

- населения: мат. I Всерос. конф. Новосибирск, 2006. С. 30–33.
5. Тутьельян В.А. Сбалансированное питание – основа процветания нации // Здоровое питание: воспитание, образование, реклама: мат. VI Всерос. конф. М.: БАД-бизнес, 2001.
6. Тутьельян В.А., Суханов Б.П., Васильев А.В. и др. Реализация концепции государственной политики здорового питания населения России на региональном уровне: формирование региональной политики и региональных программ. Методические аспекты разработки и реализации программ // Центры оздоровительного питания – региональная политика здорового питания населения: мат. I Всерос. конф. Новосибирск, 2006. С. 9–15.
7. Хотимченко Ю.С. Биологически активные добавки к пище: законодательная база и применение в медицине // Тихоокеанский медицинский журнал. 2006. № 3. С. 19–22.
8. Annette. *Per Mineral wassermarkt. Wilke-weichbrodt // Getränkeindustrie*. 2005. No. 4. P. 12–15.
9. Wright R. *Nutraceutical beverage update // Nutraceutical World*. 2005. No. 11. P. 33–35.

Поступила в редакцию 25.03.2009.

TREATMENT OF DISORDERS IN ADAPTATION-COMPENSATORY MECHANISMS WITH FUNCTIONAL MINERAL WATER-BASED BEVERAGES UNDER UNFAVORABLE ENVIRONMENTAL CONDITIONS
M.V. Palagina¹, Ya.V. Dubnyak¹, T.A. Gvozdenko², T.P. Novgorodtseva²

¹ Pacific State University of Economics (19 Okeanskiy Av. Vladivostok 690091 Russia), ² Research Institute of Medical Climatology and Medical Rehabilitation of the Siberian Branch of RAMS (43g Russkaya St. Vladivostok 690105 Russia)

Summary – The authors present results of studies into functional efficiency of nonalcoholic beverages “Vkus Zdorovya” prepared from mineral water and nutraceutical compound in treating disorders of adaptation compensatory mechanisms. Regular intake of the beverage during three months in the volume of 200 ml per day has general and specific effects on human organism, increase adaptation compensatory reserve and resistivity to exogenous and endogenous actions.

Key words: nutrients, functional beverages.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 1, p. 66–68.

УДК 612.111:616.89-008.441.13-085.32:634.745

Т.В. Кушнерова

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ОЛИГОМЕРНЫХ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ В ВОССТАНОВЛЕНИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ

Ключевые слова: эритроциты, липиды, антиоксидантная активность, олигомерные проантоцианидины.

Исследовано влияние природного комплекса олигомерных проантоцианидинов (КОПЦ), выделенного из водно-спиртового экстракта калины, на физиологические и структурные характеристики мембран эритроцитов больных алкоголизмом II стадии. Для сравнения использовали стандартный препарат «Легалон». Показано, что применение КОПЦ совместно со стандартной терапией способствовало более быстрому восстановлению липидной составляющей мембран эритроцитов. При этом нормализовался уровень малонового диальдегида, антирадикальная активность и осмотическая устойчивость эритроцитов к гемолизирующему агенту. Введение КОПЦ в общую терапию снимало состояние оксидативного стресса, усиливало антирадикальную защиту и восстанавливало соотношение индивидуальных липидных компонентов в мембранах.

В процессе метаболизма этанола в организме в результате активации микросомальных ферментов монооксигеназной системы образуются гидроксипероксидные свободные радикалы и супероксиданионы, которые обуславливают процесс радикального и оксидативного разрушения мембранных фосфолипидов [7, 13]. Мембрана эритроцита – наиболее удачная биологическая модель для изучения динамики мембранных нарушений, возникающих в организме при алкогольной интоксикации. Мембранотропные эффекты этанола связывают с внедрением его молекул между полярными головками фосфолипидов, что приводит к уменьшению плотности упаковки последних, облегчению доступа кислорода к двойным связям ненасыщенных

жирных кислот и активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). В результате нарушается соотношение липидных компонентов мембран, повышается их текучесть, что обуславливает увеличение среднего объема и диаметра эритроцита, развитие макроцитоза [6]. Вместе с тем изучение физиологических характеристик и липидной составляющей мембран эритроцитов для анализа эффективности терапевтического воздействия при алкоголизме не получило должного развития. Применение препаратов, осуществляющих защиту мембранных структур от действия радикалов при алкогольном поражении, является важным этапом системы комплексной реабилитации во время стационарного лечения и после него.

Как было показано ранее, отмена этанола у экспериментальных животных в течение 7 дней после 7-дневного внутривенного введения в дозе 7,5 мл/кг сопровождалось неполным восстановлением физиологических параметров и липидной составляющей мембран эритроцитов, что определяло сохранение стрессовой реакции после воздействия токсического агента [4]. В связи с этим одним из путей восстановления нарушенных этанолом структурных характеристик мембран эритроцитов является использование растительных полифенольных комплексов, в частности водно-спиртового экстракта из калины (*Viburnum Sargentii*), обладающего высокой антирадикальной и антиоксидантной активностью, что обуславливает его мембранопротекторный эффект [5, 8]. Из экстракта калины был выделен комплекс олигомерных проантоцианидинов (КОПЦ), обеспечивающий вышеназванные

Кушнерова Татьяна Викторовна – канд. мед. наук, н.с. лаборатории фармакологии Института биологии моря: тел.: 8 (4232) 31-09-05; e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru.

свойства экстракта [9, 10]. В настоящее время отмечается повышенный интерес к биологически активным добавкам, содержащим комплексы олигомерных проантоцианидинов в связи с их способностью «гасить» радикальные реакции в организме [11]. За это свое свойство КОПЦ получили название «гормона молодости». В основе строения соединений, входящих в эту группу, лежат две мономерные единицы – катехин и эпикатехин, а также их галлоильные производные. Благодаря способности этих соединений образовывать полимерные структуры из двух и более субъединиц и образуются КОПЦ [14].

Так как водно-спиртовые экстракты противопоказано использовать в качестве вспомогательной терапии больным алкоголизмом, то наиболее перспективным является именно КОПЦ, представляющий собой желто-белый порошок, который можно четко дозировать. КОПЦ запатентован как биологически активная добавка к пище (патент RU № 2199249).

Целью настоящей работы было исследование влияния растительного комплекса олигомерных проантоцианидинов из калины на восстановление физиологических и структурных характеристик мембран эритроцитов при реабилитации больных алкоголизмом.

Материал и методы. Экстрагирование растительного сырья, полученного после отжима сока калины, проводили традиционным способом реперколяции. Полученный экстракт упаривали под вакуумом и из оставшейся субстанции выделяли КОПЦ по описанному ранее методу [8].

В контрольную группу включено 84 психически и соматически здоровых доноров, у которых исключался эпизодический прием спиртных напитков в течение двух недель перед биохимическим исследованием. Одновременно в эксперименте приняли добровольное участие 30 мужчин в возрасте от 30 до 40 лет с диагнозом хронический алкоголизм II стадии, которые проходили лечение в наркологической клинике Владивостока. Исследование эритроцитов проводили на 5-й день после поступления больных в стационар с целью исключения острого влияния алкоголя. Впоследствии из них были сформированы 2 группы по 10 человек: больные, получавшие стандартную терапию (дезинтоксикационные и симптоматические средства) в комплексе с известным коммерческим полифенольным препаратом «Легалон» (Madaus AG, Германия) из плодов расторопши пятнистой (*Silbum marianum*), другая – аналогичную стандартную терапию в комплексе с КОПЦ в течение курса лечения. При этом обследуемые получали КОПЦ в виде водного раствора по 100 мг 3 раза в сутки или коммерческий полифенольный препарат «Легалон» по той же схеме и в той же дозе, которая является рекомендуемой суточной дозой для полифенольных соединений [1]. По окончании лечения пациенты были выписаны из стационара, но продолжали принимать в течение месяца вышеназванные растительные комплексы в качестве поддерживающей терапии (по 100 мг 2 раза в сутки).

Таким образом, в ходе исследования были выделены следующие группы: 1-я группа – контроль (здоровые доноры), 2-я группа – больные до лечения, 3-я группа – лечение стандартной терапией + легалон, 4-я группа – лечение стандартной терапией + КОПЦ, 5-я группа – легалон, 6-я группа – КОПЦ.

Выделение эритроцитов из гепаринизированной крови и экстрактов общих липидов из них осуществляли традиционными методами [2, 12]. Хроматографическое распределение и количественное определение нейтральных липидов проводили методом одномерной тонкослойной хроматографии на силикагеле в системе растворителей (гексан, серный эфир, уксусная кислота – 90:10:1). Хроматографические пластинки визуализировали в йодной камере. Фракционное разделение фосфолипидов осуществляли методом двумерной тонкослойной хроматографии. Пятна липидов идентифицировали с помощью коммерчески допустимых очищенных стандартов. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы нейтральных липидов и фосфолипидов соответственно. Интенсивность ПОЛ в эритроцитах оценивали по содержанию вторичных продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, антиоксидантный статус определяли по величине показателей антирадикальной активности в эритроцитах, осмотическую резистентность – по завершении гемолиза в растворах NaCl.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Сравнительный анализ показателей системы «ПОЛ – антиоксидантная защита» эритроцитов у здоровых доноров и больных алкоголизмом показал у последних высокий уровень малонового диальдегида, который на 94% превышал контрольную величину ($6,87 \pm 0,10$ против $3,54 \pm 0,11$ нмоль/мл). В то же время отмечено характерное снижение антирадикальной активности на 11%, что составляло 1099 ± 19 ед. тролокса/мл по сравнению с 1232 ± 16 ед. тролокса/мл в контроле. При этом начало гемолиза происходило при $0,55 \pm 0,01\%$ NaCl (в контроле – при $0,45 \pm 0,01\%$), а окончание при $0,45 \pm 0,01\%$ (в контроле – при $0,35 \pm 0,01\%$). Это свидетельствовало о повышении проницаемости мембран эритроцитов и снижении их устойчивости к гемолизирующему агенту.

При анализе количественных характеристик фракций нейтральных липидов в эритроцитах больных алкоголизмом следует отметить достоверное повышение уровня триацилглицеринов (на 20%), эфиров жирных кислот (на 13%) и холестерина (на 16%). Одновременно было снижено (на 45%) содержание эфиров холестерина (табл. 1). Такое соотношение нейтральных липидов в эритроцитарной мембране больных алкоголизмом обуславливает увеличение жесткости и снижение лабильности.

Наиболее значимые и статистически достоверные изменения были найдены в фосфолипидном составе эритроцитов больных алкоголизмом. Отмечалось снижение количества основных структурных компонентов

Таблица 1

Влияние легалона и КОПЦ на содержание фракций нейтральных липидов в эритроцитах больных алкоголизмом
(в % от суммы всех фракций, $M \pm m$)

Фракции липидов	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа
Триацилглицерины	15,89±0,73	19,74±1,23 ¹	17,37±0,82	15,90±0,76	16,00±0,80	15,90±0,79
Свободные жирные кислоты	21,26±0,84	20,35±0,76	20,98±1,27	20,97±1,11	21,00±1,20	21,00±1,17
Эфиры жирных кислот	18,33±0,66	20,68±0,63 ¹	18,41±0,73	18,00±0,67	18,10±0,70	18,13±0,69
Холестерин	24,36±0,86	28,26±0,75 ¹	28,50±0,82 ¹	26,59±0,76	26,73±0,89	24,18±0,80
Эфиры холестерина	14,26±0,83	7,82±0,98 ¹	10,26±0,64 ¹	12,56±0,73	15,00±0,84	15,60±0,77
Остаточная фракция	5,90±0,36	3,15±0,32	4,48±0,21	5,98±0,32	3,17±0,11	5,19±0,44

¹ Разница с контролем статистически значима.

Таблица 2

Влияние легалона и КОПЦ на содержание фосфолипидных фракций в эритроцитах больных алкоголизмом
(в % от суммы всех фракций, $M \pm m$)

Фракции липидов ¹	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа	5-я группа	6-я группа
ФХ	33,27±1,46	25,27±1,66 ²	29,35±0,98 ²	31,81±1,45	31,09±1,23	33,43±1,31
ЛФХ	2,43±0,32	5,32±0,29 ²	4,77±0,31 ²	3,90±0,26 ²	3,60±0,17 ²	2,74±0,08
СМ	21,13±0,77	23,62±0,83 ²	21,50±1,64	20,52±1,18	21,20±0,95	21,49±0,97
ФЭ	20,89±1,16	17,31±1,19 ²	18,70±1,12	20,18±0,84	18,95±0,87	20,73±0,95
ЛФЭ	2,09±0,21	6,34±0,41 ²	5,46±0,25 ²	2,30±0,17	3,93±0,09 ²	2,07±0,11
ФС	10,19±0,49	12,12±0,63 ²	10,85±0,59	10,43±0,22	10,90±0,34	9,37±0,26
ФИ	6,79±0,22	4,16±0,23 ²	6,10±0,35	6,86±0,15	6,85±0,16	6,28±0,13
ФК	3,26±0,08	3,22±0,07	3,36±0,21	4,00±0,07 ²	3,48±0,10	3,89±0,11 ²
ЛФК	—	2,64±0,18	—	—	—	—

¹ ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтанолламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота, ЛФК – лизофосфатидная кислота.

² Разница с контролем статистически значима.

мембран: фосфатидилхолина (на 24%) и фосфатидилэтанолламина (на 17%). Одновременно в 2 раза увеличивалось количество лизофосфатидилхолина, а лизофосфатидилэтанолламина – в 3 раза. Возрастал уровень сфингомиелина (на 12%) и изменялось соотношение метаболически активных фракций: увеличивалась концентрация фосфатидилсерина (на 19%) и уменьшалось содержание фосфатидилинозита (на 38%). Интересным фактом является появление новой фракции фосфолипидов – лизофосфатидной кислоты (табл. 2). Появление этой фракции в эритроцитах больных алкоголизмом отмечалось и ранее [3]. Все это подтверждало высокую активность фосфолипаз и процессов перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов.

На основании вышеизложенного следует заметить, что перераспределение в мембране эритроцитов липидных фракций в пользу холестерина, триацилглицеринов, сфингомиелина, лизофосфолипидов предполагает изменение ее физико-химических свойств и проницаемости, что является адаптацией липидного бислоя к разжижающему действию этанола.

Применение в процессе терапии легалона и КОПЦ из экстракта калины изменило характеристики исследованных параметров. Так, концентрация малонового диальдегида при применении легалона превышала контрольный уровень на 41% ($5,00 \pm 0,05$ нмоль/мл), а при применении КОПЦ – на 13% ($4,00 \pm 0,06$ нмоль/мл). При этом антирадикальная активность возросла (1099 ± 19 и 1138 ± 20 ед. тролокса/мл соответственно).

Сдвинулся порог начала (до $0,50 \pm 0,01\%$ NaCl) и окончания (до $0,40 \pm 0,01\%$ NaCl) гемолиза при применении легалона, а при применении КОПЦ – до $0,45 \pm 0,01$ и $0,35 \pm 0,01\%$ NaCl соответственно.

Анализ количественных характеристик нейтральных липидов в эритроцитах 3-й и 4-й групп показал, что при применении легалона осталось повышенным содержание холестерина (на 17%) и сниженным – эфиров холестерина (на 28%). Применение КОПЦ полностью восстановило показатели нейтральных липидов до контрольных значений. Терапия с легалоном не восстановила соотношение фосфолипидных фракций в эритроцитах больных 3-й группы. Осталось сниженным содержание фосфатидилхолина (на 12%), а также повышенным количество лизофосфатидилхолина (на 96%) и лизофосфатидилэтанолламина (на 160%). При применении КОПЦ почти все изученные фракции фосфолипидов восстановились до контрольного уровня, за исключением уровней лизофосфатидилхолина (повышенного на 60%) и фосфатидной кислоты (повышенного на 23%). Следует заметить, что у больных 3-й и 4-й групп после лечения отсутствовала фракция лизофосфатидной кислоты, то есть произошло снижение активности фосфолипаз и интенсивности ПОЛ. Однако эффективность легалона в процессе восстановления липидной составляющей мембран эритроцитов была ниже, чем таковая у КОПЦ.

Применение легалона и КОПЦ в течение месяца после выписки нормализовало все исследованные

показатели системы «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» и восстановило осмотическую резистентность эритроцитов к гемолизирующему агенту. Более того, увеличился интервал осмотической устойчивости: окончание гемолиза происходило при концентрации NaCl в $0,30 \pm 0,01\%$.

В спектре нейтральных липидов отмечалось полное восстановление до контрольного уровня всех исследованных фракций. Анализ фосфолипидного состава эритроцитарных мембран показал, что применение легалона в течение месяца после стационарного лечения не полностью восстановило соотношение фракций. Оставалось повышенным количество лизофосфатидилхолина (на 48%) и лизофосфатидилэтаноламина (на 88%). То есть сохранялась активность фосфолипаз. При применении КОПЦ соотношение фосфолипидных фракций полностью соответствовало таковому в контроле.

Таким образом, комплекс олигомерных проантоцианидинов из калины обладает выраженным мембранопротекторным эффектом. Биохимический механизм действия легалона и КОПЦ обусловлен тем, что растительные полифенолы имеют способность улавливать свободные окисленные и пероксильные радикалы, образуя при этом относительно стабильный феноксил-радикал, взаимодействие которого с другими свободными радикалами приводит к обрыву цепи свободнорадикального процесса. [15]. Это в значительной степени сдерживает ПОЛ и снимает состояние оксидативного стресса. В результате уменьшается уровень малонового диальдегида и увеличивается антирадикальная активность, что свидетельствует об увеличении антиоксидантного статуса. Однако при сравнении выраженности антиоксидантного действия (по малоновому диальдегиду и антирадикальной активности) легалона и КОПЦ проявляются определенные преимущества последнего. Известно, что в состав легалона входит активная группа изомерных флавоноидных содинений (силибинин, силикристин, силидианин), не образующих олигомерных форм. Видимо КОПЦ, будучи полимерными веществами, демонстрируют антирадикальные свойства в большей степени, чем мономеры легалона.

Проведенные исследования показали эффективность включения КОПЦ в комплексную терапию больных алкоголизмом. КОПЦ, выделенный из экстракта калины, положительно влияет на процесс восстановления липидной составляющей мембран эритроцитов и повышает антиоксидантный статус организма.

Литература

1. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатопротективных средств // *Ведомости фарм. комитета*. 1999. № 2. С. 9–12.
2. Гончаренко М.С., Латинова А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов // *Лаб. дело*. 1985. № 1. С. 60–61.
3. Кушнерова Н.Ф. Сравнительная характеристика липидного состава сыворотки крови у лиц, злоупотребляющих алкоголем, и больных алкоголизмом // *Вопросы наркологии*. 1992. № 2. С. 12–15.

4. Кушнерова Н.Ф., Лесникова Л.Н. Влияние хаурантина на процессы восстановления липидной составляющей мембран эритроцитов после поражения этиловым спиртом // *Наркология*. 2003. № 5. С. 25–28.
5. Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Рахманин Ю.А. Регуляция метаболизма этилового спирта в организме олигомерными проантоцианидинами как способ профилактики его токсического воздействия // *Гигиена и санитария*. 2003. № 5. С. 58–61.
6. Прокофьева В.Д., Бохан Н.А., Кондакова И.В. Влияние этанола и ацетальдегида на микровязкость мембран эритроцитов больных алкоголизмом на разных этапах лечения // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 2000. № 129. С. 90–92.
7. Сторожок С.А., Панченко Л.Ф., Филиппович Ю.Д., Глушков В.С. Изменения физико-химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу // *Вопросы медицинской химии*. 2001. № 2. С. 47–53.
8. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф. Калина – новый нетрадиционный источник олигомерных проантоцианидинов // *Химико-фармацевт. журн.* 2004. Т. 38, № 2. С. 41–45.
9. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф. Природные олигомерные проантоцианидины – перспективные регуляторы метаболических нарушений // *Вестник ДВО РАН*. 2006. № 2. С. 81–90.
10. Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Кушнерова Т.В. Обоснование применения проантоцианидинов в комплексной терапии хронического алкоголизма // *Наркология*. 2007. № 7. С. 46–51.
11. Bagchi D., Garg A., Krohn R. et al. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins c and e, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro // *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1997. Vol. 95, No. 2. P. 179–189.
12. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue // *Biol. Chem.* 1957. Vol. 226. P. 497–509.
13. Lieber C.S. Metabolism of alcohol // *Clin. Liver Dis.* 2005. Vol. 9. P. 1–35.
14. Santos-Buelga C., Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health // *J. Sci. Food Agric.* 2000. Vol. 80, No. 7. P. 1094–1117.
15. Sanz M.J., Ferrandiz M.L., Cejudo M. et al. Influence of a series of natural flavonoids on free-radical generating systems and oxidative stress // *Xenobiotica*. 1994. Vol. 24, No. 7. P. 689–699.

Поступила в редакцию 28.12.2007.

EFFICIENCY OF THE APPLICATION OF THE OLIGOMER PROANTHOCYANIDINES IN THE RESTORATION OF PHYSIOLOGICAL AND STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF THE RBC OF ALCOHOLIC PATIENTS

T.V. Kushnerova

Institute of Marine Biology named by A.V. Zhirmunsky of the Far-Eastern branch of the Russian Academy of Science (17 Pal'chevskogo St. Vladivostok 690041 Russia)

Summary – The influence of the natural complex of oligomer proanthocyanidine (COPC), allocated of water-alcohol extract of a guilder-rose (*Viburnum Sargentii*) on physiological and structural characteristics of RBC membranes of the chronic alcoholic patients of the II stage, taking place on treatment in narcological clinic is investigated. For the comparison the standard medication “Legalon” was used. It is shown, that application of COPC together with standard therapy promoted faster restoration of the lipid component of RBC membranes than at patients in which only legalon therapy has been used. Thus the level of the malone dialdehyde, antiradical activity and RBC osmotic stability to the hemolyzing agent was normalized. Introduction of COPC in the general therapy removed oxidative stress, strengthened antiradical protection and restored a ratio of the individual lipid components in membranes.

Key words: RBC, lipids, antioxidation activity, oligomer proanthocyanidine.