0718	н.д.
Эпикатехин	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000	2,53	н.д.
Гесперетин	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000	0,000	0,000

Каэмферол	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000	1,89	2,46
Лютеолин	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000	12,7	22,5
Мирицетин	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000	2,86	3,90
Нарингенин	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000	0,000	0,000
Флоретин	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,00267	0,000	н.д.
Флоридзин	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000	1,33	н.д.
Кверцетин	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000	4,11	6,92
Агликоны «общих» флавоноидов	мг. пищевого продукта ⁻¹	≥0,0697	≥44,9	≥60,2
Цианидин-3-глюкозид	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000	16,7	21,9
Дельфинидин-3-глюкозид	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000	0,000	0,000
Лютеолин-7-О-глюкозид	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,000945	0,000	н.д.
Малвидин-3-глюкозид	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,904	33,6	62,9
Пелагонидин-3-глюкозид	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,566	34,6	61,4
Кверцетин-3-О-глюкозид	мг. пищевого продукта ⁻¹	0,0165	1,16	н.д.
Глюкозиды «общих» флавоноидов	мг. пищевого продукта ⁻¹	≥1,49	≥86,1	≥146
«Общие» флавоноиды	мг. пищевого продукта ⁻¹	≥1,56	≥131	≥206

Нд - нет данных.

Но - не определили.

«Общие» - сумма анализированных соединений флавоноидов флоридзин и флорентин не считаются флавоноидами.

^a Общие углеводы представляют сумму крахмала и общих сахаров.

^b Рассчитанные от анализируемых жирных кислот.

1.3. Клинический тест.

Полностью рандомизированное перекрестное исследование провели при участии двадцати четырех субъектов мужского пола, которые потребляли три тестируемых пищевых продукта с двух недельным периодом отмычки от предыдущего исследования между каждым тестом. Субъекты были поделены на четыре когорты по 6 субъектов в каждой. Каждую неделю принимали участие две когорты, в течение шести недель по меньшей мере с 2-недельными периодами восстановления между каждым участием. Порядок потребления пищевых продуктов определяли при использовании рандомизированного плана Вильямса (randomised Williams design) для каждой когорты из 6 субъектов. Таким образом, в каждой когорте 2 субъекта тестирували каждый тип пищевого продукта при каждом из 3 участий, субъекты тестирували при каждом участии отличающиеся пищевые продукты. Субъекты, выбывшие перед днем первого измерения, были заменены добровольцами, отвечавшими той же комбинации критерии, что и выбывшие субъекты. Субъектов, исключенных из исследования после получения по меньшей мере одного

исследуемого продукта, не заменяли.

1.3.1. Популяция исследования.

Для участия в исследовании были локально набраны двадцать четыре практически здоровых субъекта мужского пола (+4 в резерве) в возрасте 18-60 лет с индексом массы тела (ВМI, рассчитанный как масса/рост²) от 18 до 27 кг/м². Ниже приведены дополнительные критерии включения/исключения.

Критерии включения.

(а) Заявленные пищевые привычки: отсутствие диеты по медицинским показаниям, отсутствие диеты для похудения, питание 3 раза в день, не вегетарианец.

(б) Заявленная интенсивность занятий спортом не более 10 ч/неделю.

(с) Заявленное потребление алкоголя не более 21 порции/неделю.

(д) В настоящее время субъект не курит и не курил в течение по меньшей мере шести месяцев, и не заявлено об использовании каких-либо никотинсодержащих продуктов в течение шести месяцев, предшествующих исследованию и во время самого исследования.

(е) Измеренные натощак показатели глюкозы капиллярной крови находятся в локальных нормальных базовых значениях (как правило, от 3,5 до 6,5 ммоль/л, как измерено при использовании анализатора глюкоза и лактата YSI 2300 Stat Plus).

(ф) Не сдавал кровь в течение 1 месяца перед медицинским обследованием перед участием в исследовании или во время исследования.

Критерии исключения.

(а) Применение лекарственных средств, которые оказывают влияние на измерения, проводимые в исследовании (определяет врач, принимающий участие в исследовании).

(б) Неприятие, аллергия и непереносимость тестируемого пищевого продукта.

(с) Заявлена потеря/прирост веса (более 10%) в последние шесть месяцев перед участием в исследовании.

(д) Заявлено участие в других медико-биологических исследованиях в течение 3 месяцев перед началом исследования.

(е) Заявлен перевод на работу во вторую смену за две недели перед обследованием, проводимым перед исследованием или во время исследования. Работа в ночную смену определяется, как работа от полуночи до 6 ч утра.

1.3.2. Схема тестирования.

Добровольцы получили инструкции минимизировать изменения в своей повседневной жизни и избегать физической нагрузки высокой интенсивности и потребления алкоголя в течение 24 ч перед тестированием. Их попросили записывать все потребленное в течение 12 ч перед первым тестированием и повторить потребление тех же самых продуктов перед каждым последующим тестированием. Субъектов просили не есть с 8 ч вечера до утра следующего дня и им позволялось только пить воду. Добровольцы прибывали к месту проведения теста по меньшей мере за 30 мин до начала тестирования, всегда при использовании одного и того же вида транспорта.

Участники прибывали на место проведения теста с 8.00 до 8.30 ч утра. У каждого субъекта брали образец крови из пальца для того, чтобы гарантировать участие в тесте натощак. Измеряли уровни глюкозы крови при использовании глюкометра, при превышении значения 7 ммоль/л субъекта не допускали до участия в тесте по этой причине. Проводили забор двух отдельных образцов крови для определения глюкозы капиллярной крови уколом из двух отдельных пальцев (T-15) с последующим забором образца венозной крови натощак (T-10). За 5 мин до потребления тестируемого пищевого продукта (T-5) участники провели самостоятельную базовую оценку своей сытости. После этого они получили тестируемый пищевой продукт при ТО и потребили его все с 250 мл воды в течение 10 мин. Субъектам разрешили пить 150 мл воды каждый последующий час после потребления тестируемого пищевого продукта. Объем выпитой воды в течение каждого часа первого визита регистрировали и добровольцев просили повторить выпитое количество при последующих тестах. Добровольцам не разрешалось есть и пить ничего другого.

Сразу же после потребления и через определенные интервалы времени проводили анкетирование по сытости. Также проводили регулярный забор образцов венозной крови. Выполнение добровольцами ограничений в питании в вечер перед проведением интервенционных исследований было ограничено. Трое из 24 субъектов выбыли и 3 субъекта из резерва были исключены из-за протокола анализа (РР), поскольку они были не способны потребить по меньшей мере один пищевой продукт. Добровольцы имели проблемы с потреблением пищевого продукта, и во время 11 интервенционных исследований добровольцам требовалось более 15 мин для потребления всех пищевых продуктов полностью (максимум 28 мин).

1.3.3. Сбор образцов.

В время каждого из трех интервенционных исследований собрали 16 образцов венозной крови: 8 образцов от 3 до 5 мл в пробирках, содержащих этилендиаминетрауксусную кислоту (EDTA) (гастроинтестинальные гормоны), и 8 образцов от 3 до 5 мл в пробирках, содержащих гепарин (инсулин), в качестве инъекционного антикоагулянта широко используют сильно сульфатированный гликозаминогликан. Сразу же после сбора всех образцов крови пробирки поместили в ледяную воду. В EDTA образцы крови

добавили коктейль ингибиторов протеазы (Set III; EMD Chemical) 1% (об./об.) и пробирки осторожно перемешивали переворачиванием.

Образцы крови центрифугировали при температуре 4°C и два образца с более чем 500 мкл плазмы EDTA и два образца более чем 500 мкл плазмы с гепарином заморозили и хранили при температуре -70°C до момента проведения анализа.

1.3.4. Анализ и анкетирование.

Анализ глюкозы венозной плазмы провели при использовании анализатора Horiba ABX Clinical Chemistry при использовании коммерчески доступного набора PAP CP kit (ref A1 1 A01668) от ABX Pentra.

Анализ инсулина плазмы провели при использовании анализатора IMMULITE 2000 Systems на основе твердофазного иммуноферментного анализа с хемилюминесценцией при использовании 100 мкл гепаринизированной плазмы. Регистрируемые диапазоны составили 2-300 мкл Ед/мл, и аналитическая чувствительность составила 2 мкл Ед/мл.

Анализ пептида YY (PYY), глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1) и желудочного ингибиторного полипептида (GIP) гастроинтестинальных гормонов провели на плазме венозной крови при использовании продукта MILLIPEX MAP Human Gut Hormone Panel product номер HGT-68K, от Millipore, работающего на платформе Luminex® xMAP®. Для измерения грелина, лептина, глюкозозависимого инсулинопротивного полипептида (GIP), глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1), амилина (активный и общий), панкреатического полипептида (PP), пептида YY (PYY) и инсулина плазмы крови человека использовали набор для мультиплексного иммуноанализа.

Для измерения использовали набор для мультиплексного иммуноанализа. Оценку чувства сытости (насколько я голоден, насколько я сыт и как сильно я хочу есть) провели при использовании воспроизведенных и корректных оценок (Flint A., Raben A., Blundell J.E., Astrup A. "Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies", International Journal Of Obesity, 24, 38-48 (2000); Stubbs R.J., Hughes D.A., Johnstone A.M. et al., "The use of visual analogue scales to assess motivation to eat in human subjects: a review of their reliability and validity with an evaluation of new hand-held computerized systems for temporal tracking of appetite ratings", British Journal of Nutrition, 84, 405-15 (2000)) и измерили при использовании Визуальной аналоговой шкалы 1-100 (%) величин при использовании EVAS (электронной визуальной аналоговой шкалы, iPAQ) (Stratton R.J., Stubbs R.J., Hughes D., King N., Blundell J.E., Elia M. "Comparison of the traditional paper visual analogue scale questionnaire with an Apple Newton electronic appetite rating system (EARS) in free living subjects feeding ad libitum", European Journal Of Clinical Nutrition, 52, 737-41 (1998)), в нижней части шкалы оценок самая отрицательная или самая низкая интенсивность ощущений (например, совсем нет) и на противоположном конце шкалы самые высокие (например, очень сильное, экстремальное). Добровольцев просили указать на линейной шкале место, которое лучше всего отражает их чувство на данный момент. Оценки собрали, таким образом, они не могут быть использованы в качестве дополнительного контроля для последующих оценок. Добровольцы проходили анкетирование перед и через определенные интервалы после потребления (-5, 10, 25, 40, 55, 85, 115, 175 мин).

1.3.5. Результаты.

Ниже приведены результаты РР популяции.

Воздействие каждого типа пищевого продукта на пик ответной глюкозы, чистое приращение площади концентрации инсулина по времени (кривой времени), пик ответного инсулина и оценку сытости оценили при использовании смешанной модели дисперсионного анализа для определения случайного воздействия на субъекта, фиксированного воздействия продукта и базовой оценки (оценка натощак), как независимой переменной. Также, если требуется, изначально в качестве независимых переменных были приняты и сохранены в модели порядок тестирования, пол и BMI/масса (в начале исследования). Не было сделано никаких корректировок на повторяемость тестирования.

На фиг. 1 приведена площадь чистого приращения концентрации по времени (кривой времени) в течение 0-2 ч для инсулина, также получили аналогичную картину для всех трех интервенционных исследований. Площади чистого приращения концентрации по времени (кривой времени) в течение 0-2 ч для инсулина PAL1 и PAL2 (2420 и 1950 мин·млЕд/л соответственно) незначительно отличались от показателя 2141 мин·млЕд/л, полученного для контрольного пищевого продукта ($P=0,35$ и $P=0,52$ для PAL1 и PAL2, соответственно, по сравнению с контрольным пищевым продуктом при 95% степени достоверности).

Однако в табл. 5 приведены показатели пиков инсулина (мкл·Ед/л) для трех разновидностей пищевого продукта от 0 (базовый перед потреблением пищевого продукта) и 180 мин после потребления пищевого продукта показана разница между PAL2, демонстрирующим статистически значимо отличающийся показатель (38 мкл·Ед/л для PAL2 по сравнению с 49,3 мкл·Ед/л для контрольного пищевого продукта $P=0,024$ при 95% степени достоверности).

Таблица 5

Показатели пика инсулина (мкл·Ед/л) от 0 (базовый перед потреблением пищевого продукта) и 180 мин после потребления пищевого продукта. Р рассчитали, как при 95% степени достоверности

Пищев ой проду кт	п	Сред- нее (мклЕд /л)	Станда ртная ошибка Сред- него	Сред- нее изме- нение Кон-	Стан- дар- тная ошибка измене	Нижний предел интерва ла досто- верно- сти	Верхний предел интервала достовер- ности	% изме- нения конт- роля	P- пока- затель
			(мклЕд /л)	троля (мклЕд /л)	ния (мклЕд /л)	верно- сти для измене- ния (мклЕд/ л)	для изме- нения (мклЕд/л)		
PAL1	1	44,2	4,56	-5,1	4,77	-14,8	4,6	-10,3	0,29
	8								58
PAL 2	2	38,0	4,45	-11,4	4,80	-21,1	-1,6	-23,0	0,02
	0								41
Конт- роль	2	49,3	4,29						
	0								

Отклонение инсулина от пика также показывает более пологий наклон, как показано на фиг. 2, для обоих и для PAL1 и для PAL2, демонстрируя больший контроль инсулинового ответа на оба этих пищевых продукта по сравнению с контрольным (Кон) пищевым продуктом. Это резкое падение пика является причиной того, почему площадь чистого приращения концентрации по времени (кривой времени) в течение 0-2 ч для инсулина PAL1 и PAL2 не отличается от контрольного пищевого продукта (см. фиг. 1), и форма кривой показывает более ясную картину пользы PAL1 и PAL2 пищевого продукта для общего контроля инсулина.

На фиг. 3 показаны изменения уровней инсулина венозной плазмы (ммоль/л) от начальных базовых в течение от 180 мин, и в табл. 6 показано, что разница в пиках показателей глюкозы (ммоль/л) для трех пищевых продуктов в течение от 0 (базовые показатели перед потреблением пищевого продукта) до 180 мин после начала потребления пищевого продукта между всеми тремя пищевыми продуктами незначительна (6,2 ммоль/л для PAL1 и 6,4 ммоль/л для PAL2 по сравнению с 6,5 ммоль/л для контрольного пищевого продукта P=0,0596 и 0,5297 соответственно при 95% степени достоверности).

Таблица 6

Показатели пика глюкозы (мкл/л) от 0 (базовый перед потреблением пищевого продукта) и 180 мин после потребления пищевого продукта. Р рассчитали, как при 95% степени достоверности

Пищев ой проду кт	п	Сред- нее (ммоль /л)	Стан- дар- тная ошибка Сред- него (ммоль /л)	Среднее измене- ние Кон-	Стан- дар- тная ошибка измене- ния (ммоль /л)	Нижний предел интерва ла досто- верно- сти для измене- ния (ммоль/ л)	Верхний предел интервала достовер- ности для измене- ния (ммоль/л)	% из- мене- ния конт- роля	P- пока- затель
PAL1	1	6,2	0,11	-0,3	0,13	-0,5	0,0	-3,9	0,05 9
	8								6
PAL 2	2	6,4	0,11	-0,1	0,13	-0,3	0,2	-1,2	0,52 9
	0								7
Конт- роль	2	6,5	0,10						
	0								

В то время как показатели пиков глюкозы венозной крови для венозной глюкозы незначительно отличаются между PAL пищевого продукта и Контролем, кривая глюкозы PAL2 демонстрирует значительно более пологий наклон в течение от 30 до 60 мин по сравнению с PAL1 и Контролем, дополнительно в

противоположность две другие кривые никогда не заходят значительно ниже базовых показателей, демонстрируя послеобеденный "провал". Вероятно, это связано с более низким пиком инсулина, показанным на фиг. 1.

На фиг. 4 показаны изменения уровней PYY (пг/мл) от начального базового уровня до 180 мин. Согласно Pedersen-Bjergaard et al. (Scand. J. Clin. Lab. Invest., 56, 497-503 (1996)), PYY выделяется после обеда в пропорции к потребленным калориям. Хотя не оказывалось влияние на увеличение желудка, согласно Batterham et al. (Nature, 418, 650-654 (2002)), была показана большая роль в достижении сытости и снижение аппетита. Считается, что более низкие уровни PYY связаны с резистентностью к инсулину у не страдающих диабетом родственников диабетиков. Значительно более высокие уровни PYY видимые для обоих PAL пищевых продуктов коррелируют с результатами, приведенными на фиг. 7, что следовало, ожидать, учитывая роль PYY в сытости. Однако схожесть ответа PAL1 и PAL2 предполагает, что различия по калориям и белку не оказали воздействия на эти различия, как ожидалось, согласно цитируемой литературе. Это в сочетании с совпадением калорийности PAL2 и Контроля предполагает, что некоторые признаки PAL пищевых продуктов могут оказывать влияние на ответ PYY.

На фиг. 5 приведены данные GLP-1, которые показывают, что оба PAL пищевых продукта дают повышенный ответ по сравнению с Контрольным пищевым продуктом. Neff et al. (Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, 3, 263-273 (2010)) описывают, что GLP-1 играет вторичную роль в сытости, в которой он представляет механизм обратной связи с подвздошным механизмом торможения, замедляя перистальтику и посылая в мозг сигнал о насыщении. Более высокие уровни GLP-1 для обоих PAL пищевых продуктов играют роль в сытости, что отражено в результатах, полученных на фиг. 7. Согласно Nauck et al. (Diabetologia, 54, 10-18 (2011)) GLP-1 постепенно снижается, как часть физиопатологии диабета 2 типа, и согласно le Roux et al. (Ann Surg, 243: 108-14 (2006)) повышение GLP-1 также является одним из первых заметных эффектов вместе со снижением толерантности к глюкозе у пациентов, прошедших бariatрическую хирургическую операцию по Ру, считается, что способность PAL пищевого продукта индуцировать GLP-1 оказывает положительное влияние на оба типа диабета и также на тех, кто демонстрирует более ранние стадии плохого контроля глюкозы.

На фиг. 6 показан GIP ответ трех пищевых продуктов, и неожиданно показано значительное подавление GIP обоими PAL пищевыми продуктами. Согласно [06] Drucker (J. of Clin. Inv., 117, 24-32 (2007)) GIP продуцируется К клетками тонкого кишечника, откуда они транспортируются в поджелудочную железу и индуцируют инсулин, как часть ответа инкритина. В отличие от GLP-1 и PYY, GIP не играет роли в подаче сигнала сытости или в подвздошном механизме торможения. Снижение GIP ответа у двух PAL пищевых продуктов, несмотря на высокие уровни свободной глюкозы, предполагающие индуцирование GIP, позволяет ингибировать транспортеры глюкозы к К клеткам другими ингредиентами этих пищевых продуктов, что может представлять механизм, приводящий к такому ингибированию. Gorboulev et al. (Diabetes, 61, 187-196 (2012)) сообщает, что сниженные уровни GIP у нокаутных мышей по гену натрий-зависимого переносчика 1 глюкозы (SGLT-1) позволяет предположить возможный механизм снижения GIP. Miyawaki K. et al. (Nature Medicine, 8, 738-742 (2002)) сообщают о присутствии GIP рецепторов в жировой ткани. Таким образом, GIP может облегчать поступление пищевых липидов и сахаров из крови в жировую ткань, что способствует приросту массы. Этот паттерн пониженного GIP и повышенных PYY и GLP-1 аналогичен таковому наблюдаемому у пациентов, прошедших бariatрическую хирургическую операцию по Ру, где Korner J. et al. (Surg. Obes. Relat. Dis., 3, 597-560 (2007)) показали связь с улучшениями симптомов диабета и потерей веса.

На фиг. 7 показаны результаты сытости, указывающие на значительные различия между контрольным пищевым продуктом и обоими PAL1 и PAL2. Снизились самостоятельные оценки "чувства голода" и "желания есть" (см. фиг. 7A и 7C) и повысилась самостоятельная оценка "чувства сытости" (см. фиг. 7B) в гораздо большей степени у PAL1 и PAL2 по сравнению с контрольным пищевым продуктом (Кон). Среднее оценок значительно отличается в конце измерений через 3 ч после начала потребления пищевого продукта. Площадь под кривой для всех трех оценок (чувство голода, чувство сытости, желание поесть) значительно отличается для контроля по сравнению с обоими PAL1 и PAL2 как через 2 ч, так и через 3 ч (все $P<0,0001$ при 95% степени достоверности).

1.3.6. Комментарии.

Пик инсулина через 30 мин значительно ниже у PAL2 по сравнению с контрольным пищевым продуктом, PAL2 пищевой продукт из этих двух пищевых продуктов, в наибольшей степени совпадающих по белку и энергии наряду с углеводами, предположительно оказывает самое выраженное положительное воздействие на здоровье. Также уровни инсулина лучше контролировались с точки зрения устойчивого снижения у обоих PAL1 и PAL2 через 180 мин исследования, что демонстрирует положительное воздействие на регуляцию контроля инсулина. Оба и PAL1 и PAL2 показали значительное снижение среднего самостоятельной оценки параметра "чувство голода" и "желание поесть" и повышение оценки параметра "сытость" по сравнению с контрольным пищевым продуктом. Изменения видны сразу же после потребления пищевого продукта и сохранялись на протяжении всех 180 мин после потребления пищевого продукта. Следует отметить, что оба и PAL1 и PAL2 имеют более высокую массу после тепловой обработки (680 г и 580 г для PAL1 и PAL2, соответственно, по сравнению с 250 г для контрольного пи-

щевого продукта), а калорийность PAL2 и контрольного пищевого продукта очень похожи. Эта разница между PAL1/PAL2 и контрольным пищевым продуктом, вероятно, будет значительно ниже по сравнению с отличающейся калорийностью между пищевыми продуктами (от 0,8 до 0,65 ккал/г для PAL1 и PAL2, соответственно, и 1,3 ккал/г для контрольного пищевого продукта), но сходство между PAL1 и PAL2 предполагает, что белок оказывает меньшее воздействие, и также возможно, что высокое содержание фитохимических веществ играет роль в том факте, что уровни сытости все еще высокие даже после 180 мин.

Разница между контрольным пищевым продуктом и PAL1 и PAL2 заключается в более низком содержании пищевых волокон и флавоноидов и более высоком содержании крахмала в Контрольном пищевом продукте по сравнению с двумя другими. Вероятно, крахмал быстро переваривается до сахаров, также исходя из того факта, что количество доступных углеводов во всех трех пищевых продуктах очень близкое, маловероятно, что эта разница вызвала более низкий пик инсулина через 30 мин для PAL2 или более высокие для PYY, как показано на фиг. 7 через 30 мин, и позже для обоих PAL1 и PAL2. Пищевые волокна могут рассматриваться как такой фактор, однако данные Jonsson et al. (2010) позволяют предположить, что пищевые волокна не являются фактором, играющим роль в повышении сытости при исследовании диет с высоким содержанием фруктов и овощей.

Аналогично, оба PAL1 и PAL2 показали повышение PYY, GLP-1 и снижение GIP по сравнению с контрольным пищевым продуктом. Все эти три результата могут рассматриваться как благоприятные для здоровья результаты клинического исследования. Не желая быть ограниченными какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения считают, что возможным объяснением являются флавоноиды и другие фенольные смолы в PAL1 и PAL2, которые активируют рецепторы в кишечнике, и они ответственны за изменения гормонов в крови.

1.3.7. Заключение.

Хотя в целом уровень инсулина, выраженный как площадь чистого приращения концентрации по времени (кривой времени) через 0-2 ч незначительно для PAL1 или PAL2 относительно контрольного пищевого продукта, выделение инсулина, как определено формой графика на фиг. 2, показывает улучшенный контроль инсулина у PAL1 и PAL2 относительно контрольного пищевого продукта. Это также отражается в значительно более низком пике инсулина через 30 мин у PAL2.

Наблюдалась очень значительная разница в площади под кривой для периода времени 0-120 мин для оценок сытости, которая сохранилась значительной до конца измерений через 180 мин.

Cordain предположил, что содержание белка в диетах Палеолита ответственно за эффект сытости, однако нет данных исследований пищевого продукта палеолита с высоким содержанием белка по сравнению с пищевым продуктом палеолита с низким содержанием белка, таких как PAL1 и PAL2, и похожесть данных обоих и данных PYY и результатов сытости, несмотря на более высокое содержание белка и большую калорийность PAL1, делает это предположение ошибочным. Это приводит авторов настоящего изобретения к выводу, что ключевым отличием является содержание флавоноидов.

Пример 2.

2.1. Получение пищевого продукта.

Контроль и PAL2 пищевые продукты получили, как указано выше. Был приготовлен ужин согласно приведенной выше табл. 3.

2.2. Organic extractions.

Были получены фракции пищевого продукта при использовании метода Tumbas et al. (Acta Periodica Technologica 35 265-273 (2004)). Кратко: образец прошедшего лиофильную сушку пищевого продукта измельчили при использовании пестика и ступки, 10 г добавили в 250 мл 70% (об./об.) водного метанола и хранили при комнатной температуре в течение 24 ч в атмосфере азота в темноте. Супернатант удалили и хранили при температуре -20°C в атмосфере азота в темноте. Экстракцию повторили при использовании дополнительных 250 мл водного метанола и скомбинировали супернатанты.

Метанол удалили из 20% экстракта при использовании вращательного испарения под вакуумом при температуре 40°C, остаточную воду удалили лиофильной сушкой. Прошедший лиофильную сушку экстракт хранили при температуре -20°C в атмосфере азота, он был промаркирован, как "водный экстракт метанола".

Метанол удалили из остальных 80% экстракта при использовании вращательного испарения под вакуумом при температуре 40°C и этот водный экстракт затем экстрагировали 2×10 мл объемами петролейного эфира (40-60°C), дихлорметаном, этилацетатом и 1-бутанолом. Органические экстракты высушили при температуре 40°C в потоке азота и прошедшие лиофильную сушку образцы маркировали соответствующим образом, хранение проводили при температуре -20°C в атмосфере азота.

Остаточный растворитель удалили из оставшейся не экстрагированной части при использовании вращательного испарения и водный раствор подвергли лиофильной сушке. Прошедший лиофильную сушку образец был промаркирован как "водный экстракт", его хранение проводили при температуре -20°C в атмосфере азота в темноте.

Количественный выход экстрактов материалов приведен в табл. 7.

Таблица 7
Экстракции растворителем контрольного и PAL2
пищевых продуктов и ужина, приведенного в табл. 3 по Jew et al.

Растворитель	Масса (мг)		
	Контроль	PAL 2	Jew
Водный метанол	284,6	1216,6	402,1
Петролейный эфир (40–60°C)	12,2	30,1	10,9
Дихлорметан	19,6	6,7	18,4
Этилацетат	3,1	8,5	32,0
1-Бутанол	28,9	141,5	40,3
Вода	1021,3	4291,3	1868,0

2.3. Содержание флавоноидов во фракциях.

Содержание флавоноидов во фракциях определяли при использовании метода Velioglu et al. (J. of Agricultural and Food Chem., 46, 4113-4117 (1998)). Хотя этот метод позволяет определить содержание фенольных смол в экстрактах, из-за того что не проводят подкисление, процедуры проводят при комнатной температуре, используют экстракцию водным метанолом, связанные полифенолы и высоко липофильные антиоксиданты не экстрагируются, и полученные показатели отражают содержание флавоноидов в пищевом продукте. Образцы повторно растворили в 70% водном метаноле при 1 мг·мл⁻¹ и 200 мкл добавили в 1,5 мл свежеполученного 10% водного реагента Фолина-Чокальтеу, смешали и выдержали при комнатной температуре точно 5 мин. Добавили 1,5 мл 6% (мас./об.) раствора бикарбоната натрия, смешали и выдержали при комнатной температуре 90 мин. Определение провели при поглощении волн 765 нм по сравнению с 0-0,3 мг·мл⁻¹ стандартов галловой кислоты в 70% водном метаноле и выразили как эквиваленты галловой кислоты.

Таблица 8
Содержание флавоноидов в экстрактах растворителей Контрольного и
PAL2 пищевых продуктов и ужина, приведенного в табл. 3 по Jew et al.

Образец	Растворитель	GAE (мг. пищевого продукта ⁻¹)	GAE (мг. 650 ккал пищевого продукта ⁻¹)
Контроль	Водный метанол	78	156
	Петролейный эфир	1	2
	(40–60°C)		
	Дихлорметан	4	7
	Этилацетат	2	3
	1-Бутанол	5	10
	Вода	48	95
PAL2	Водный метанол	658	1132
	Петролейный эфир (40–60°C)	14	24
	Дихлорметан	9	15
	Этилацетат	17	29
	1-Бутанол	145	249
	Вода	467	802
Jew	Водный метанол	641	404
	Петролейный эфир (40–60°C)	5	3
	Дихлорметан	9	5
	Этилацетат	31	19
	1-Бутанол	89	56
	Вода	500	315

2.4. Содержание флавоноидов в пищевых продуктах.

Образцы анализировали при использовании метода на основе Velioglu et al., Кратко: образец прошедшего лиофильную сушку пищевого продукта измельчили при использовании пестика и ступки, 2,5 г добавили в 25 мл 70% водного метанола и подвергли встряхиванию в укупоренных центрифужных пробирках в течение 2 ч при комнатной температуре. Суспензию центрифугировали при 13,000×G в течение 1 мин и удалили супернатант. Провели анализ 200 мкл каждой анализируемой фракции. Показатели выражали как количество на 650 ккал порцию пищевого продукта.

Таблица 9

Содержание флавоноидов в контрольном и PAL2 пищевых продуктах и ужине, приведенном в табл. 3 по Jew et al.

Пищевой продукт	GAE (мг. 650 ккал пищевого продукта ⁻¹)
Контроль	54,8
PAL1	504
PAL2	803
Jew	320

Таблица 10

Анализируемые уровни нутриентов нормализованного до 650 ккал на порцию контрольного, PAL1 и PAL2 пищевых продуктов и ужина, приведенного в табл. 3 по Jew et al.

Компонент	Анализ			
	Контроль	PAL1	PAL2	Jew
Пищевые волокна (г. 650 ккал пищевого продукта ¹⁾	6,4±1,2	20,9±2,0	26,0±7,4	10,1±7,8
Белок (г. 650 ккал пищевого продукта ¹⁾	23,3±1,8	51,8±2,9	29,1±2,1	65,5±1,1
Крахмал (г. 650 ккал пищевого продукта ¹⁾	74,0±7,8	<3,6	<4,0	<3,0
Лактоза (г. 650 ккал пищевого продукта ¹⁾	<0,2	<0,2	<0,2	<0,1
Флавоноиды (GAE. мг. 650 ккал пищевого продукта ¹⁾	54,8	504	803	320

2.5. GPCR.

Активация G-белок сопряженного рецептора (GPCR) продемонстрировала индуцирование секреции множества веществ в желудочно-кишечном тракте. В частности, Suzuki (Peptides, 25(10), 1803-8 (2004)) и Renuka (Neurochem. Res., 31 (3), 313-20 (2006)) указывают, что GPR14 и M1 и M3 мускариновые рецепторы вовлечены в контроль глюкозы крови через обе регуляции, и регуляцию инкретина, и регуляцию секреции гастроинтестинальных гормонов (PYY, GLP-1 и GIP), и усиление секреции инсулина, стимулированное глюкозой, предполагая, таким образом, что соединения, которые приводят к активации этих рецепторов будут интересны в качестве терапевтических агентов для диабетиков.

Провели коммерческий скрининг GPCR при участии EMD Millipore Corporation. Получили экстракты в DMSO и, в конечном счете, получили в EMD Millipore's GPCRProfiler® буфере для проведения анализа в концентрациях, которые были в три раза выше таковых конечных концентраций для проведения анализа. Аналогично, получили контроли растворителем и положительные контроли для гарантии, что все анализы провели при должном контроле. Все лунки получили при использовании EMD Millipore's GPCRProfiler® буфера для проведения анализа. GPCRProfiler® буфер для проведения анализа был модифицирован сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS), где HBSS был добавлен до содержания 20 mM HEPES и 2,5 mM Probenecid до pH 7,4. Исследование провели при использовании клеточной линии GPCR Millipore's stable Chemiscreen™, одобренной для работы в присутствии вплоть до 0,5% DMSO, чтобы минимизировать ответ на растворитель и максимизировать постоянство результатов.

Экстракты высевали дважды для каждой анализируемой концентрации. Стандартные контрольные агонисты (человеческий уротензин II для GPR14 и ацетилхолин для M1 и M3 мускариновых рецепторов) для каждого анализируемого GPCR были получены способом аналогичным для получения контролей для анализа. Контрольный агонист для каждого GPCR был введен в E_{max} (концентрация, при которой контрольный агонист вызывает максимальный ответ). Анализ на агонист провели при использовании устройства FLIPRTETRA, где тестируемые экстракты, контроли с растворителем и E_{max} контрольного агониста добавили в аналитические планшеты после установления флуоресцентного базового уровня. Анализ на агонист был полностью проведен за 180 с и был использован для оценки способности каждого экстракта активировать GPR14, M1 и M3 мускариновых рецепторов. Как только закончили анализ на агонист, используемые аналитические планшеты сразу же удалили из устройства FLIPRTETRA и инкубировали при температуре 25°C в течение 2 мин.

Все данные, полученные при использовании аналитического планшета, подвергли коррекции по соответствующим базовым уровням. После коррекции по базовым уровням выделили показатели максимальной флуоресценции и провели обработку данных для расчета процента активации (относительно E_{max} контрольного агониста и показателей контроля с растворителем) и рассчитали дополнительные статистические показатели (т.е. Z, процент варьирования между данными показателей повторов) для оценки качества каждой пластины. При отклонении данных аналитических планшетов, используемых для проведения анализа, провели дополнительные эксперименты.

На фиг. 8 приведена активация рецептора GPR14 экстрактами контрольного ужина, PAL2 ужина и Jew et al. ужина, выраженная в процентах относительно активации концентрации EC_{80} контрольного агониста (40 мкг/мл водного экстракта метанола, 8 мкг/мл экстракта петролейного эфира, 8 мкг/мл экстракта дихлорметана, 4 мкг/мл экстракта этилацетата, 40 мкг/мл экстракта 1-бутанола и 40 мкг/мл водного экстракта). Видно, что экстракты водного метанола, петролейного эфира и дихлорметана PAL2 ужина показали значительно большую активность агониста GPR14 рецептора по сравнению с теми же экстрактами контрольного ужина и Jew et al. ужина. Экстракты этилацетатом и 1-бутанолом PAL2 и Jew et al. ужина продемонстрировали сравнимую активность агониста GPR14 рецептора и были более сильными по сравнению с Контрольным ужином. Только водный экстракт Jew et al. ужина демонстрирует большую активность агониста, чем экстракт PAL2.

На фиг. 9 приведена активация M1 мускаринового рецептора экстрактами контрольного ужина, PAL2 ужина и Jew et al. ужина, выраженная в процентах относительно активации концентрации EC_{80} контрольного агониста (40 мкг/мл водного экстракта метанола, 8 мкг/мл экстракта петролейного эфира, 8 мкг/мл экстракта дихлорметана, 4 мкг/мл экстракта этилацетата, 40 мкг/мл экстракта 1-бутанола и 40 мкг/мл водного экстракта). Видно, что все экстракты PAL2 имеют более высокую активность агониста, чем экстракты Jew et al. ужина за исключением экстракта дихлорметана, в котором сравнима активность агониста M1 мускаринового рецептора.

На фиг. 10 приведена активация M3 мускаринового рецептора экстрактами контрольного ужина, PAL2 ужина и Jew et al. ужина, выраженная в процентах относительно активации концентрации EC_{80} контрольного агониста (40 мкг/мл водного экстракта метанола, 8 мкг/мл экстракта петролейного эфира, 8 мкг/мл экстракта дихлорметана, 4 мкг/мл экстракта этилацетата, 40 мкг/мл экстракта 1-бутанола и 40 мкг/мл водного экстракта). Видно, что все экстракты PAL2 имеют более высокую активность агониста M3 мускаринового рецептора по сравнению с экстрактами Jew et al. ужина. Также PAL2 продемонстрировал более высокую активность M3 мускаринового рецептора по сравнению с экстрактами Контрольного пищевого продукта во всех экстрактах за исключением водного экстракта метанола.

2.6. Ингибирование транспорта глюкозы.

2.6.1. Рутинные клеточные культуры.

Клетки эпителиальной колоректальной аденокарциномы человека (Caco-2) получили из американской коллекции типовых клеточных культур (American Type Culture Collection) (ATCC) и культивировали в ростовой среде, состоявшей из среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко (содержащей Glutamax-1, 4,5 г/л D-глюкозы и 25 мМ 4-(2-гидроксигидил)-1-пиперазин этиансульфокислоты (Herpes) (Invitrogen)), 10% фетальной телячьей сыворотки (Sigma), 1% заменимых аминокислот (Invitrogen) и 1 мМ пирувата натрия (Sigma)). Клетки пересевали рутинным способом при около 80% слиянии при использовании TrypLE™ Express стабильного трипсин-подобного фермента (Invitrogen) для отседенения клеток и высевали около 114 клеток/мм² в колбу со свежей тканевой культурой. Для экспериментов использовали пересеваемые клетки под номерами 45 и 49.

2.6.2. Получение дифференцированного монослоя клеток Caco-2.

Corning® HTS Transwell® 96 вставки для лунок из проницаемых подложек (Sigma), покрытые коллагеном 40 мкл 50 г/мл коллагена из крысиного хвоста I типа (BD Biosciences), выдерживали в 0,02 М уксусной кислоты в течение одного часа при комнатной температуре в стерильных условиях. Вставки промыли дважды фосфатным соляным буфером (PBS (Invitrogen)) и высевали во вставки клетки Caco-2 при $9,6 \times 10^5$ клеток/мл (75 мкл на вставку) в ростовую среду и добавили 30 мл ростовой среды в питающий нижний планшет. Клетки оставили для закрепления на коллагеновой матрице и для формирования

монослоя в течение 48 ч при температуре 37°C, 5% CO₂. Оба, вставки и питающий планшет, промыли в PBS и инкубировали клетки в BD Entero-STIM™ дифференциальной среде для энтероцитов, содержащей раствор заменителя сыворотки MITO+™ (оба BD Biosciences), 75 мкл на вставку и 30 мл в питающий планшет на следующие 48 ч при температуре 37°C, 5% CO₂.

2.6.3. Анализ ингибиования транспорта глюкозы.

Монослои дифференцированных клеток осторожно промыли в соляном фосфатном буфере Дульбекко, содержащем CaCl₂ и MgCl₂ (PBS(+)) (Invitrogen) и вставки поместили в новый коллекторный планшет Corning® HTS Transwell®-96 (Sigma). Клетки инкубировали свежим PBS(+) (75 мкл на вставку и 225 мкл/лунку) в течение 60 мин при температуре 37°C, 5% CO₂. PBS(+) осторожно удалили отсасыванием и заменили 75 мкл на вставку 5 мМ D-глюкозы (Sigma) ± трехкратный повтор активной пробы и в каждую лунку быстро добавили 225 мкл/лунку PBS(+). Лунки с 5 мМ глюкозы инкубировали при температуре 37°C, 5% CO₂ в течение 15 мин. Вставки с клетками переместили в новый коллекторный планшет, осторожно удалили отсасыванием супернатант клеток и заменили 100 мкл 100 мкМ раствора Lucifer Yellow (Sigma) для подтверждения целостности монослоев. 225 мкл PBS(+) добавили в каждую лунку и инкубировали при температуре 37°C, 5% CO₂ в течение 1 ч. Затем вставки с клетками удалили и провели проницаемость мембран при использовании Lucifer Yellow, измерив флуоресценцию образцов при 485 нм (возбуждение) и 530 нм (эмиссия) с использованием считывающего устройства для микропланшетов Spectramax Gemini EM для измерения параметров флуоресценции.

2.6.4. Анализ на глюкозу.

Количество глюкозы, транспортированное в монослои клеток, измерили при использовании анализа на глюкозу на основе набора для проведения анализа глюкоза/глюкозоксидаза Invitrogen's Amplex Red. Коротко: 50 мкл каждого тестируемого образца поместили в 96-луночный планшете с черными стенками/прозрачным дном (Greiner Bio-One), в который добавили 100 мкл рабочего буферного раствора (0,5 мкл 10 мМ Ampliflu Red, 1 мкл 10 Ед/мл пероксидазы хрена, 1 мкл 100 Ед/мл глюкозоксидазы и 97,5 мкл PBS (все Sigma)). После 10 мин инкубирования при комнатной температуре измеряли флуоресценцию образцов при 530 нм (возбуждение) и 590 нм (эмиссия) при использовании считывающего устройства для микропланшетов Spectramax Gemini EM для измерения параметров флуоресценции и экстраполировали концентрации глюкозы по стандартной кривой.

2.6.5. Результаты.

На фиг. 11 приведено ингибиование транспорта глюкозы дихлорметановыми экстрактами (75 мкг/мл) контрольного ужина, PAL2 ужина и Jew et al. ужина, выраженные в процентах относительно контроля с растворителем, и в табл. 11 приведены результаты ингибиования транспорта глюкозы экстрактами водного метанола, петролейного эфира, дихлорметана и 1-бутанола Контрольного ужина, PAL2 и Jew et al. ужина (все 75 мкг/мл), выраженные как проценты относительно контроля с растворителем. Экстракты получили, как указано выше.

Таблица 11

Результаты ингибиования транспорта глюкозы экстрактами водного метанола, петролейного эфира, дихлорметана и 1-бутанола контрольного ужина, PAL2 и Jew et al. ужина (все 75 мкг/мл), выраженные как проценты относительно контроля с растворителем

Экстракт	Пищевой продукт	Ингибиование транспорта глюкозы (% контроля)
Водный метанол	Контроль	-2,77% (±0,60%)
	PAL2	4,77% (±3,63%)
	Jew et al.	(±4,07%)
Петролейный эфир (40–60°C)	Контроль	0,35% (±3,52%)
	PAL2	0,05% (±3,26%)
	Jew et al.	-4,25% (±5,55%)
Дихлорметан	Контроль	-3,10% (±2,71%)
	PAL2	8,79% (±1,45%)
	Jew et al.	0,48% (±1,78%)
1-Бутанол	Контроль	-3,23% (±1,26%)
	PAL2	0,39% (±2,46%)
	Jew et al.	-0,99% (±0,87%)

Видно, что экстракт дихлорметана PAL2 пищевого продукта демонстрирует ингибиование транспорта глюкозы (8,8%). Напротив, ни один из экстрактов ни дихлорметана Контрольного ужина и ни Jew et al. ужина, и не оказывает значительное ингибиование активности транспорта глюкозы (-3,0 и 0,5%

соответственно).

2.7. Заключение.

Экстракты PAL2 пищевого продукта и Jew et al. ужина обладают отличающейся активацией GPCR кишечных транспортеров глюкозы. Фракции PAL2 и Jew et al. ужина, экстрагированные этилацетатом, продемонстрировали сравнимую активность к GPR14, при этом экстракты водного этанола, петролейного эфира и дихлорметана PAL2 пищевого продукта показали активность агониста GPR14, эти же фракции Jew et al. не показали положительной активации рецептора GPR14. В противоположность, водные экстракты PAL2 пищевого продукта не активировали GPR14, в то время как водные экстракты Jew et al. продемонстрировали активность агониста. Дополнительно, все экстракты PAL2 пищевого продукта, исключая фракцию, экстрагированную дихлорметаном, показали значительно более высокую активность агониста M1 и M3 мускариновых рецепторов по сравнению с экстрактами Jew et al. пищевого продукта. Дополнительно, при анализе ингибиции активности транспортера глюкозы в кишечнике экстракты дихлорметана PAL2 пищевого продукта продемонстрировали значительное ингибицию, в то время как экстракт дихлорметана Jew et al. пищевого продукта незначительно ингибировали транспортеры глюкозы в кишечнике. Взятые вместе, эти данные демонстрируют дифференцированное физиологическое воздействие PAL2 пищевого продукта и Jew et al. пищевого продукта. Поскольку известно, что GPCR секретируют гастроинтестинальные гормоны, включая PYY, GLP-1 и GIP, не желая быть ограниченными какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения считают, что повышенное количество и различные типы флавоноидов в пищевом продукте по настоящему изобретению могут отвечать за различие в выделении гастроинтестинальных гормонов, как показано на фиг. 4-6.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Набор продуктов для полного завтрака, обеда и ужина, исключая напитки, содержащий:

- (a) 250-650 килокалорий (1045-4180 кДж);
- (b) 10-50 г пищевых волокон;
- (c) 10-50 г белка;
- (d) до 5 г крахмала;
- (e) до 2 г лактозы;
- (f) 20-250 мг любого агликона флавоноидов;
- (g) 30-250 мг любого глюкозида флавоноидов,

где набор содержит в сумме 75-1000 мг агликонов флавоноидов и глюкозидов флавоноидов.

2. Набор продуктов для полного завтрака, обеда и ужина, исключая напитки, нормализованный до калорийности 650 килокалорий, содержащий:

- (a) 10-50 г пищевых волокон;
- (b) 10-50 г белка;
- (c) до 5 г крахмала;
- (d) до 2 г лактозы;

(e) 450-2000 мг в сумме агликонов флавоноидов и глюкозидов флавоноидов, выраженных в эквивалентах галловой кислоты (GAE).

3. Набор по п.1 или 2, где агликон флавоноида содержит по меньшей мере 0,05 мг по меньшей мере одного антоцианидина.

4. Набор по п.3, где агликон флавоноида содержит по меньшей мере 0,25 мг по меньшей мере одного антоцианидина.

5. Набор по п.4, где агликон флавоноида содержит по меньшей мере 0,5 мг по меньшей мере одного антоцианидина.

6. Набор по любому из предшествующих пунктов, в котором глюкозиды флавоноидов содержат любое соединение из группы, состоящей из апигенина, лютеолина, мирицетина, кверцетина, цианидин-3-глюкозида, малвидин-3-глюкозида, пеларгонидин-3-глюкозида и их смесей.

7. Набор по любому из предшествующих пунктов, энергетическая ценность которого составляет 0,25-1 килокалорий.

8. Набор по любому из предшествующих пунктов, энергетическая ценность которого составляет 0,35-0,85 килокалорий.

9. Набор по любому из предшествующих пунктов, содержащий 20-50 г пищевых волокон, 10-30 г белка, менее 3 г крахмала и до 0,5 г лактозы.

10. Набор по п.1, содержащий 30-250 мг любого агликона флавоноида и 40-250 мг любого глюкозида флавоноида.

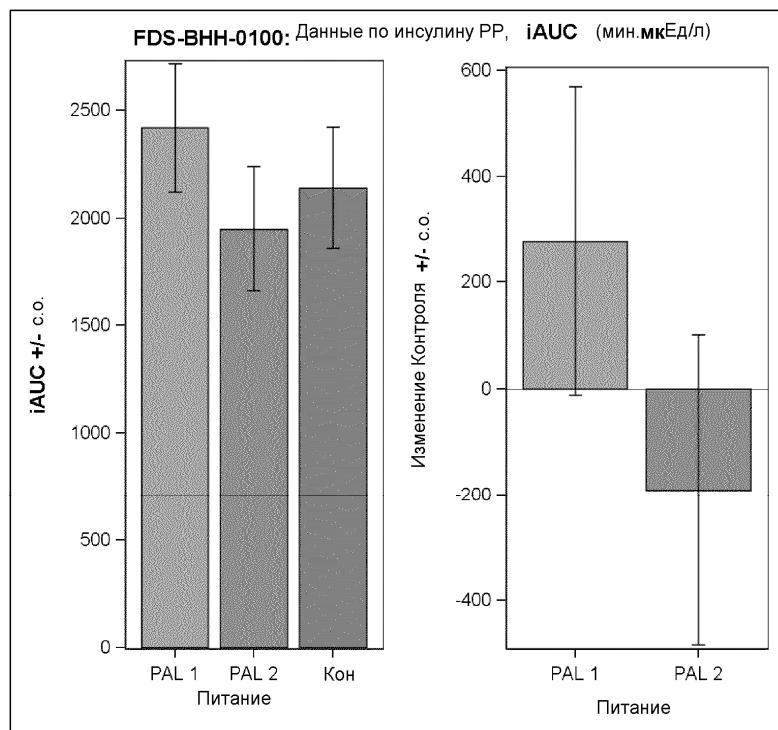
11. Набор по п.2, содержащий 500-1500 мг агликонов флавоноидов и глюкозидов флавоноидов, выраженных в эквивалентах галловой кислоты (GAE).

12. Применение набора по любому из пп.1-11 в качестве лекарственного средства для предупреждения или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа и ожирения и для контроля и снижения веса.

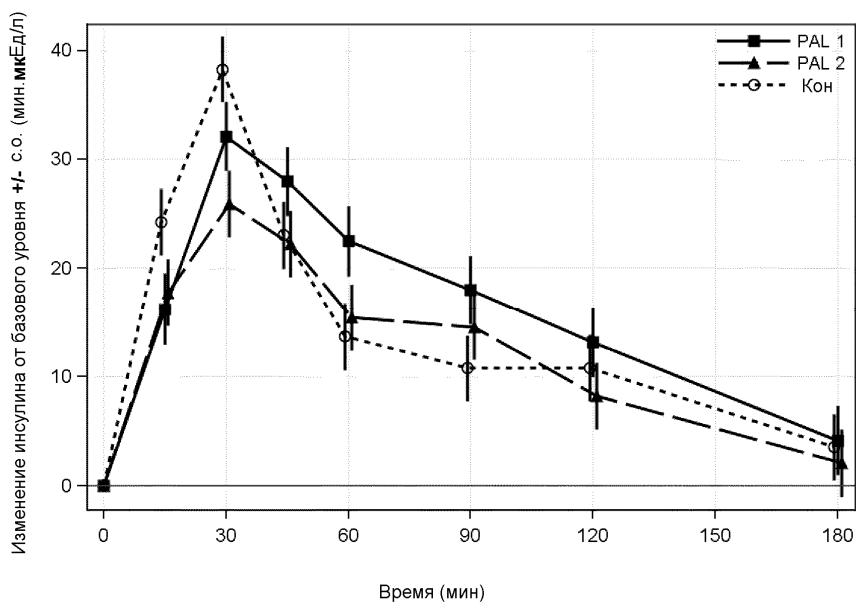
13. Применение набора по любому из пп.1-11 для предупреждения или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа и ожирения и для контроля и снижения веса.

14. Применение набора по любому из пп.1-11 для изготовления лекарственного средства для предупреждения или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа и ожирения и для контроля и снижения веса.

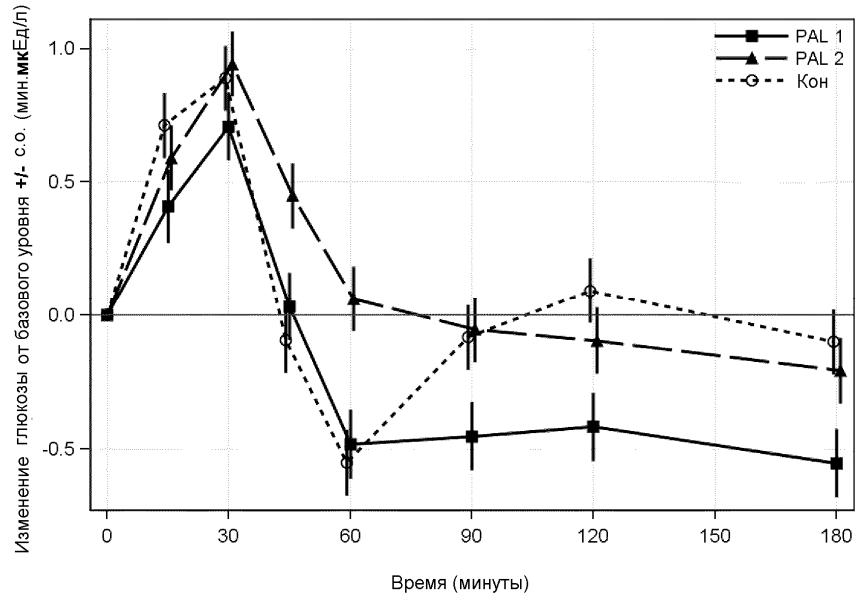
15. Способ предупреждения или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа и ожирения и контроля веса и снижения веса, включающий стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, набора по любому из пп.1-11.



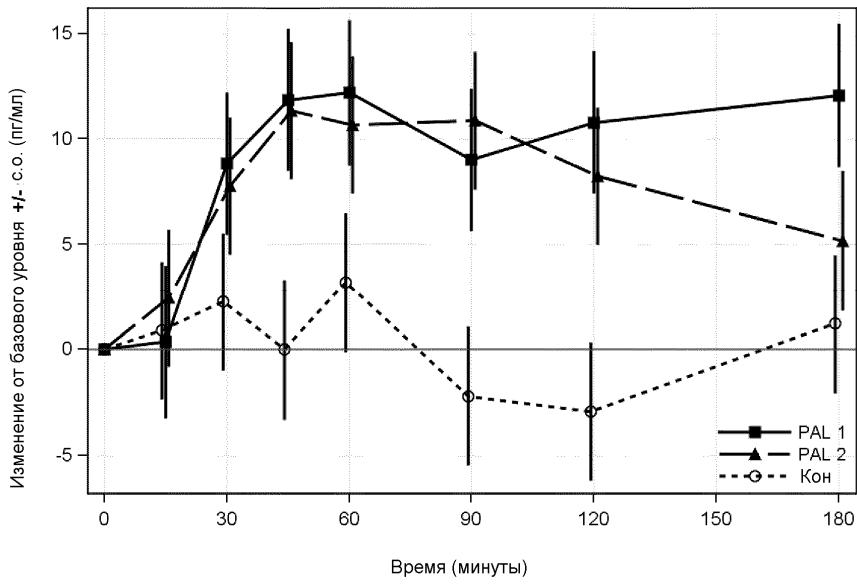
Фиг. 1



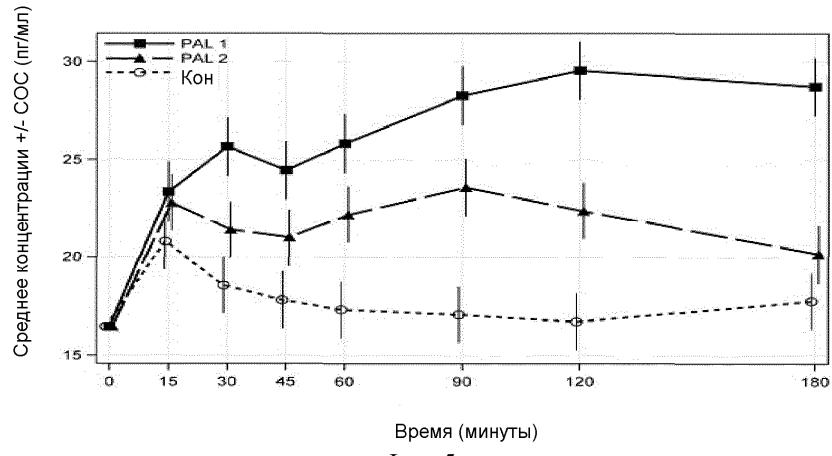
Фиг. 2



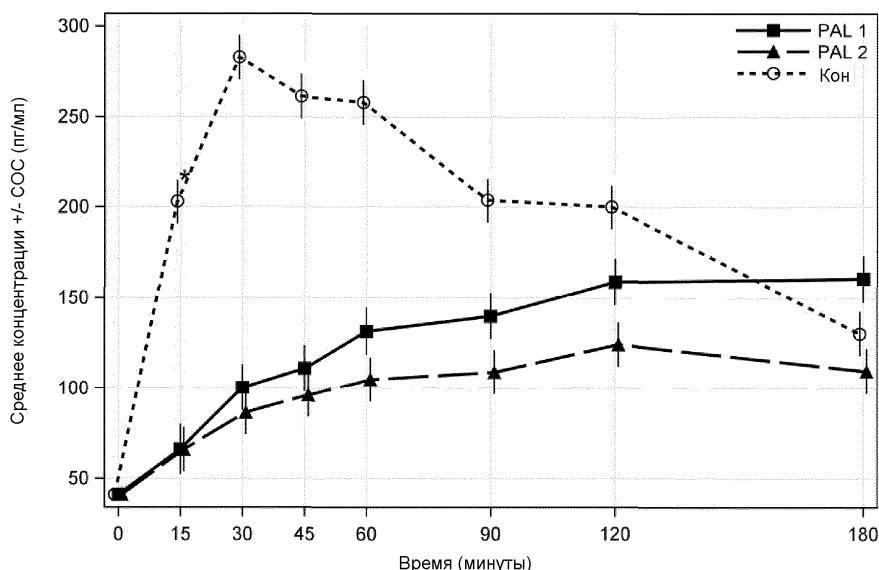
Фиг. 3



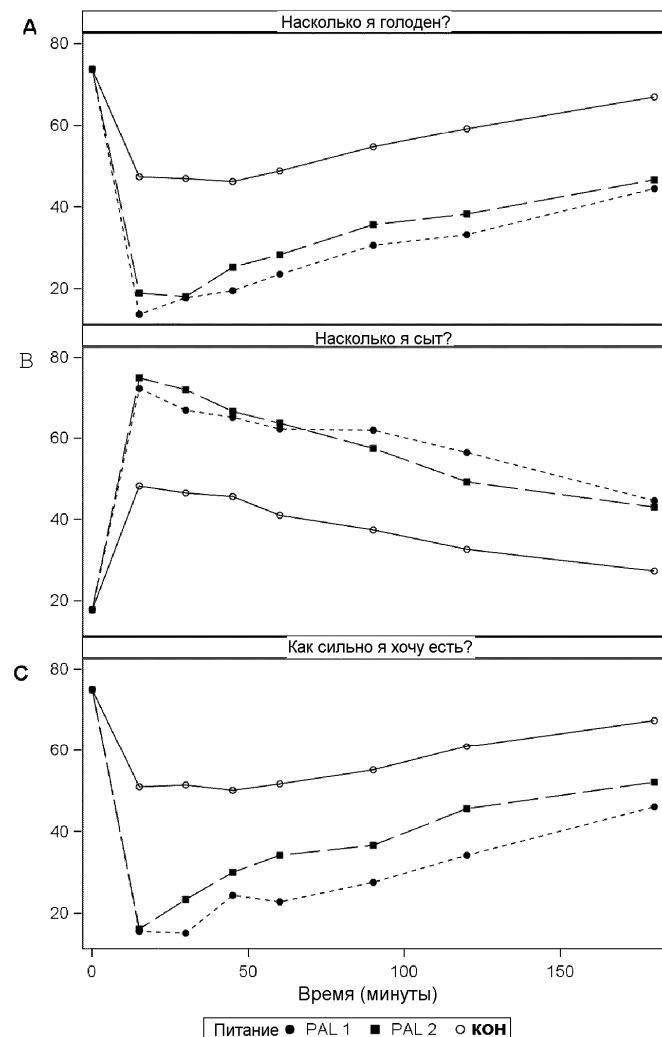
Фиг. 4



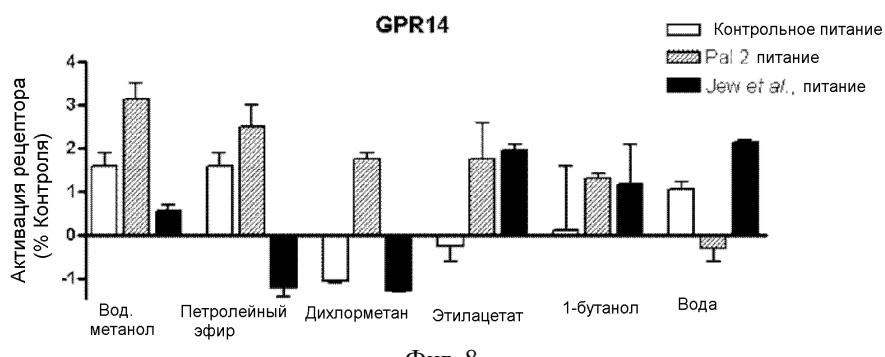
Фиг. 5



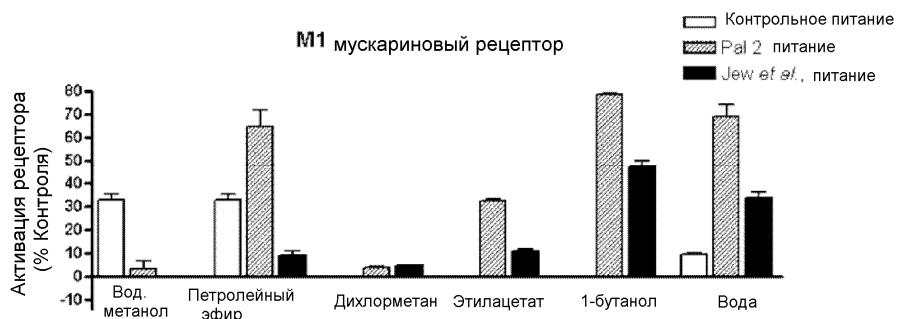
Фиг. 6



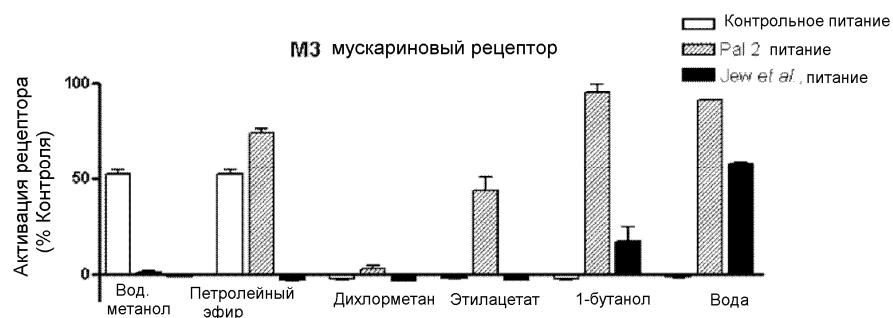
Фиг. 7



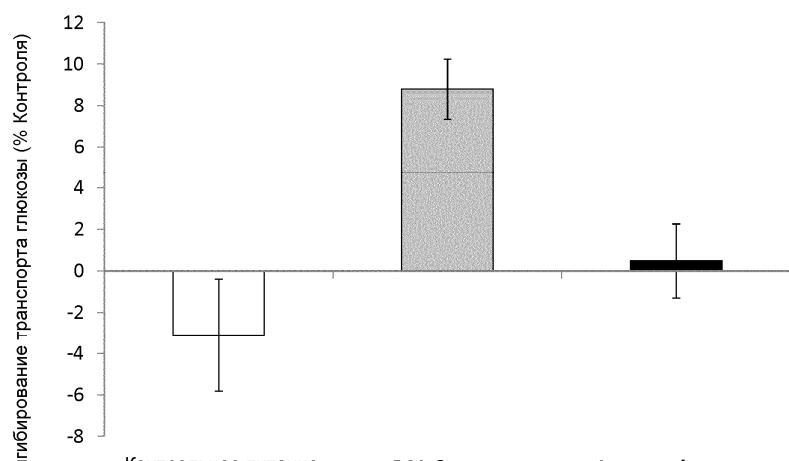
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2