

ПРИМЕНЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ МЕТОДОВ БИМОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Федулова Л.В.,* Василевская Е.Р., Котенкова Е.А., Кашинова Э.Б.

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

мясные продукты, культуры клеток, *in vitro*, биологическая активность

В статье рассмотрены основные принципы методов *in vitro*, проанализированы применяемые культуры клеток и тканей, используемые для оценки токсичности и специфической биологической активности, включая исследования метаболических процессов, анализ гипотензивных и цитопротективных свойств, антиоксидантной активности (*in vitro* и *ex vivo*), используемые для оценки функциональных свойств ингредиентов на основе сырья животного происхождения, а также мясных продуктов.

Review paper

ALTERNATIVE METHODS OF BIOMODELING FOR FUNCTIONAL FOOD PRODUCTS EFFECTIVENESS RESEARCH

Liliya V. Fedulova*, Ekaterina R. Vasilevskaya, Elena A. Kotenkova, Elta B. Kashinova

V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

meat products, cell cultures, *in vitro*, biological activity.

The article describes *in vitro* methods basic principles, authors analyzed cell and tissue cultures used to assess toxicity and specific biological activity, including metabolic processes, include antihypertensive and cytoprotective properties analysis, antioxidant activity (*in vitro* and *ex vivo*) used to study ingredients functional properties based on animal origin raw materials, as well as meat products.

1. Введение

Биомоделирование является неотъемлемой частью научных изысканий и мощнейшим инструментом анализа при проведении медико-биологических исследований.

В настоящий момент принята классификация биомоделей, в соответствии с которой лабораторных животных относят к моделям первого порядка, ко второму порядку относят различные альтернативные модели — культуры клеток, простейшие, гидробионты, бактерии, ферменты, аминокислоты и так далее, третий порядок составляют математические модели, описывающие различные биологические процессы, модели четвертого и более высоких порядков используются для описания взаимодействия электронов, атомов, квантово-химических, микроволновых процессов и прочее [1].

За последние годы наблюдается всеобщая тенденция к сокращению количества исследований *in vivo* и замещению лабораторных животных альтернативными биомоделями, за счет широкого распространения и внедрения в практику методов биологических исследований *in vitro*. Так называемые методы *in vitro*, дословно — «в пробирке» являются весьма популярными благодаря относительной дешевизне, получения достоверных и достаточных по объему экспериментальных данных. Использование данных методов в биомедицине позволяет изучить ключевой фармакологический эффект веществ, а также механизм действия. Однако эти модели требуют постоянного уточнения и совершенствования по мере развития науки и техники, с нахождением компромисса между технологической сложностью и биологическим значением. Именно поэтому много усилий тратится на поиск технологических инноваций для улучшения моделей в пробирке. Сегод-

ня методы *in vitro* широко используются для прогнозирования токсичности и оценки действия лекарственных средств, субстанций и отдельных биологически активных веществ.

2. Основная часть

Современные методы *in vitro* направлены на изучение клеточных и молекулярных механизмов действия веществ на мишени (рецепторы, клеточные компоненты, структурные белки, специфические ферменты, гены, факторы транскрипции и пр.), которые не могут быть прослежены в опытах на животных. При этом эксперименты с использованием позвоночных животных не могут быть полностью исключены ввиду невозможности получения фармакокинетических данных, влияния на межклеточное взаимодействие, регуляторные процессы. Таким образом, использование методов *in vitro* как нельзя лучше подходит для изучения низкомолекулярных соединений, в том числе белковой природы, механизм действия которых заключается в каскаде процессов, реализуемых на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях организации живой материи [2].

Сегодня бурное развитие получили биологические исследования *in vitro* с использованием культур клеток в качестве объектов исследования. В основном они направлены на изучение цитотоксичности и биодоступности, а также оценку механизмов биологического действия, например, антиоксидантного, иммуномодулирующего, гипогликемизирующего и других.

Культуры клеток лишены структурной организации, теряют характерную гистиотипическую архитектуру и связанные с ней биохимические признаки и обычно не достигают

равновесного состояния при отсутствии специальных условий. Клетки в культурах размножаются, что обеспечивает получение большой массы клеток, затем их идентифицируют (по фенотипическим признакам, путем выращивания в селективной среде, генотипически), разделяют на идентичные параллели и, если это необходимо, сохраняют. Динамические свойства культивируемых клеток часто трудно контролировать, также трудно реконструировать *in vitro* некоторые клеточные взаимодействия, наблюдаемые *in vivo*, в связи с чем в зависимости от цели необходимо использовать клеточные системы, сохраняющие структурную целостность исходной ткани (*ex vivo*).

Список используемых культур клеток достаточно разнообразен — это элементы соединительной ткани человека (фибробласты), скелетные ткани (кость и хрящи), скелетные, сердечные и гладкие мышцы, эпителиальные ткани (печень, легкие, почки и др.), клетки нервной системы, эндокринные клетки (надпочечников, гипофиза, клетки островков Лангерганса), меланоциты и опухолевые клетки.

В качестве мишеней при исследовании клеточной токсичности зачастую используют как первичные культуры клеток, выделенные из организма животных или человека (например, гепатоциты, эпителиоциты, кератиноциты, хондроциты, клетки крови и по.), так и перевиваемых или постоянных, полученных из отдельных видов опухолей (гепатома (Нер G2), лейкозные лейкоциты (HL-60), раковые клетки легких (A-549), нейробластома (NB-1), остеосаркома (Mg-63); фибробласты мышей (L929, BALB, 3T3), нейробластома мышей (Нейрон-2a) и опухоль Эрлиха мышей; гепатома крыс (НТС); клетки почек быка (MDBK)) [3,4,5]. Отдельно стоит отметить, что для оценки тканевой токсичности, например, раздражающего действия, фототоксичности, исследования абсорбции вещества через кожу и барьерной функции, используются срезы тканей и реконструированные модели, имитирующие ткани *in vitro*. Разработка таких барьерных систем организма является одним из самых сложных направлений в создании альтернативных моделей. На сегодняшний день существуют модели, позволяющие воспроизводить события, происходящие в условиях эпителиальных и интерстициальных барьеров [6]. Причем, при разработке последнего наиболее широкое применение нашли модели процессов абсорбции с использованием клеточных линий HT-29 и Caco-2. Нельзя не отметить разработку модели глаза для изучения раздражающего действия различных химических веществ [7] и модель гематоэнцефалического барьера [8], что является весьма актуальной проблемой в условиях повсеместной гуманизации исследований.

Моделирование процессов, происходящих при воздействии цитотоксических агентов на культивируемые клетки человека и млекопитающих (энтероциты кишечника, гепатоциты печени, эпителий почек, клетки иммунной системы и т.д.) также проводят для оценки цитопротективных свойств различных соединений [9].

Отдельно стоит остановиться на моделях пассивного транспорта через эпителий кишечника *in vitro*, которые можно применять для изучения биодоступности биоактивных веществ. С этой целью в качестве модели широко применяется линия Caco-2 — культура клеток колоректальной аденокарциномы человека, их популярность можно объяснить тем, что данные клетки обладают характеристиками дифференцированных эпителиальных клеток кишечника и хорошо воспроизводят большое количество их свойств [10,11].

В качестве традиционных моделей для изучения иммуномодулирующих свойств *in vitro* применяют иммунные

клетки периферической крови человека и млекопитающих, фаворитами среди которых являются одноядерные макрофаги [12]. Исследование заключается в оценке экспрессии иммунных факторов (например, цитокинов) или активации естественных киллеров (CD56+), Т-лимфоцитов (CD3+), цитотоксических Т-клеток (CD8+ CD4+ Т-клеток) при культивировании таких клеток в присутствии исследуемого вещества. Стоит отметить, что использование культуральных тест-систем для оценки иммуномодулирующего действия БАВ позволяет выявлять действие на отдельные пути иммунного ответа. Однако стоит учитывать, что иммунный ответ, являясь сложным многокомпонентным процессом, обеспечивается функционированием разнообразных иммунокомпетентных клеток с вовлечением целого каскада цитокинов с обратными связями, поэтому этот анализ результатов данных исследований необходимо проводить во взаимосвязи с результатами исследований *in vivo*.

Среди известных способов анализа антиоксидантной активности различных соединений можно отметить методику определения антиоксидантной емкости по катион-радикалу ABTS [13], а также Alamar Blue-анализ, ключевым моментом которого является определение окислительно-восстановительного потенциала клеток [14]. В рассматриваемых методах для определения антиоксидантной активности соединений применяют общую стратегию, которая заключается в инкубации клеток в присутствии потенциального антиоксидантного агента, дальнейшее воздействие инициатора свободно-радикального окисления и методику для оценки активности радикалов в клетке [15].

Для оценки гипотензивных свойств пищевых компонентов разработаны различные *in vitro* модели, основанные на спектрофотометрии, флуориметрии, высокоразрешающей жидкостной хроматографии (HPLC), радиохимических или электрофоретических методах. Многие из них ориентированы на определение способности пищевых компонентов и продуктов, в том числе мясных, оказывать ингибирующее влияние на ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), который по современным представлениям играет ключевую роль в патогенезе основных форм гипертонической болезни [16]. Несмотря на многообразие *in vitro* методов определения АПФ-ингибирующей активности, в их методологии отмечаются сходные этапы. Ключевой реакцией при определении АПФ-ингибирующей активности является реакция трансформации субстрата в побочный продукт, катализируемой собственно АПФ. В дальнейшем убыль субстрата определяют различными методами. При этом наличие АПФ-ингибитора отмечается как частичное или полное ингибирование реакции трансформации субстрата под действием АПФ.

Таким образом, существующее разнообразие методов *in vitro* позволяет изучить широкий спектр биологических эффектов различных агентов, в том числе функциональных и специализированных продуктов питания и их ингредиентов.

3. Заключение

Современная тенденция к использованию альтернативных методов биомоделирования *in vitro* привела не только к их широкому применению в фарминдустрии для прогнозирования токсичности и оценки фармакологического действия лекарственных средств, но и в пищевой отрасли, особенно в связи с разработкой и внедрением в производство функциональных и специализированных (дието-терапевтических и диетопрофилактических) продуктов, ингредиентов и модулей, а также биологически активных веществ и добавок.

1. Introduction

Biomodeling is an integral part of scientific research and a powerful tool for analysis in biomedical research.

At the moment, a classification of biomodels has been adopted, according to which laboratory animals are referred to models of the first order, various alternative models are referred to the second order — cell cultures, primitive, hydrobionts, bacteria, enzymes, amino acids, and so on, the third order consists of mathematical models describing various biological processes, models of the fourth and higher orders are used to describe the interaction of electrons, atoms, quantum chemical, microwave processes, and so on [1]. In recent years there has been a general trend to reduce the number of studies *in vivo* and replacement of laboratory animals with alternative biomodels, due to the wide dissemination and implementation of methods of biological research *in vitro*. The so — called methods *in vitro*, literally — «*in the tube*» are very popular due to the relative cheapness, obtaining reliable and sufficient experimental data. The use of these methods in biomedicine allows to study the key pharmacological effect of substances, as well as the mechanism of action. However, these models require constant refinement and improvement as science and technology evolve, with a trade-off between technological complexity and biological significance. That is why a lot of effort is spent on finding technological innovations to improve the models in the test tube. Today *in vitro* methods are widely used to predict toxicity and evaluate the action of drugs, substances and certain biologically active substances.

2. Main part

Modern methods *in vitro* are aimed at the study of cellular and molecular mechanisms of action of substances on the target (receptors, cellular components, structural proteins, specific enzymes, genes, transcription factors, etc.), which cannot be traced in animal experiments. Same time experiments with the use of vertebrate animals cannot be completely excluded due to the impossibility of obtaining pharmacokinetic data, the influence on intercellular interaction, regulatory processes. Thus, the use of *in vitro* methods is best suited for the study of low-molecular compounds, including protein nature, the mechanism of action of which is a cascade of processes implemented at the molecular, cellular and tissue levels of the organization of living matter [2].

Today biological research *in vitro* using cell cultures as objects of research has developed rapidly. They are mainly aimed at studying cytotoxicity and bioavailability, as well as assessing the mechanisms of biological action, such as antioxidant, immunomodulatory, hypoglycemic and others.

Cell cultures are devoid of structural organization, lose their characteristic histiotypic architecture and related biochemical characteristics and usually do not reach equilibrium in the absence of special conditions. Cells in cultures multiply, which provides a large mass of cells, then they are identified (by phenotypic characteristics, by growing in a selective environment, genotypically), divided into identical parallels and, if necessary, retain. The dynamic properties of cultured cells are often difficult to control, it is also difficult to reconstruct *in vitro* some cellular interactions observed *in vivo*, and therefore, depending on the purpose, it is necessary to use cellular systems that preserve the structural integrity of the original tissue (*ex vivo*).

The list of used cell cultures is quite diverse — these are elements of human connective tissue (fibroblasts), skeletal tissue (bone and cartilage), skeletal, cardiac and smooth muscles, epithelial tissues (liver, lungs, kidneys, etc.), cells of the nervous system, endocrine cells (adrenal glands, pituitary, langerhans cells), melanocytes and tumor cells.

As targets in the study of cell toxicity is often used as primary cell cultures isolated from the body of animals or humans (eg,

hepatocytes, epithelial cells, keratinocytes, chondrocytes, blood cells and po.), and transplanted or permanent, is obtained from certain types of tumors (hepatoma (Hep G2), leukemic leukocytes (HL-60), lung cancer cells (A-549), neuroblastoma (NB-1), osteosarcoma (Mg-63); the fibroblasts of mice (L929, BALB, and 3T3), neuroblastoma mice (Neuron-2A) and Ehrlich tumor of mice; rat hepatoma (HTC); the kidney cells of a bull (MDBK)) [3,4,5]. Separately, it should be noted that for the assessment of tissue toxicity, for example, irritant action, phototoxicity, studies of absorption of the substance through the skin and barrier function, tissue sections and reconstructed models simulating tissues *in vitro* are used. The development of such barrier systems of the body is one of the most difficult areas in the creation of alternative models. For today, there are models that allow to reproduce the events occurring in the conditions of epithelial and interstitial barriers [6]. Moreover, in the development of the latter, the most widely used models of absorption processes using cell lines HT-29 and CACO-2. It should be noted the development of an eye model to study the irritant effect of various chemicals [7] and a model of the blood-brain barrier [8], which is a very urgent problem in the conditions of widespread humanization of research.

Simulation of processes, occurring under the influence of cytotoxic agents on cultured human and mammalian cells (enterocytes of the intestine, hepatocytes of the liver, kidney epithelium, immune cells, etc.) are also carried out to evaluate the cytoprotective properties of various compounds [9].

We should also focus on models of passive transport through the intestinal epithelium *in vitro*, which can be used to study the bioavailability of bioactive substances. With this goal as a model is widely used line Caco-2 — cell culture colonrectal adenocarcinoma of the person, their popularity can be explained by the fact that these cells have characteristics of differentiated epithelial cells of the intestine and reproduce well a large number of their properties [10,11].

Peripheral blood immune cells of human and mammalian are used as traditional models for the study of immunomodulatory properties *in vitro*, the favorites among which are mononuclear macrophages [12]. The study is to evaluate the expression of immune factors (e.g. cytokines) or the activation of natural killer cells (CD56+), t-lymphocytes (CD3+), cytotoxic t-cells (CD8+) CD4+ t-cells) in the cultivation of such cells in the presence of the test substance. It should be noted that the use of cultural test systems for the evaluation of immunomodulatory effects of BAS allows to identify the effect on the individual pathways of the immune response. However, it should be taken into account that the immune response, being a complex multicomponent process, is provided by the functioning of a variety of immunocompetent cells involving a cascade of cytokines with feedbacks, so this analysis of the results of these studies should be carried out in conjunction with the results of studies *in vivo*.

Among the known methods of analysis of antioxidant activity of various compounds it is possible to note the method of determining the antioxidant capacity of the cation radical ABTS [13], as well as the Alamar Blue-analysis, the key point of which is to determine the redox potential of cells [14]. In the considered methods for determining the antioxidant activity of compounds, a general strategy is used, which consists in cells incubation in the presence of a potential antioxidant agent, further free-radical oxidation initiator action and radicals activity determination in the cell [15].

Different *in vitro* models based on spectrophotometry, fluorometry, high-resolution liquid chromatography (HPLC), radiochemical or electrophoretic methods have been developed to evaluate the hypotensive properties of food components. Many

of them are focused on determining the ability of food components and products, including meat, to have an inhibitory effect on angiotensin-converting enzyme (ACE), which according to modern concepts plays a key role in the pathogenesis of the main forms of hypertension [16]. Despite the variety of *in vitro* methods for determining ACE-inhibiting activity, their methodology has similar stages. The key reaction in determining the ACE-inhibiting activity is the reaction of transformation of the substrate into a by-product catalyzed by the ACE itself. In the future, the loss of the substrate is determined by various methods. In this case, the presence of an ACE inhibitor is noted as a partial or complete inhibition of the substrate transformation reaction under the action of ACE.

Thus, the existing variety of *in vitro* methods allows to study a wide range of biological effects of various agents, including functional and specialized food products and their ingredients.

3. Conclusion

The current trend towards the use of alternative methods of biomodeling *in vitro* has led not only to their widespread use in the pharmaceutical industry to predict toxicity and assess the pharmacological effects of drugs, but also in the food industry, especially in connection with the development and implementation in the production of functional and specialized (dieto-therapeutic and dietoprophylactic) products, ingredients and modules, as well as biologically active substances and additives.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Каркищенко, Н.Н. (2005). Основы биомоделирования. М, Издательство ВПК. — 608 с. ISBN5-902313-04-X
2. Anisimov, V.N., Khavinson, V. Kh. (2010). Peptide bioregulation of aging: Results and prospects. *Biogerontology*, 11(2), 139–149.
3. Гильдеева, Г.Н. (2015). Актуальные проблемы доклинических исследований: переход к альтернативной *in vitro*-токсикологии. *Вестник Росздравнадзора*, 5, 59–62.
4. Garle, M.J., Fentem, J.H., Fry, J.R. (1994). In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. *Toxicology in vitro*, 8(6), 1303–1312.
5. Holme, J.A., Dybing, E. (2002). The use of *in vitro* methods for hazard characterization of chemicals. *Toxicology Letters*, 127(1–3), 135–141.
6. Guth, K., Schäfer-Korting, M., Fabian, E., Landsiedel, R., van Ravenzwaay, B. (2015). Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 29(1), 113–123.
7. Verstraelen, S., Jacobs, A., De Wever, B., Vanparys, P. (2013). Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an *in vitro* alternative to the Draize rabbit eye irritation test. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1298–1311.
8. Трахтенберг, И.М., Коваленко, В.М., Кокшарова, Н.В., Жминько, П.Г. (2008). Альтернативные методы и тест-системы. Лекарственная токсикология. Киев, Авицена. — 272 с.
9. Satish Rao, B.S., Sreedevi, M.V., Nageshwar Rao, B. (2009). Cytoprotective and antigenotoxic potential of Mangiferin, a glucosylxanthone against cadmium chloride induced toxicity in HepG2 cells. *Food Chemical Toxicology*, 47(3), 592–600.
10. Camenisch, G., Alsenz, J., Van De Waterbeemd, H., Folkers, G. (1998). Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell mono-

- layers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(4), 313–319.
11. Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21(6), 1–26.
12. Friberg, D., Bryant, J., Shannon, W., Whiteside, T.L. (1994). In vitro cytokine production by normal human peripheral blood mononuclear cells to measure their immunocompetence and state of activation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1(3), 261–268.
13. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
14. Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, 22(5), 1304–1309.
15. Лисицкая, К.В., Николаев, И.В., Торкова, А.А., Попов, В.О., Королёва, О.В. (2012). Анализ функциональных свойств биологически активных веществ на моделях эукариотических клеток (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, 48(6), 581–598.
16. Van Vark, L.C., Bertrand, M., Akkerhuis, K.M., Brugts, J.J., Fox, K., Mourad, J.J., Boersma E. (2012). Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension: A meta-analysis of randomized clinical trials of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors involving 158 998 patients. *European Heart Journal*, 33(16), 2088–2097.

REFERENCES

1. Karkischenko, N.N. (2005). The Basics of Biomodelling. M: VPK. 608 s. ISBN5-902313-04-X (in Russian)
2. Anisimov, V.N. Khavinson, V. Kh. (2010). Peptide bioregulation of aging: Results and prospects. *Biogerontology*, 11(2), 139–149.
3. Gildeeva, G.N., (2015). Topical issues of pre-clinical studies: transition to alternative *in vitro* toxicology. *Vestnik Roszdravnadzora*, 5, 59–62. (in Russian)
4. Garle, M.J., Fentem, J.H., Fry, J.R. (1994). In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. *Toxicology in vitro*, 8(6), 1303–1312.
5. Holme, J.A., Dybing, E. (2002). The use of *in vitro* methods for hazard characterization of chemicals. *Toxicology Letters*, 127(1–3), 135–141.
6. Guth, K., Schäfer-Korting, M., Fabian, E., Landsiedel, R., van Ravenzwaay, B. (2015). Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 29(1), 113–123.
7. Verstraelen, S., Jacobs, A., De Wever, B., Vanparys, P. (2013). Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an *in vitro* alternative to the Draize rabbit eye irritation test. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1298–1311.
8. Trakhtenberg, I.M., Kovalenko V.M., Koksharova N.V., Zhmin'ko P.G. (2008). Аl'ternativnye metody i test-sistemy. Lekarstvennaya toksikologiya. Kiev: Avitsena. — 272 p. (In Ukraine)
9. Satish Rao, B.S., Sreedevi, M.V., Nageshwar Rao, B. (2009). Cytoprotective and antigenotoxic potential of Mangiferin, a glucosylxanthone against cadmium chloride induced toxicity in HepG2 cells. *Food Chemical Toxicology*, 47(3), 592–600.
10. Camenisch, G., Alsenz, J., Van De Waterbeemd, H., Folkers, G. (1998). Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell mono-

- layers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(4), 313–319.
11. Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21(6), 1–26.
12. Friberg, D., Bryant, J., Shannon, W., Whiteside, T.L. (1994). In vitro cytokine production by normal human peripheral blood mononuclear cells to measure their immunocompetence and state of activation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1(3), 261–268.
13. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
14. Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, 22(5), 1304–1309.
15. Lisitskaya, K.V., Nikolaev, I.V., Torkova, A.A., Popov, V.O., Koroleva, O.V. (2012). Analysis of functional properties of biologically active substances using eukaryotic cell models (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(6), 525–540.
16. Van Vark, L.C., Bertrand, M., Akkerhuis, K.M., Brugts, J.J., Fox, K., Mourad, J.J., Boersma E. (2012). Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension: A meta-analysis of randomized clinical trials of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors involving 158 998 patients. *European Heart Journal*, 33(16), 2088–2097.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
<p>Принадлежность к организации</p> <p>Федулова Лилия Вячеславовна — кандидат технических наук, заведующая, Экспериментальная клиника — лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-92-11 E-mail: l.fedulova@fncps.ru *автор для контактов</p>	<p>Affiliation</p> <p>Liliya V. Fedulova — candidate of technical sciences, head of Experimental clinic-laboratory «Biologically active substances of an animal origin», V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, 109316, Moscow, Talalikhina str., 26 Tel.: +7-495-676-92-11 E-mail: l.fedulova@fncps.ru *corresponding author</p>
<p>Василевская Екатерина Романовна — научный сотрудник, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-92-11 E-mail: e.vasilevskaya@fncps.ru</p>	<p>Ekaterina R. Vasilevskaya — researcher, Experimental clinic — research laboratory of biologically active substances of an animal origin, V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 109316, Moscow, Talalikhina str., 26 Tel.: +7-495-676-92-11 E-mail: e.vasilevskaya@fncps.ru</p>
<p>Котенкова Елена Александровна — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-92-11 E-mail: e.kotenkova@fncps.ru</p>	<p>Elena A. Kotenkova — candidate of technical sciences, senior research scientist, Experimental clinic-laboratory «Biologically active substances of an animal origin», V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, 109316, Moscow, Talalikhina str., 26 Tel.: +7-495-676-92-11 E-mail: e.kotenkova@fncps.ru</p>
<p>Кашинова Эльта Басанговна — кандидат технических наук, научный сотрудник, экспериментальная клиника -лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-92-11 E-mail: e.kashinova@fncps.ru</p>	<p>Elta B. Kashinova — candidate of technical sciences, researcher, Experimental clinic — laboratory of biologically active substances of an animal origin, V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 109316, Moscow, Talalikhina str., 26 Tel.: +7-495-676-92-11 E-mail: e.kashinova@fncps.ru</p>
<p>Критерии авторства</p> <p>Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат</p>	<p>Contribution</p> <p>Authors are equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism</p>
<p>Конфликт интересов</p> <p>Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов</p>	<p>Conflict of interest</p> <p>The authors declare no conflict of interest</p>
<p>Поступила 21.09.2018</p>	<p>Received 21.09.2018</p>