

## ИНУЛИН КАК КОМПОНЕНТ ОБОГАЩЕННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ: ВЛИЯНИЕ НА МИКРОНУТРИЕНТНЫЙ СТАТУС ОРГАНИЗМА

### **В.М. Коденцова**

д.б.н., профессор, гл. науч. сотрудник,  
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (Москва, Россия)  
E-mail: kodentsova@ion.ru; ORCID 0000-0002-5288-1132

### **С.Н. Леоненко**

аспирант, Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (Москва, Россия)  
ORCID0000-0003-0048-4220

### **Н.А. Бекетова**

к.х.н., ст. науч. сотрудник,  
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (Москва, Россия)  
ORCID0000-0003-2810-2351

### **О.В. Кошелева**

науч. сотрудник,  
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (Москва, Россия)  
ORCID0000-0003-2391-9880

### **О.А. Вржесинская**

к.б.н., ст. науч. сотрудник,  
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (Москва, Россия)

### **А.А. Сокольников**

к.б.н., ст. науч. сотрудник,  
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (Москва, Россия)  
ORCID0000-0003-1808-652X

### **Л.В. Шевякова**

к.б.н., ст. науч. сотрудник,  
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (Москва, Россия)  
ORCID0000-0002-7447-8520

### **Д.В. Рисник**

к.б.н., вед. науч. сотрудник,  
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (Москва, Россия)  
ORCID0000-0002-3389-8115

**Актуальность.** В качестве источника полифруктозанов инулин используется в специализированных пищевых продуктах профилактического питания для снижения риска развития хронических заболеваний. Наряду с доказанным положительным влиянием инулина на микробиоту кишечника, абсорбцию кальция, магния и цинка, появляются данные о его негативном влиянии на обеспеченность витамином Е.

**Цель исследования** – оценить влияние введения в рацион инулина на усвоение микронутриентов у дефицитных по витаминам D и группы В растущих крыс.

**Материал и методы.** Для оценки влияния инулина на микронутриентный статус растущих крыс-самцов Вистар (масса тела 51,4 ± 0,5 г) в полусинтетический рацион, дефицитный по витаминам D и группы В, в течение 7 сут вводили недостающие витамины на фоне обогащения рациона инулином (5%) или без его добавления. Содержание кальция и железа в лиофильно высушенных печени и мозге животных определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Z 5300 (Hitachi High-Technologies Corporation (ННС), Япония), биохимические показатели крови и мочи – на биохимическом анализаторе «KoneLab 200i» (ThermoScientific, Финляндия). Показатели микронутриентной обеспеченности сравнивали с параметрами крыс, адекватно обеспеченных всеми витаминами в течение всего эксперимента.

**Результаты.** Наличие инулина в рационе замедляло восстановление нормальной обеспеченности витаминами В<sub>1</sub> и В<sub>6</sub> (по экскреции с мочой), В<sub>2</sub> (по содержанию в мозге), а также приводило к 1,4-кратному повышению концентрации железа в печени при одновременном снижении в 1,5 раза концентрации витамина Е по сравнению с показателями контрольной группы.

**Выводы.** На фоне имеющейся множественной витаминной недостаточности одновременное наличие в составе рациона инулина и витаминов не гарантирует полного усвоения всех добавленных витаминов и может привести к нежелательным последствиям. Эффективность обогащенного продукта или биологически активной добавки для коррекции витаминно-минерального статуса может существенным образом зависеть от композиционного состава продукта, что указывает на необходимость их клинической апробации, подтверждающей биодоступность обогащающих компонентов и эффективность для поддержания здоровья.

**Ключевые слова:** сочетанная недостаточность витаминов D и группы В; инулин, коррекция, а-токоферол, железо, крысы.

**Для цитирования:** Коденцова В.М., Леоненко С.Н., Бекетова Н.А., Кошелева О.В., Вржесинская О.А., Сокольников А.А., Шевякова Л.В., Рисник Д.В. Инулин как компонент обогащенных пищевых продуктов: влияние на микронутриентный статус организма. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(3):34–42. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-03-05>

Благодаря своим технологическим свойствам инулин, относящийся к группе полифруктозанов, нашел широкое применение в пищевой промышленности в качестве текстуратора, заменителя жира, заменителя сахара. В качестве источника полифруктозанов он используется в специализированных пищевых продуктах профилактического питания для снижения риска развития хронических заболеваний (сердечно-сосудистые, рак толстой кишки, желчнокаменная болезнь, сахарный диабет) [1, 2], а также в продуктах лечебного питания, в том числе для пациентов с синдромом раздраженного кишечника, запорами, сахарным диабетом [3–5]. Имеются многочисленные примеры его положительного действия на состояние здоровья. Прием по 15 г инулина в течение 21 дня приводил к снижению систолического артериального давления у женщин с раком груди [6]. В экспериментах на мышах было показано, что ферментируемый микробиотой толстого кишечника инулин защищает от развития метаболического синдрома, вызванного диетой с высоким содержанием жиров, восстанавливая опосредованную IL-22 функцию энтероцитов [7]. Добавление по 6 г инулина в рацион детей в возрасте 3–6 лет ослабляло вызванные приемом антибиотиков нарушения микробиоты кишечника [8]. Прием детьми, страдающими целиакией, по 10 г инулина в течение 3 мес. способствовал повышению уровня витаминов D и E в крови и не влиял на концентрацию витамина A [9].

Весьма перспективным представляется обогащение рациона инулином для поддержания минерального обмена, улучшения состояния скелета и/или профилактики переломов за счет увеличения абсорбции кальция, магния и цинка в нижних отделах кишечника, повышения ретенции и накопления в костях [10–12], а также меди, железа [13]. Включение в рацион поросят инулина приводило к повышению концентрации в плазме крови железа, меди и цинка по сравнению с животными, получавшими такой же витаминно-минеральный премикс, но без добавления инулина [14].

Однако в последнее время начали появлятьсястораживающие проявления обогащения рациона инулином. В экспериментах на мышах было

показано, что прием инулина нарушает метаболизм холестерина и желчных кислот в печени [15], а также может усугубить тяжесть заболевания в ответ на индукторы острого колита (декстран-сульфат натрия) [4]. У мышей потребление инулина повышало восприимчивость к инвазии *Trichuris muris*, а в сочетании с инвазией вызвало воспаление толстой кишки и дисбактериоз [16]. На фоне гипокалорийного рациона прием пациентами с сахарным диабетом 2-го типа с сопутствующим ожирением взамен углеводсодержащего блюда специализированного пищевого продукта в форме напитка, содержащего растворимые пищевые волокна (инулин, гуммиарабик, пектин в дозе примерно 300% от их адекватного уровня потребления) и профилактические дозы витаминов, оказывал не только положительное действие (снижение концентрации холестерина в сыворотке крови и уменьшение абсорбции глюкозы в кишечнике [5, 17]), но и явно нежелательное (ухудшение обеспеченности витамином E [17]).

Таким образом, несмотря на широкое применение, данные о влиянии инулина на обмен веществ противоречивы, а в отношении витаминов и минеральных веществ их недостаточно.

Цель исследования – оценить влияние введения в рацион инулина на усвоение микронутриентов у дефицитных по витаминам D и группы В растущих крыс.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Основанием для исследования послужили эксперименты, выполненные на самцах-отъемышах крыс Вистар, – животных, получавших полноценный полусинтетический рацион на основе не отмытого от витаминов казеина (20%) [18]. Животные контрольной группы ( $n = 9$ ) получали полноценный рацион, дефицит витаминов D и группы В вызывали уменьшением в 5 раз содержания витамина D и всех витаминов группы В в витаминной смеси рациона в течение 23 сут [19]. Восстановление витаминной обеспеченности проводили в течение 7 дней, добавляя в корм недостающие витамины на фоне стандартного рациона («+D+В»,  $n = 12$ ) и на фоне замены 5% крахмала

на инулин («+D+B+инулин»,  $n = 10$ ). Исследования выполняли в соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил лабораторной практики» и требованиями, изложенными в Межгосударственном стандарте ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Протокол исследования был утвержден комитетом по этике ФИЦ питания и биотехнологии.

Для сбора мочи за 20 ч до забоя крыс помещали в метаболические клетки, лишая пищи и предоставляя воду без ограничения. Предварительно анестезированных эфиром крыс выводили из эксперимента декапитацией.

Концентрацию витаминов в плазме крови, лиофильно высушенных печени и целом мозге крыс, а также моче определяли традиционно принятыми в витаминологии методами [20]. Концентрацию 25-гидроксивитамина D (25(OH)D) в плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием наборов «25-Hydroxy Vitamin D EIA» (Immunodiagnostic Systems Ltd, Великобритания). Биохимические показатели плазмы крови определяли на биохимическом анализаторе «KoneLab 200i» (ThermoScientific, Финляндия) по стандартным методикам.

Экспериментальные данные обрабатывали с помощью SPSS Statistics 23.0 (IBM, США). Для выявления статистической значимости различий непрерывных величин использовали непараметрический  $U$ -критерий Манна–Уитни для независимых переменных и непараметрический критерий Краскелла–Уоллеса. Различия между анализируемыми показателями считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование представляет собой повторный анализ результатов оценки влияния наличия в рационе инулина (5%) на усвоение микронутриентов и устранение последствий дефицита витаминов D и группы B у растущих крыс.

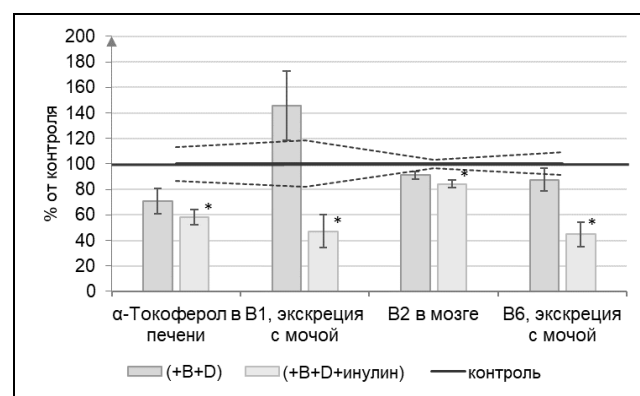
О развитии дефицита витаминов D и группы B у крыс свидетельствовало заметное отставание в росте от крыс контрольной группы, обеспеченных всеми витаминами, – масса тела  $198,5 \pm 2,4$  г ( $Me = 199,3$  г) против  $210,4 \pm 4,6$  г ( $Me = 203,5$  г,  $p = 0,046$ ). Статистически значимых различий по

абсолютной массе печени и головного мозга у животных контрольной и опытных групп выявлено не было.

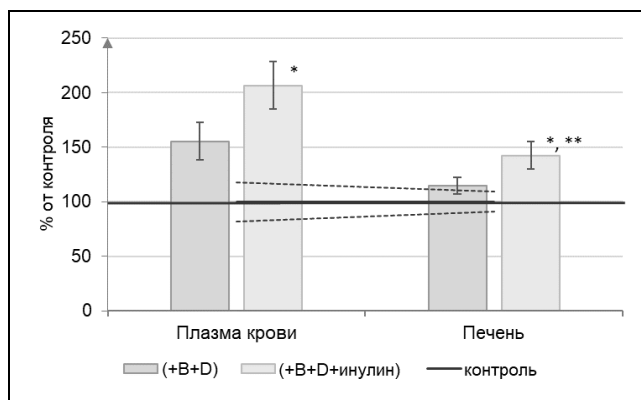
Проведено определение показателей обеспеченности организма крыс витаминами B<sub>1</sub> и B<sub>2</sub>: по содержанию в печени, целом головном мозге и плазме крови рибофлавина; экскреции с мочой тиамина, рибофлавина и 4-пиридоксидовой кислоты (метаболит витамина B<sub>6</sub>). Установлены показатели обеспеченности минеральными веществами по концентрации в плазме крови кальция, магния, фосфора, концентрации кальция, магния, железа, цинка и меди в печени и головном мозге, экскреции с мочой кальция, магния и фосфора. Кроме того, были измерены биохимические показатели плазмы крови.

Для выявления влияния инулина на эффективность коррекции дефицита витаминов все измеренные показатели были выражены в процентах от соответствующих величин у животных контрольной группы, получавших полноценный по содержанию витаминов рацион и не испытывавших недостаток витаминов. Восполнение в течение 7 сут количества недостающих витаминов, как в отсутствии инулина, так и в его присутствии в рационе, полностью восстановило рост животных, а также большинство показателей плазмы крови, печени и мозга (данные не приведены). На рис. 1 и 2 представлены только те данные, которые в конце эксперимента имели статистически значимые отличия от показателей крыс контрольной группы.

На рис. 1 и 2 за 100% приняты параметры крыс контрольной группы (горизонтальная линия), пунктирные линии отражают разброс значений.



**Рис. 1.** Показатели обеспеченности витаминами, выраженные в % относительно соответствующих величин у крыс из контрольной группы (\* – статистически значимое отличие от параметра крыс контрольной группы)



**Рис. 2.** Содержание железа в плазме крови и печени, выраженные в % относительно соответствующих величин у крыс из контрольной группы (\* - статистически значимое отличие от параметра крыс контрольной группы, \*\* - статистически значимое отличие ( $p < 0,10$ ) от показателя группы «+D+B»)

Несмотря на то, что в рационе крыс содержалось адекватное количество витамина Е, дефицит витаминов D и группы В приводил к уменьшению концентрации  $\alpha$ -токоферола в печени. Через 7 сут восполнения недостающих витаминов в рационе содержание в печени витамина Е оставалось сниженным у крыс обеих групп, испытывавших дефицит витаминов, по сравнению с данным показателем животных контрольной группы. Однако, если без добавления инулина снижение, составившее 29,4%, не достигало уровня статистической значимости от показателя крыс контрольной группы, то на фоне присутствия в рационе инулина снижение было статистически значимым и составляло 41,8%.

В отсутствие инулина в группе животных «+D+B+инулин» показатели обеспеченности организма витаминами группы В (содержание витамина В<sub>2</sub> в мозге, а также экскреция с мочой витаминов В<sub>1</sub> и метаболита витамина В<sub>6</sub> – 4-пиридо-ксиловой кислоты) восстановились до нормального уровня. На фоне потребления инулина все показатели остались статистически значимо сниженными: содержание витамина В<sub>2</sub> в мозге – на 15,7%, экскреция витаминов – примерно в 2 раза. Уровень витамин D-зависимого белка остеокальцина также остался сниженным ( $947 \pm 43$  нг/мл против  $1066 \pm 43$  нг/мл у животных контрольной группы и  $1050 \pm 34$  нг/мл у крыс из группы «+D+B»).

Таким образом, наличие в корме инулина затрудняло восстановление показателей обеспеченности крыс витаминами после дефицита витаминов D и группы В в ходе восполнения в рационе недостающих витаминов, то есть мешало их усвоению.

Как следует из рис. 2, после 7-дневной коррекции витаминного статуса на фоне введения в

корм инулина уровень железа в плазме крови животных был статистически значимо на 32,7% выше по сравнению с таковым у крыс с устраненным дефицитом витаминов, не получавших инулин, и даже превысил данный параметр у контрольных животных, адекватно обеспеченных всеми витаминами в течение всего эксперимента.

Аналогичное повышение в плазме крови концентрации не только железа, но и меди и цинка было обнаружено у поросят, в рацион которых был добавлен инулин [14]. После коррекции сочетанного витаминного недостатка на фоне потребления инулина (группа «+D+B+инулин») концентрация железа в печени у крыс была статистически значимо более высокой (на 42,6%) по сравнению с таковой у животных контрольной группы и на 24,4% ( $p < 0,10$ ) выше, чем у крыс, испытывавших дефицит витаминов, но не получавших инулин – группа «+D+B».

Таким образом, наличие инулина в корме крыс заметно влияло на усвоение или перераспределение железа по органам: в печени повысилось, но не отразилось на концентрации в головном мозге. Требуется дальнейшие исследования по характеристике обмена железа.

В процессе исследования влияния введения в рацион растворимых пищевых волокон на коррекцию дефицита витаминов D и группы В, последствий этого дефицита у растущих крыс предполагалось оценить влияние инулина на усвоение витаминов А, Е, В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> и ряда минеральных веществ. Используемая модель отражала состояние хронического множественного дефицита витаминов, так как пребывание крыс в течение 23 сут на витаминдефицитном рационе по продолжительности соответствовало примерно четырем годам жизни ребенка [21, 22]. Введение в рацион недостающих витаминов на фоне инулина сопровождалось повышением концентрации железа в плазме крови и печени, но ухудшало обеспеченность витамином Е (по содержанию в печени) и замедляло восстановление нормальной обеспеченности организма витаминами В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> и В<sub>2</sub>, что проявлялось в сниженном уровне витамина В<sub>2</sub> в мозге и сниженной экскреции тиамин и метаболита витамина В<sub>6</sub> – 4-пиридоксидовой кислоты. Поскольку повышение экскреции водорастворимых витаминов происходит при полной насыщенности организма витаминами, а уменьшение экскреции водорастворимых витаминов является более ранним признаком наличия их недостатка [23], одним из

возможных объяснений является более замедленное устранение дефицита витаминов группы В (В<sub>1</sub> и В<sub>6</sub>) при введении в рацион инулина. На фоне потребления инулина происходило некоторое отставание в восстановлении содержания витамина В<sub>2</sub> в головном мозге. Обнаружено увеличение концентрации железа в плазме крови и печени, что, по-видимому, отражает улучшение его всасывания при включении в рацион крыс инулина. Это согласуется с результатами других исследователей [13, 14] и может свидетельствовать о возможной пользе обогащения инулином рациона лиц с железодефицитными состояниями.

Вместе с тем уменьшение содержания витамина Е в печени может быть следствием накопления в органе железа, инициировавшего усиление процессов перекисного окисления липидов и приводящего к окислительному стрессу [24]. Ранее нами было выявлено, что и другие пищевые волокна (отруби, пектин) приводят к ухудшению обеспеченности организма витамином Е [25, 26]. Полученные результаты указывают на то, что включение в рацион инулина в качестве растворимых пищевых волокон необходимо сопровождать одновременным обогащением рациона витамина Е и группы В.

Кроме того, приведенные результаты поднимают целый ряд вопросов, касающихся использования в питании пищевых продуктов, обогащенных инулином, и необходимости разноплановой оценки эффективности их применения в питании пациентов с разными нозологиями.

Большинство статей, посвященных созданию обогащенных пищевых продуктов, касаются технологических аспектов. В технологических вузах имеются кафедры, в программу обучения включены курсы по «конструированию» обогащенных пищевых продуктов. Сформулированы основные принципы создания продуктов здорового питания. Примером может служить лекция по методологическим подходам к созданию продуктов здорового питания. В ней поэтапно рассматриваются шаги по созданию обогащенного пищевого продукта. В кратком изложении алгоритм включает «научное обоснование выбора функциональных ингредиентов или биологически активных веществ, способных при их внесении в разрабатываемый продукт удовлетворить суточную потребность в функциональных ингредиентах, обоснование эффективной дозировки функциональных ингредиентов или биологически активных веществ, разработку ре-

цептур и технологии производства, исследование потребительских свойств разработанного продукта здорового питания (исследование содержания вносимых биологически активных веществ, расчет степени удовлетворения потребности в функциональных ингредиентах или биологически активных веществах при потреблении рекомендуемого количества продукта с целью позиционирования разработанного продукта как продукта здорового питания (обогащенного, специализированного или функционального))» [27].

Таким образом, в алгоритме создания продукта практически отсутствует самый первый этап всестороннего медико-биологического обоснования композиционного состава, которое должно включать оценку (хотя бы на основании данных литературы) исходного витаминно-минерального статуса, учет роли недостатка отдельных витаминов в развитии патологического процесса и используемой лекарственной терапии, часто нарушающих ассимиляцию микронутриентов, приводящих к снижению обеспеченности организма тем или иным микронутриентом [20]. Необходим также учет особенностей основного рациона питания лиц, для которых предназначен обогащенный продукт (наличие пищевых волокон, обладающих адсорбирующими свойствами, или полиненасыщенных жирных кислот, подверженных перекисному окислению и снижающих антиоксидантный статус организма), способных существенно уменьшать ожидаемую эффективность разрабатываемого продукта [20]. Важно также понимать, что эффект от потребления обогащенного пищевого продукта будет достигнут при содержании в нем сопоставимой с физиологической потребностью дозой (а не минимальной!) и не может быть мгновенным, а потребует определенного времени (для каждого витамина своего, иногда достигающего нескольких месяцев).

Представленный выше алгоритм демонстрирует, что, в конечном счете, используется именно механистический подход к созданию обогащенного пищевого продукта, учитывающий различные технологические аспекты, но при этом полностью замалчивается медицинский аспект, а именно доклиническая и клиническая апробация разработанного продукта, доказывающая его эффективность и заявленные свойства в качестве источника биологически или функционально активных пищевых веществ, несмотря на то, что такие исследования согласно ТР ТС 027/2012 «О безопасности отдельных видов специализированной пищевой продукции, в

том числе диетического лечебного и диетического профилактического питания» являются обязательным условием его государственной регистрации.

Анализ литературы показывает, что результаты клинической апробации обогащенных пищевых продуктов описаны значительно реже и, как правило, затрагивают не все возможные функции обогащающего компонента. Это особенно актуально в случае пищевых волокон, которые могут оказывать влияние на эвакуаторную функцию кишечника, обладают сорбирующими и пребиотическими свойствами. В качестве примера можно привести исследование эффективности специализированного пищевого продукта диетического лечебного питания, содержащего в суточной дозе 3 г инулина и витамины группы В (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, РР и фолиевая кислота в дозе 69–107% от рекомендуемого потребления, 10 мг куркумина, что составляет 20% от адекватного уровня потребления) в течение двух недель у пациентов с синдромом раздраженного кишечника с проблемами запоров [1, 28]. Благоприятное действие продукта проявлялось в уменьшении чувства неполного опорожнения кишечника, выраженности абдоминальной боли и интенсивности вздутия живота, улучшении показателей качества жизни, однако, к сожалению, витаминный статус пациентов в этом исследовании ни до, ни после приема продукта не оценивали. В обсуждении в качестве биологически активных компонентов, обуславливающих полученный эффект, указаны инулин, куркумин и витамин В<sub>6</sub>. Между тем, по данным нашей лаборатории, примерно у трети обследованных пациентов с синдромом раздраженного кишечника имеется дефицит витаминов Е и В<sub>2</sub>, подавляющее большинство таких пациентов имеют дефицит витамина D. Продолжительность исследования была очень мала (2 недели), что при использованных дозах витаминов недостаточно для кардинального улучшения обеспеченности организма витаминами группы В [29]. Поскольку в упомянутом исследовании степень усвоения добавленных в продукт витаминов, а также возможное влияние на антиоксидантный статус пациентов не оценивали, по всей видимости, судить о том, что именно помимо инулина является основным действующим началом разработанного продукта, не представляется возможным.

## ВЫВОДЫ

Результаты проведенного модельного эксперимента свидетельствуют о том, что при подборе

композиционного состава комплексов или пищевых продуктов с инулином они должны содержать витамины Е и группы В.

Некоторые представители микробиома кишечника человека используют в качестве кофакторов экзогенно поступившие витамины группы В (в частности, корриноиды кобаламина), поэтому высказывается мнение, что для максимальной реализации профилактических эффектов пробиотических микроорганизмов необходимо включение наряду с инулином витамина В<sub>12</sub> [30]. Другими словами, ожидаемая эффективность обогащенного продукта или БАД для коррекции витаминно-минерального статуса может существенным образом зависеть от композиционного состава продукта, что указывает на необходимость их клинической апробации, подтверждающей биодоступность обогащающих компонентов и эффективность для поддержания здоровья [20]. Полезными могут также быть доклинические исследования в модельных экспериментах на животных, которые в известной мере позволяют экстраполировать полученные данные на длительные сроки. Так, содержание крыс в течение 23 сут на витаминдефицитном рационе по продолжительности соответствовало примерно четырем годам жизни ребенка [31], а восстановление дефицита на фоне инулина – примерно одному году.

На основании полученных результатов важно также отметить, что одновременное наличие в составе БАД или пищевого продукта обладающих доказанной эффективностью компонентов (инулин и витамины) не гарантирует полное усвоение всех добавленных витаминов, особенно на фоне имеющейся множественной витаминной недостаточности, а иногда может привести к непредвиденным нежелательным последствиям.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность к.м.н. В.М. Жминченко, к.б.н. С.Н. Зорину, к.м.н. С.Х. Сото за техническую помощь при заборе, подготовке и анализе биологического материала.

## Источник финансирования

Исследование проведено без привлечения дополнительного финансирования.

## Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов

ЛИТЕРАТУРА

1. Пилипенко В.И., Морозов С.В., Исаков В.А. Диетотерапия синдрома раздраженного кишечника с проблемами запоров с использованием специализированного пищевого продукта диетического лечебного питания «концентрат киселя с витаминами и инулином «Интенорм». Доказательная гастроэнтерология. 2018; 7(4): 92–106.
2. Hiel S., Bindels L.B., Pachikian B.D., Kalala G., Broers V., Zamariola, G., Chang B.P.I., Kambashi B., Rodriguez J., Cani P.D., Neyrinck A.M., Thissen J.P., Luminet O., Bindelle J., Delzenne N.M. Effects of a diet based on inulin-rich vegetables on gut health and nutritional behavior in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2019; 109(6): 1683–1695. doi: 10.1093/ajcn/nqz001.
3. Pandey K.R., Naik S.R., Vakil B.V. Probiotics, prebiotics and synbiotics – a review. *J. Food Sci. Technol.* 2015; 52(12): 7577–7587. doi: 10.1007/s13197-015-1921-1.
4. Miles J.P., Zou J., Kumar M.V., Pellizzon M., Ulman E., Ricci M., Chassaing B. Supplementation of Low- and High-fat Diets with Fermentable Fiber Exacerbates Severity of DSS-induced Acute Colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2017; 23: 1133–1143. doi: 10.1097/MIB.0000000000001155.
5. Вржесинская О.А., Коденцова В.М., Шарафетдинов Х.Х., Бекетова Н.А., Кошелева О.В., Плотникова О.А., Пилипенко В.В., Алексеева Р.И., Леоненко С.Н., Сокольников А.А. Влияние приема напитка с витаминами и пищевыми волокнами на витаминный статус пациентов с сахарным диабетом 2 типа и ожирением. *Вопросы диетологии.* 2018; 8(4): 5–12. doi: 10.20953/2224-5448-2018-4-5-12.
6. Becerril-Alarcón Y., Campos-Góm, S., Valdez-Andrad, J.J., Campos-Gómez K.A., Reyes-Barretero D.Y., Benítez-Arciniega A.D., Valdés-Ramos R., Soto-Piña A.E. Inulin supplementation reduces systolic blood pressure in women with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Cardiovasc Ther.* 2019; 2019: 5707150. doi: 10.1155/2019/5707150.
7. Zou J., Chassaing B., Singh V., Pellizzon M., Ricci M., Fyfe M.D., Kumar V., Gewirtz A.T. Fiber-mediated nourishment of gut microbiota protects against diet-induced obesity by restoring IL-22-mediated colonic health. *Cell host & microbe.* 2018; 23(1): 41–53. doi: 10.1016/j.chom.2017.11.003.
8. Soldi S., Vasileiadis S., Lohner S., Uggeri F., Puglisi E., Molinari P., Donner E., Sieland C., Decsi T., Sailer M., Theis S. Prebiotic supplementation over a cold season and during antibiotic treatment specifically modulates the gut microbiota composition of 3-6 year-old children. *Beneficial microbes.* 2019; 10(3): 253–263. doi: 10.3920/BM2018.0116.
9. Drabińska N., Krupa-Kozak, U., Abramowicz P., Jarocka-Cyryta E. Beneficial effect of oligofructose-enriched inulin on vitamin D and E status in children with celiac disease on a long-term gluten-free diet: a preliminary randomized, placebo-controlled nutritional intervention study. *Nutrients.* 2018; 10(11): 1768. doi: 10.3390/nu10111768.
10. Whisner C.M., Castillo L.F. Prebiotics, bone and mineral metabolism. *Calcif Tissue Int.* 2018; 102(4): 443–479. doi: 10.1007/s00223-017-0339-3.
11. Coudray C., Rambeau M., Feillet-Coudray C., Tressol J.C., Demigne C., Gueu E., Maz A., Rayssiguier Y. Dietary inulin intake and age can significantly affect intestinal absorption of calcium and magnesium in rats: a stable isotope approach. *Nutrition Journal.* 2005; 4(1): 29. doi: 10.1186/1475-2891-4-29.
12. Raschka L., Daniel H. Diet composition and age determine the effects of inulin-type fructans on intestinal calcium absorption in rat. *Eur. J. Nutr.* 2005; 44(6): 360–364. doi: 10.1007/s00394-004-0535-6.
13. Scholz-Ahrens K.E., Schrezenmeir J. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *J. Nutr.* 2007; 137(11): 2513S–2523S.
14. Samolińska W., Grela E.R. Comparative effects of inulin with different polymerization degrees on growth performance, blood trace minerals, and erythrocyte indices in growing-finishing pigs. *Biol Trace Elem Res.* 2017; 176(1): 130–142. doi: 10.1007/s12011-016-0796-y.
15. Pauly M.J., Rohde J.K., John C., Evangelakos I., Ko A.C., Pertzborn P., Tödter K., Scheja L., Heeren J., Worthmann A. Inulin Supplementation Disturbs Hepatic Cholesterol and Bile Acid Metabolism Independent from Housing Temperature. *Nutrients.* 2020; 12(10): 3200. doi: 10.3390/nu12103200.
16. Myhill L.J., Stolzenbach S., Mejer H., Jakobsen S.R., Hansen T.V., Andersen, D., Brix S., Hansen L.H., Krych L., Nielsen D.S., Nejsum P., Thamsborg S.M., Williams A.R. Fermentable dietary fiber promotes helminth infection and exacerbates host inflammatory responses. *J. Immunol.* 2020; 204(11): 3042–3055. doi: 10.4049/jimmunol.1901149.
17. Mirmiran P., Bahadoran Z., Khalili Moghadam S., Zadeh Vakili A., Azizi F. A Prospective Study of different types of dietary fiber and risk of cardiovascular disease: Tehran lipid and glucose study. *Nutrients.* 2016; 8(11): E686. doi: 10.3390/nu8110686.
18. Бекетова Н.А., Коденцова В.М., Вржесинская О.А., Кошелева О.В., Переверзева О.Г., Сокольников А.А., Аксенов И.В. Коррекция полигиповитаминоза у растущих крыс различными дозами витаминов на фоне обогащенного пищевыми волокнами рациона. *Вопросы питания.* 2014; 83(4): 29–41.
19. Коденцова В.М., Леоненко С.Н., Бекетова Н.А., Кошелева О.В., Вржесинская О.А., Сокольников А.А., Шевякова Л.В., Рисник Д.В., Зорин С.Н. Зависимость эффективности коррекции дефицита витамина D и его последствий у крыс от обеспеченности витаминами группы В. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2021; 24(4): 4–10. doi: 10.29296/25877313-2021.
20. Спиричев В.Б., Коденцова В.М., Вржесинская О.А., Бекетова Н.А., Харитончик Л.А., Алексеева И.А., Сокольников А.А., Рисник В.В. Методы оценки витаминной обеспеченности населения. Учеб.-методич. Пособие. М.: ПКЦ Альтекс, 2001; 68 с.
21. Поворозник В.В., Гопкалова И.В., Григорьева Н.В. Особенности изменений минеральной плотности костной ткани у белых крыс линии Вистар в зависимости от возраста и пола. *Проблемы старения и долголетия.* 2011; 20(4): 393–401.
22. Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Зубенкова Э.С., Вайнсон А.А., Бирюков А.П. Соотношение возрастов основных лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков и собак) и человека: актуальность для проблемы возрастной радиочувствительности и анализ опубликованных данных. *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2018; 63(1): 5–27.
23. Коденцова В.М., Вржесинская О.А. Обеспеченность детей водорастворимыми витаминами (2015–2018 гг.). *Вопросы практической педиатрии.* 2019; 14(2): 7–14. doi: 10.20953/1817-7646-2019-2-7-14.
24. Verduci E., Gianni M.L., Vizzari G., Vizzuso S., Cerasani J., Mosca F., Zuccotti G.V. The triad mother-breast milk-infant as predictor of future health: a narrative review. *Nutrients.* 2021; 13(2): 486. doi: 10.3390/nu13020486.
25. Бекетова Н.А., Коденцова В.М., Вржесинская О.А., Кошелева О.В., Переверзева О.Г., Исаева В.А., Поздняков А.Л. Влияние пшеничных отрубей на обеспеченность организма витаминами (эксперимент на крысах). *Вопросы питания.* 2011; 80(6): 35–42.
26. Погочева А.В., Коденцова В.М., Вржесинская О.А., Дербенева С.А., Бекетова Н.А., Переверзева О.Г., Кошелева О.В. Влияние пищевых волокон на усвоение витаминов у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и ожирением. *Вопросы питания.* 2010; 79(1): 34–39.

27. Корнен Н.Н., Викторова Е.П., Евдокимова О.В. Методологические подходы к созданию продуктов здорового питания. Вопросы питания. 2015(1): 95–99.
28. Пилипенко В.И., Теплюк Д.А., Шаховская А.К., Исаков В.А., Воробьева В.М., Воробьева И.С., Глазкова И.В., Кочеткова А.А., Михеева Г.А., Юдина А.В. Эффективность специализированного пищевого продукта (киселя с витаминами и пищевыми волокнами) у больных с синдромом раздраженного кишечника с запорами: сравнительное контролируемое исследование. Вопросы питания. 2015; 84(6): 83–91.
29. Коденцова В.М., Вржесинская О.А. Витаминно-минеральные комплексы: соотношение доза – эффект. Вопросы питания. 2006; (1): 30–39.
30. Ших Е.В., Соловьева С.А., Перков А.В. Синергизм компонентов как основной подход к формированию пробиотического комплекса. Медицинский Совет. 2020; (5): 120–127.
31. Коденцова В.М., Жилинская Н.В., Штигель Б.И. Витаминология: от молекулярных аспектов к технологиям витаминизации детского и взрослого населения. Вопросы питания. 2020; 89(4): 89–99.

Поступила 12 апреля 2021 г.

## INULIN AS A COMPONENT OF FORTIFIED FOODSTUFFS: INFLUENCE ON THE MICRONUTRIENT STATUS

© Authors, 2022

### V.M. Kodentsova

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety (Moscow, Russia)

ORCID 0000-0002-5288-1132

E-mail: kodentsova@ion.ru

### S.N. Leonenko

Posr-graduate Student, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety (Moscow, Russia)

ORCID0000-0003-0048-4220

### N.A. Beketova

Ph.D. (Chem.), Senior Research Scientist, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety (Moscow, Russia)

ORCID0000-0003-2810-2351

### O.V. Kosheleva

Research Scientist, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety (Moscow, Russia)

ORCID0000-0003-2391-9880

### O.A. Vrzhesinskaya

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety (Moscow, Russia)

ORCID 0000-0002-8973-8153

### A.A. Sokolnikov

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety (Moscow, Russia)

ORCID0000-0003-1808-652X

### L.V. Shevyakova

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety (Moscow, Russia)

ORCID0000-0002-7447-8520

### D.V. Risnik

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety (Moscow, Russia)

ORCID0000-0002-3389-8115

**Relevance.** Inulin is used as a source of polyfructosans in specialty foods for preventive nutrition to reduce the risk of chronic diseases. Along with the proven positive effect on the intestinal microbiota, the absorption of calcium, magnesium and zinc, data on the negative impact on the supply with vitamin E are emerging.

**The aim** of the study was to evaluate the effect of introducing inulin into the diet on the assimilation of micronutrients in growing rats deficient in vitamins D and group B. **Material and methods.** To assess the effect of inulin on the micronutrient status of growing male Wistar rats (body weight  $51.4 \pm 0.5$  g) in a semisynthetic diet deficient in vitamins D and group B for 7 days the missing vitamins were introduced with or without inulin enrichment of the diet (5%). The indices of micronutrient status were compared with the parameters of rats adequately provided with all vitamins throughout the experiment. The content of calcium and iron in the freeze-dried liver and brain was determined on a Z 5300 atomic absorption spectrophotometer (Hitachi High-Technologies Corporation (HHC), Japan), biochemical parameters of blood and urine were determined on a KoneLab 200i biochemical analyzer (ThermoScientific, Finland). **Results.** The presence of inulin in the diet slowed down the restoration of the normal supply with vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>6</sub> (urine excretion), B<sub>2</sub> (content in the brain), and also led to a 1.4-fold increase of the liver iron concentration, while simultaneously decreasing the concentration of liver vitamin E compared with the control group. **Conclusions.** Against the background of the existing multiple vitamin deficiency, the simultaneous presence of inulin and vitamins in the diet does not guarantee the complete absorption of all added vitamins and may lead to undesirable consequences. The effectiveness of a fortified product or dietary supplement for correcting the vitamin and mineral status may significantly depend on the composition of the product, which indicates the need for their clinical testing, confirming the bioavailability of the fortifying components and their effectiveness for maintaining health.

**Key words:** multiple deficiency of vitamins D and B group; inulin, correction,  $\alpha$ -tocopherol, iron, rats.



**For citation:** Kodentsova V.M., Leonenko S.N., Beketova N.A., Kosheleva O.V., Vrzhesinskaya O.A., Sokolnikov A.A., Shevyakova L.V., Risnik D.V. Inulin as a component of fortified foodstuffs: influence on the micronutrient status. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2022;25(3):34–42. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-03-05>

## REFERENCES

- Pilipenko V.I., Morozov S.V., Isakov V.A. Dietoterapija sindroma razdrzhenogo kishechnika s problemami za-porov s ispol'zovaniem specializirovannogo pishhevoogo produkta dieticheskogo lechebnogo pitaniya «koncentrat kiselja s vitaminami i inulinom «Intenorm». Dokazatel'naja gastrojenterologija. 2018; 7(4): 92–106.
- Hiel S., Bindels L.B., Pachikian B.D., Kalala G., Broers V., Zamariola G., Chang B.P.I., Kambashi B., Rodriguez J., Cani P.D., Neyrinck A.M., Thissen J.P., Luminet O., Bindelle J., Delzenne N.M. Effects of a diet based on inulin-rich vegetables on gut health and nutritional behavior in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2019; 109(6): 1683–1695. doi: 10.1093/ajcn/nqz001.
- Pandey K.R., Naik S.R., Vakli B.V. Probiotics, prebiotics and synbiotics – a review. *J. Food Sci. Technol.* 2015; 52(12): 7577–7587. doi: 10.1007/s13197-015-1921-1.
- Miles J.P., Zou J., Kumar M.V., Pellizzon M., Ulman E., Ricci M., Chassaing B. Supplementation of Low- and High-fat Diets with Fermentable Fiber Exacerbates Severity of DSS-induced Acute Colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2017; 23: 1133–1143. doi: 10.1097/MIB.0000000000001155.
- Vrzhesinskaja O.A., Kodencova V.M., Sharafetdinov H.H., Beketova N.A., Kosheleva O.V., Plotnikova O.A., Pilipenko V.V., Alekseeva R.I., Leonenko S.N., Sokolnikov A.A. Vlijanie priema napitka s vitaminami i pishhevymi voloknami na vitaminnyj status pacientov s saharnym diabetom 2 tipa i ozhirenijem. *Voprosy dietologii.* 2018; 8(4): 5–12. doi: 10.20953/2224-5448-2018-4-5-12.
- Becerril-Alarcón Y., Campos-Góm, S., Valdez-Andrad, J.J., Campos-Gómez K.A., Reyes-Barretero D.Y., Benitez-Arci-niega A.D., Valdés-Ramos R., Soto-Piña A.E. Inulin supplementation reduces systolic blood pressure in women with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Cardiovasc Ther.* 2019; 2019: 5707150. doi: 10.1155/2019/5707150.
- Zou J., Chassaing B., Singh V., Pellizzon M., Ricci M., Fyth M.D., Kumar V., Gewirtz A.T. Fiber-mediated nourishment of gut microbiota protects against diet-induced obesity by restoring IL-22-mediated colonic health. *Cell host & microbe.* 2018; 23(1): 41–53. doi: 10.1016/j.chom.2017.11.003.
- Soldi S., Vasileiadis S., Lohner S., Uggeri F., Puglisi E., Molinari P., Donner E., Sieland C., Decsi T., Sailer M., Theis S. Prebiotic supplementation over a cold season and during antibiotic treatment specifically modulates the gut microbiota composition of 3-6 year-old children. *Beneficial microbes.* 2019; 10(3): 253–263. doi: 10.3920/BM2018.0116.
- Drabińska N., Krupa-Kozak, U., Abramowicz P., Jarocka-Cytra E. Beneficial effect of oligofructose-enriched inulin on vitamin D and E status in children with celiac disease on a long-term gluten-free diet: a preliminary randomized, placebo-controlled nutritional intervention study. *Nutrients.* 2018; 10(11): 1768. doi: 10.3390/nu10111768.
- Whisner C.M., Castillo L.F. Prebiotics, bone and mineral metabolism. *Calcif Tissue Int.* 2018; 102(4): 443–479. doi: 10.1007/s00223-017-0339-3.
- Coudray C., Rambeau M., Feillet-Coudray C., Tressol J.C., Demigne C., Gueu E., Maz A., Rayssiguier Y. Dietary inulin intake and age can significantly affect intestinal absorption of calcium and magnesium in rats: a stable isotope approach. *Nutrition Journal.* 2005; 4(1): 29. doi: 10.1186/1475-2891-4-29.
- Raschka L., Daniel H. Diet composition and age determine the effects of inulin-type fructans on intestinal calcium absorption in rat. *Eur. J. Nutr.* 2005; 44(6): 360–364. doi: 10.1007/s00394-004-0535-6.
- Scholz-Ahrens K.E., Schrezenmeir J. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *J. Nutr.* 2007; 137(11): 2513S–2523S.
- Samolińska W., Grela E.R. Comparative effects of inulin with different polymerization degrees on growth performance, blood trace minerals, and erythrocyte indices in growing-finishing pigs. *Biol Trace Elem Res.* 2017; 176(1): 130–142. doi: 10.1007/s12011-016-0796-y.
- Pauly M.J., Rohde J.K., John C., Evangelakos I., Ko A.C., Pertzborn P., Tödter K., Scheja L., Heeren J., Worthmann A. Inulin Supplementation Disturbs Hepatic Cholesterol and Bile Acid Metabolism Independent from Housing Temperature. *Nutrients.* 2020; 12(10): 3200. doi: 10.3390/nu12103200.
- Myhill L.J., Stolzenbach S., Mejer H., Jakobsen S.R., Hansen T.V., Andersen, D., Brix S., Hansen L.H., Krych L., Nielsen D.S., Nejsum P., Thamsborg S.M., Williams A.R. Fermentable dietary fiber promotes helminth infection and exacerbates host inflammatory responses. *J. Immunol.* 2020; 204(11): 3042–3055. doi: 10.4049/jimmunol.1901149.
- Mirmiran P., Bahadoran Z., Khalili Moghadam S., Zadeh Vakili A., Azizi F. A Prospective Study of different types of dietary fiber and risk of cardiovascular disease: Tehran lipid and glucose study. *Nutrients.* 2016; 8(11): E686. doi: 10.3390/nu8110686.
- Beketova N.A., Kodencova V.M., Vrzhesinskaja O.A., Kosheleva O.V., Pereverzeva O.G., Sokolnikov A.A., Aksenov I.V. Korrekciya poligopovitaminoza u rastushhijh krysz razlichnyimi dozami vitaminov na fone obogashennogo pishhevymi voloknami raciona. *Voprosy pitaniya.* 2014; 83(4): 29–41.
- Kodencova V.M., Leonenko S.N., Beketova N.A., Kosheleva O.V., Vrzhesinskaja O.A., Sokolnikov A.A., Shevyakova L.V., Risnik D.V., Zorin S.N. Zavisimost' jeffektivnosti korrekci deficitov vitamina D i ego posledstvij u krysz ot obespechennosti vitaminami gruppy V. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmaceuticheskoy himii.* 2021; 24(4): 4–10. doi: 10.29296/25877313-2021.
- Spirichev V.B., Kodencova V.M., Vrzhesinskaja O.A., Beketo-va N.A., Haritonchik L.A., Alekseeva I.A., Sokolnikov A.A., Risnik V.V. Metody ocenki vitaminnoj obespechennosti naselenija. *Ucheb.-metodich. Posobie. M.: PKC Al'teks, 2001; 68 s.*
- Povoroznjuk V.V., Gopkalova I.V., Grigor'eva N.V. Osoben-nosti izmenenij mineral'noj plotnosti kostnoj tkani u belyh krysz linii Vistar v zavisimosti ot vozrasta i pola. *Problemy starenija i dolgoletija.* 2011; 20(4): 393–401.
- Koterov A.N., Ushenkova L.N., Zubenkova Je.S., Vajnsjon A.A., Birjukov A.P. Sootnoshenie vozrastov osnovnyh laborator-nyh zhivotnyh (myshej, krysz, homjakov i sobak) i cheloveka: aktual'nost' dlja problemy vozrastnoj radiochuvstvitel'-nosti i analiz opublikovannyh dannyh. *Medicinskaja ra-diologija i radiacionnaja bezopasnost'.* 2018; 63(1): 5–27.
- Kodencova V.M., Vrzhesinskaja O.A. Obespechennost' de-tej vodorastvorimymi vitaminami (2015–2018 gg.). *Voprosy prakticheskoy pediatrii.* 2019; 14(2): 7–14. doi: 10.20953/1817-7646-2019-2-7-14.
- Verdaci E., Gianni M.L., Vizzari G., Vizzuso S., Cerasani J., Mosca F., Zuccotti G.V. The triad mother-breast milk-infant as predictor of future health: a narrative review. *Nutrients.* 2021; 13(2): 486. doi: 10.3390/nu13020486.
- Beketova N.A., Kodencova V.M., Vrzhesinskaja O.A., Kosheleva O.V., Pereverzeva O.G., Isaeva V.A., Pozdnjakov A.L. Vlijanie pshenichnyh otrubej na obespechennost' organizma vitaminami (jeksperiment na kryсах). *Voprosy pita-nija.* 2011; 80(6): 35–42.
- Pogozheva A.V., Kodencova V.M., Vrzhesinskaja O.A., Derbeneva S.A., Beketova N.A., Pereverzeva O.G., Kosheleva O.V. Vlijanie pishhevych volokon na usvoenie vitaminov u bol'-nyh s serdechno-sosudistymi zabolevanijami i ozhirenijem. *Voprosy pitaniya.* 2010; 79(1): 34–39.
- Kornen N.N., Viktorova E.P., Evdokimova O.V. Metodologicheskie podhody k sozdaniyu produktov zdorovogo pi-taniya. *Voprosy pitaniya.* 2015(1): 95–99.
- Pilipenko V.I., Teplyjko D.A., Shahovskaja A.K., Isakov V.A., Vorob'eva V.M., Vorob'eva I.S., Glazkova I.V., Kochetkova A.A., Miheeva G.A., Judina A.V. Jeffektivnost' specializirovannogo pishhevoogo produkta (kiselja s vitaminami i pishhevymi voloknami) u bol'nyh s sindromom razdra-zhennogo kishechnika s zaporamami: sravnitel'noe kontro-liruemoje issledovanie. *Voprosy pitaniya.* 2015; 84(6): 83–91.
- Kodencova V.M., Vrzhesinskaja O.A. Vitaminno-mineral'nye komplekсы: sootnoshenie doza – jeffekt. *Voprosy pitaniya.* 2006; (1): 30–39.
- Shih E.V., Solov'eva S.A., Perkov A.V. Sinergizm kompo-nentov kak osnovnoj podhod k formirovaniyu probioticheskogo kompleksa. *Medicinskij Sovet.* 2020; (5): 120–127.
- Kodencova V.M., Zhilinskaja N.V., Shpigel' B.I. Vitaminiologija: ot molekulyarnych aspektov k tehnologijam vitaminizacii detskogo i vzroslogo naselenija. *Voprosy pitaniya.* 2020; 89(4): 89–99.