



(51) МПК
A23L 1/29 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23G 1/30 (2006.01)
A23L 1/00 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010107451/13, 04.07.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 04.07.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 02.08.2007 EP 07113732.7

(43) Дата публикации заявки: 10.09.2011 Бюл. № 25

(45) Опубликовано: 27.02.2013 Бюл. № 6

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EP 1671963 A1, 21.06.2006. US 2005/0004046 A1, 06.01.2005. CHEN J D ET AL «The effect of a chocolate bar supplementation on moderate exercise recovery of recreational runners», BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES: BES September 1996, vol 9, no 2-3, pages 247, 249, 253-255. RU 2290943 C2, 10.01.2007.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 02.03.2010

(86) Заявка РСТ:
 EP 2008/058689 (04.07.2008)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2009/015996 (05.02.2009)

Адрес для переписки:
 109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
 "Союзпатент"

(72) Автор(ы):

**ЧОУ Чьех Джейсон (СН),
 КУПЕР Карен Энн (СН),
 УИЛЬЯМСОН Гэри (GB),
 ГЛИСОН Майкл (GB),
 ДЭВИСОН Глен (GB)**

(73) Патентообладатель(и):
НЕСТЕК С.А. (СН)

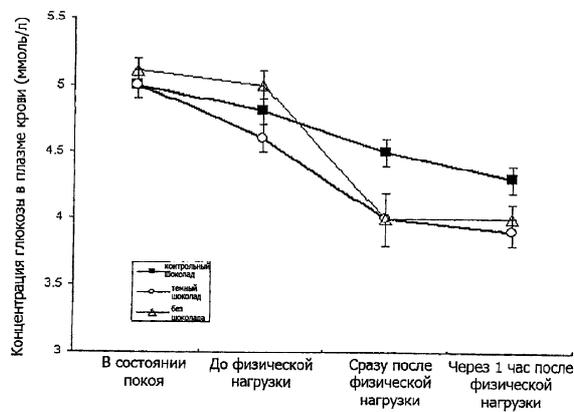
(54) СОКРАЩЕНИЕ УЩЕРБА ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ПРОЦЕССЕ И ПОСЛЕ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к применению, по меньшей мере 25 мг полифенолов для изготовления продукта, предназначенного для потребления до или в процессе физической нагрузки для подавления снижения содержания глюкозы в крови после физической нагрузки. Как вариант, изобретение относится к применению, по меньшей мере, 25 мг

полифенолов для изготовления продукта, предназначенного для потребления до или в процессе физической нагрузки для увеличения содержания полифенолов в крови после физической нагрузки. Как вариант, изобретение относится к применению от 5 мг до 200 мг одного или более полифенолов для изготовления продукта, предназначенного для ежедневного потребления для подавления

снижения содержания глюкозы в крови после физической нагрузки у лица, регулярно занимающегося физическими упражнениями. 3 н. и 16 з.п. ф-лы, 3 ил., 6 табл., 2 пр.



Фиг. 3

RU 2476092 C2

RU 2476092 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A23L 1/29 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23G 1/30 (2006.01)
A23L 1/00 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010107451/13, 04.07.2008**

(24) Effective date for property rights:
04.07.2008

Priority:

(30) Convention priority:
02.08.2007 EP 07113732.7

(43) Application published: **10.09.2011 Bull. 25**

(45) Date of publication: **27.02.2013 Bull. 6**

(85) Commencement of national phase: **02.03.2010**

(86) PCT application:
EP 2008/058689 (04.07.2008)

(87) PCT publication:
WO 2009/015996 (05.02.2009)

Mail address:
**109012, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent"**

(72) Inventor(s):
**ChOU Ch'ekh Dzhejson (CH),
KUPER Karen Ehnn (CH),
UIL'JaMSON Gehri (GB),
GLISON Majkl (GB),
DEhVISON Glen (GB)**

(73) Proprietor(s):
NESTEK S.A. (CH)

(54) **REDUCTION OF DETRIMENT CAUSED BY OXIDATIVE STRESS IN PROCESS OF AFTER PHYSICAL ACTIVITIES**

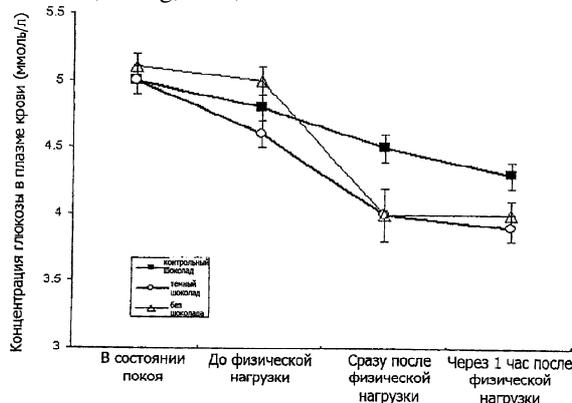
(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: invention relates to application of at least 25 mg of polyphenols for manufacture of a product intended for consumption before or in the process of physical activities for suppression of glucose content reduction in blood after physical activities. Alternatively, the invention relates to application of at least 25 mg of polyphenols for manufacture of a product intended for consumption before or in the process of physical activities for polyphenols content increase in blood after physical activities.

EFFECT: invention relates to application of 5 mg - 200 mg of one or more polyphenols for manufacture of a product intended for daily consumption for suppression of glucose content

reduction in blood after physical activities with a person physically active on regular basis.
19 cl, 3 dwg, 6 tbl, 2 ex



ФИГ. 3

RU 2 476 092 C2

RU 2 476 092 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к сокращению обусловленного окислительным стрессом повреждения тканей в ходе или после физической нагрузки путем потребления полифенолов, конкретнее - путем потребления полифенолов какао, как, например, катехина и эпикатехина и родственных процианидинов, например, путем потребления темного шоколада, какао-массы или какао-порошка.

Уровень техники

Хорошо известно, что физическая нагрузка вызывает повреждение работающих мышц, обусловленное окислительным стрессом - образованием свободных радикалов и других активных форм кислорода (ROS). Эти соединения вызывают окисление белков, возможно, давая вклад в развитие мышечной усталости. Мышечные клетки могут быть защищены от этих ROS совместным действием собственных защитных механизмов, в которых играют роль антиоксиданты. Обусловленные окислительным стрессом феномены считались вредоносными и потому нежелательными, однако недавние исследования заставляют полагать, что в некоторой степени окислительный стресс нужен для нормальной физиологической адаптации к физической нагрузке и оптимизации тренировки (Gomez-Cabrera et al., 2005, 2008). Отсюда делается предположение, что регулярный прием антиоксидантных витаминов в высоких дозах может ослабить благоприятную адаптацию при физической тренировке (Padilla & Mickleborough, 2007). Но этот вопрос остается спорным, да и мало что известно о потенциальном эффекте регулярного приема полифенолов в сравнении с антиоксидантными витаминами С и Е.

Имеются некоторые свидетельства того, что антиоксидантные биологически активные добавки могут улучшать выполнение человеком физической работы/спортивного упражнения и уменьшать иммунодепрессию (т.е. подверженность таким состояниям, как инфекции дыхательных путей), которая может быть следствием интенсивной физической нагрузки; правда, в большинстве своем эти данные касаются лишь витаминов С или Е, а не тех антиоксидантов, которые обычно встречаются в природе.

Известно, что полифенолы обладают выраженными антиоксидантными свойствами; эти вещества присутствуют во многих растительных источниках: какао, чае, многих фруктах (в том числе в ягодах). Одним из богатейших источников различных антиоксидантных полифенолов является темный шоколад. Содержащиеся в какао-бобах полифенолы, в особенности катехин и эпикатехин, будучи амфипатическими, могут проявлять свое антиоксидантное действие как в липидном, так и в водном окружении, т.е. способны заменять как липофильные, так и гидрофильные эндогенные антиоксиданты, например витамины. Имеются также данные о том, что полифенолы могут вызывать расширение кровеносных сосудов, тем самым способствуя кровоснабжению мышц, что важно и для выполнения физической работы (спортивных упражнений), и для восстановления после нее; кроме того, полифенолы, во-видимому, отсрочивают окисление липопротеинов низкой плотности (LDL). По наблюдениям Kondo et al. (1996) после потребления 35 г обезжиренного какао снижается подверженность окислению липопротеинов низкой плотности (LDL) плазмы крови.

В других исследованиях продемонстрировано благотворное влияние постоянного потребления какао или темного шоколада у здоровых испытуемых (обычно потребление темного шоколада составляло 100 г/сут в течение 2 недель или более) на кровяное давление в состоянии покоя и на чувствительность к инсулину (Grassi et al.,

2005) или на профиль холестерина (повышение концентрации липопротеинов высокой плотности - HDL) и понижение восприимчивости LDL к окислению *ex vivo* (Mursu et al., 2004).

5 В патенте US 6297273 B1 раскрываются экстракты какао и содержащиеся в них такие соединения, как полифенолы, предпочтительно полифенолы, обогащенные процианидинами, и их применение; например, в качестве агентов, противодействующих неоплазии, антиоксидантов, ингибиторов ДНК-топоизомеразы II, модуляторов циклооксигеназы и/или липоксигеназы, модуляторов оксида азота (NO) или NO-синтазы, в качестве нестероидных противовоспалительных средств, модуляторов апоптоза, модуляторов агрегации тромбоцитов, уровня глюкозы в крови *in vivo*, противомикробных агентов и ингибиторов окислительного повреждения ДНК.

15 В Примере 27 описано влияние полифенолов какао на пищевое насыщение; уровни глюкозы в крови использовались как показатели сигнальных процессов, происходящих *in vivo* для регуляции аппетита и насыщения; был осуществлен ряд простых опытов на испытуемых-добровольцах (здоровых мужчинах в возрасте 48 лет) с целью определить, влияют ли полифенолы какао на уровень глюкозы. В полифенолах какао отсутствуют кофеин и теобромин. Уровень глюкозы в крови натошак определяли в зависимости от времени после приема внутрь 10 унций напитка Dexicola 75 (не содержащего кофеина) из набора для определения толерантности к глюкозе с 75 мг полифенолов какао и без них. Уровень глюкозы в крови измеряли перед приемом тестового напитка и после него со следующими временными интервалами: 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 и 180 минут. Испытывали также контрольный тестовый раствор, который содержал 75 мг полифенолов какао, растворенных в 10 унциях дистиллированной воды (без глюкозы).

30 Фигура 32 демонстрирует, что имело место значительное повышение уровня сахара в крови, измеренного вскоре после приема испытываемой смеси, содержащей полифенолы какао и сахар, однако очевидно, что в случае напитка из набора для определения толерантности к глюкозе, содержащего полифенолы и сахар, уровень глюкозы в крови через 180 минут ниже, чем в двух контрольных группах.

35 Но в работе, описанной в патенте US 6297273 B1, в экспериментах использовались лишь малые количества полифенолов (75 мг) и не упоминались опыты, проделанные после физической нагрузки или в состоянии стресса.

40 Установлено также, что полифенолы влияют на транспорт глюкозы через транспортные структуры GLUT 1 и GLUT 4 (Strobel et al., 2005). И в противоположность этому показано, что полифенолы (особенно эпигаллокатехин-галлат и эпикатехин-галлат) увеличивают активность инсулина *in vitro* в экспериментах с потенцированием действия инсулина в жировых клетках яичка с адипоцитами крысы (Anderson & Polansky, 2002). Мало что известно о влиянии полифенолов на гормональный, цитокиновый и иммунный ответы на физическую нагрузку, и лишь немногочисленные работы посвящены возможному модулированию окислительного стресса, связанного с физической нагрузкой, при помощи пищевых продуктов, содержащих какао.

50 Адекватное потребностям организма наличие доступных для утилизации углеводов имеет большое значение для выполнения физической работы, причем важным источником энергии служит содержащаяся в плазме крови глюкоза. Если в организме недостаточны запасы углеводов, быстрее наступает усталость. Было установлено, что потребление богатого углеводами шоколадного батончика до выполнения физических

упражнений повышает уровень глюкозы в крови, измеряемый за 15 минут до физической нагрузки, поддерживает значительно более высокий уровень глюкозы в крови в ходе выполнения физической работы и после нее, чем наблюдается при потреблении плацебо - не содержащего углеводов диетического напитка (Biomedical and Environmental Sciences 9, 247-255 (1996), Chen et al.). Авторы этой работы относили наблюдаемый эффект на счет того, что в шоколадном батончике содержится немало углеводов (56-граммовый шоколадный батончик содержит 36 г углеводов, давая 281 ккал); такое объяснение весьма правдоподобно. Однако, поскольку в контрольном опыте углеводы не потреблялись, только и возможно говорить о роли углеводов, не углубляясь в свойства какао или шоколада. Вероятно также, что использовавшиеся в этой работе шоколадные батончики содержали очень мало какао; авторы не делают предположений о влиянии какао. Наблюдавшийся ими эффект, скорее всего, обусловлен содержанием сахаров.

В работе Cesar G.Fraga et al. (Clinical & Developmental Immunology, March 2005; 12 (I): 11-17) раскрывается, что регулярное потребление (в течение 14 суток) шоколада, а именно ежедневно по плитке молочного шоколада весом 105 г, содержащей 168 мг флавонолов (из которых 39 мг составляли эпикатехин и катехин) может ослабить эффект окислительного стресса и улучшить состояние сердечно-сосудистой системы у молодых тренированных футболистов. Однако в молочном шоколаде, который использовался в этой работе, содержалось немного флавонолов (полифенолов) и уровни глюкозы в крови через 14 дней потребления шоколада оказались ниже базовых значений. Не исследовалось влияние полифенолов какао на регуляцию содержания глюкозы в крови после продолжительной физической нагрузки и скорость восстановления после нее.

В последнее время не было публикаций, посвященных влиянию значительного потребления темного шоколада на регуляцию содержания глюкозы в крови или на окислительный стресс после продолжительной (более 2 часов) физической нагрузки. Ни в одном из вышеупомянутых документов не утверждается и не предполагается, что потребление полифенолов может уменьшить связанные с физической нагрузкой усталость и повреждение мышц, улучшить выполнение физических упражнений и ускорить восстановление после нагрузки; ничего не говорится и о том, что указанное потребление может подавить снижение уровня глюкозы в крови после физической нагрузки вне зависимости от потребления углеводов и жиров.

Темный шоколад также содержит кофеин, который повышает работоспособность, стимулируя мобилизацию жирных кислот из жировых запасов (путем активации липолиза) и сберегая гликоген, в то же время стимулируя также центральную нервную систему и увеличивая возбудимость мышц.

Большинству клеток организма основным источником энергии служит глюкоза, и глюкоза, содержащаяся в крови, является важным источником энергии для физической работы и для мозга. Уровень глюкозы в крови строго контролируется и поддерживается в пределах 70-140 мг/дл (3,9-7,8 ммоль/литр) в основном с помощью таких гормонов, как инсулин и глюкагон. Сразу после приема пищи уровень глюкозы в крови возрастает и превышает немедленные энергетические потребности организма. Избыток глюкозы запасается в организме в виде гликогена в печени и мышцах или в виде жировых отложений. В ходе продолжительной физической нагрузки снижение содержания глюкозы в крови часто ассоциировано с утомлением; известно, что в процессе и после выполнения физической работы уровень глюкозы в крови снижается. Таким образом, считается, что адекватная доступность углеводов важна для

выполнения физической работы и потребление экзогенных углеводов улучшает выполнение упражнений в процессе напряженной и продолжительной физической нагрузки.

Однако, хотя потребление углеводов перед физической нагрузкой для повышения уровня глюкозы в крови может в некоторой степени ослабить утомление и повреждение мышц, улучшить выполнение упражнений и способствовать восстановлению после нагрузки, оно не может предотвращать ущерб от окислительного стресса, например, в мышцах.

Раскрытие изобретения

Обнаружено, что потребление по меньшей мере 25 мг полифенолов до или в процессе продолжительной или напряженной физической нагрузки может ослабить обусловленное окислительным стрессом повреждение тканей в ходе или после физической работы. Оно может также подавить снижение уровня глюкозы в крови после физической нагрузки независимо от потребления жиров и углеводов, что указывает на стимуляцию глюконеогенеза (образования новых молекул глюкозы) или гликогенолиза в печени (расщепления запасенного гликогена с высвобождением глюкозы для ее утилизации), которая в свою очередь влияет на выполнение спортивных упражнений или восстановление после физической нагрузки.

Соответственно, настоящее изобретение относится к применению по меньшей мере 25 мг полифенолов для изготовления продукта, предназначенного для потребления до или в процессе физической нагрузки для уменьшения ущерба от окислительного стресса в процессе или после нее.

Уменьшение ущерба от окислительного стресса может быть выражено как в ходе выполнения физической работы, так и после нее.

Настоящее изобретение также относится к использованию по меньшей мере 25 мг полифенолов для приготовления продукта, предназначенного для потребления до или в процессе физической нагрузки с целью подавления снижения уровня глюкозы в крови после нагрузки.

Осуществление изобретения

Положительный эффект продукта по настоящему изобретению наиболее выражен, когда физическая работа продолжительная или напряженная. Определение «продолжительная» означает, что нагрузка длится более 30 минут, обычно более 1 часа, предпочтительно более 2 часов. Определение «напряженная» означает, что частота сердечных сокращений достигает 100-150 ударов в минуту или более в зависимости от тренированности и возраста испытуемого. Положительный эффект композиции по данному изобретению может быть выражен на раннем этапе выполнения физической работы, когда она более тяжелая.

Продукт по настоящему изобретению можно принимать внутрь, предпочтительно через рот, перед выполнением физического упражнения или во время подхода. Хотя продукт по настоящему изобретению можно потреблять за несколько часов до начала выполнения физической работы, больший эффект может быть достигнут путем потребления его как можно ближе к началу выполнения упражнения, например менее чем за 30 минут до нагрузки, предпочтительно менее чем за 1 час, более предпочтительно за 1,0-2,5 часа до выполнения физической работы. Кроме того, продукт по настоящему изобретению можно потреблять регулярно, например, ежедневно в течение периода до двух недель или дольше, перед выполнением физической работы. По желанию суточную дозу можно принимать за один раз или же в несколько приемов.

Полифенолы по настоящему изобретению могут быть полифенолами, присутствующими в различных растительных источниках, как, например, чай и другие настои, ягоды и проч., но в данном исследовании использовались предпочтительно полифенолы, присутствующие в какао-бобах, например (не ограничиваясь этим
5 перечнем) катехин, эпикатехин или олигомеры эпикатехина (например, димер В2, димер В5, тример С или тетрамер D). Можно использовать индивидуальные полифенолы или смеси двух или более полифенолов.

Например, когда используется отдельно эпикатехин, его количество в продукте по
10 данному изобретению может быть по меньшей мере 25 мг, обычно от 30 до 200 мг, предпочтительно от 40 до 150 мг, более предпочтительно от 50 до 100 мг.

Когда используется смесь полифенолов, суммарное количество полифенолов в продукте по настоящему изобретению (измеряемое с применением реактива Фолина и
15 выражаемое в эквивалентах эпикатехина) может составлять по меньшей мере 50 мг, например, от 100 мг до около 2500 мг, предпочтительно от 200 мг до 2000 мг, более предпочтительно от 500 мг до 1500 мг, еще более предпочтительно от 750 мг до 1250 мг.

Предназначенный для приема через рот продукт по настоящему изобретению,
20 содержащий полифенолы, может быть в твердой либо жидкой форме - раствор, суспензия или порошок. Например, его можно потреблять как какао-массу, какао-порошок, молочный шоколад или же темный (горький) шоколад. Его также можно потреблять в составе таких пищевых продуктов, как зерновые хлопья, молочные продукты (например, йогурт), энергетические батончики, желе, или в виде таких
25 напитков, как какао или горячий шоколад. Продукт по настоящему изобретению также можно потреблять как биологически активную добавку в форме капсул, таблеток, пилюль, леденцов или пастилок для рассасывания, драже либо порошка.

Например, количество темного шоколада, потребляемое перед подходом
30 физического упражнения, составляет - в зависимости от содержания полифенолов какао - обычно от 20 до 150 граммов, предпочтительно от 50 до 125 граммов, более предпочтительно от 90 до 110 граммов, например 100-граммовую плитку. Количество какао-массы, потребляемое перед подходом физического упражнения, составляет
35 обычно от 10 до 90 граммов, предпочтительно от 30 до 80 граммов, более предпочтительно от 55 до 70 граммов. Низшие в указанных пределах количества этих продуктов, например 20-50 граммов темного шоколада или 10-30 граммов какао-массы могут дать удовлетворительный положительный эффект, когда содержание полифенолов в шоколаде велико, например около 1000-1600 мг или более
40 полифенолов (определяемых с применением реактива Фолина-Чокальтеу) в 100 граммах шоколада.

Предпочтительно в продукте по настоящему изобретению, содержащем полифенолы, могут присутствовать до 1 г кофеина и/или до 2 г теобромина, которые
45 повышают работоспособность. Например, количество кофеина может составлять от 0,1 до 0,5 граммов и количество теобромина может составлять от 0,1 до 1 грамма. Кофеин и теобромин являются нормальными ингредиентами какао.

Настоящее изобретение также предоставляет способ подавления снижения уровня глюкозы в крови после физической нагрузки путем потребления продукта,
50 содержащего по меньшей мере 25 мг одного или более полифенолов, до или в процессе подхода физического упражнения. Этот продукт обычно потребляется менее чем за 30 минут до подхода физического упражнения, предпочтительно менее чем за 1 час, более предпочтительно за 1,5-2,5 часа до подхода физического упражнения. Кроме

того, продукт по настоящему изобретению можно потреблять регулярно, например, ежедневно в течение периода до двух недель или более перед выполнением физической работы. По желанию суточную дозу можно принимать за один раз или же в несколько приемов.

5 Мы полагаем, что механизмом, посредством которого достигается более высокий уровень глюкозы в крови, является, возможно, глюконеогенез (образование новых молекул глюкозы для ее утилизации в организме) или гликогенолиз в печени (расщепления запасенного гликогена с высвобождением глюкозы для ее утилизации) или сокращение общего оборота глюкозы в организме.

10 Потребление продукта, содержащего по меньшей мере 25 мг одного или более полифенолов, до или в процессе подхода физического упражнения также может повысить содержание полифенолов в крови после физической нагрузки и подавить снижение уровня инсулина в крови после физической нагрузки.

15 Потребление продукта, содержащего по меньшей мере 25 мг одного или более полифенолов, до или в процессе подхода на выполнение физической работы также может обеспечить одно или и более следующих дополнительных благотворных эффектов в процессе или после выполнения физической работы:

- 20 усиление мобилизации жиров после физической нагрузки,
- усиление бета-окисления жирных кислот после физической нагрузки,
- усиление глюконеогенеза в процессе и после физической нагрузки,
- усиление гликогенолиза в печени в процессе и после физической нагрузки,
- 25 сокращение общего оборота глюкозы в организме в процессе и после физической нагрузки,
- уменьшение иммунодепрессии после физической нагрузки,
- ослабление изменений в уровнях некоторых гормонов (например, инсулина) после физической нагрузки,
- 30 снижение концентрации свободных F2-изопростанов в плазме крови после физической нагрузки,
- подавление снижения уровня инсулина в плазме крови (инсулинемии) после физической нагрузки,
- снижение уровня окисленных LDL в состоянии покоя и в процессе физической
- 35 нагрузки,
- повышение уровня IL-10, обладающего противовоспалительным действием,
- снижение утомления или ощущаемого напряжения,
- сокращение времени восстановления при утомлении или напряжении и после
- 40 физической нагрузки и/или
- улучшение выполнения физической работы/спортивного упражнения.

Второе воплощение настоящего изобретения относится к людям, регулярно, например ежедневно, занимающимся физическими упражнениями. Благотворный эффект может развиваться на протяжении какого-то промежутка времени путем

45 потребления одного или более полифенолов ежедневно в дозе от 5 до 200 мг/сут. Благотворный эффект может стать ощутимым за несколько дней и продолжаться неопределенно долго, если потребление полифенолов не прекращается.

Соответственно, второе воплощение настоящего изобретения относится к использованию одного или более полифенолов в количестве от 5 мг до 200 мг для

50 изготовления продукта, предназначенного для ежедневного потребления с целью уменьшить ущерб от окислительного стресса в процессе или после физической нагрузки.

Второе воплощение настоящего изобретения также относится к использованию одного или более полифенолов в количестве от 5 мг до 200 мг для изготовления продукта, предназначенного для ежедневного потребления с целью подавить понижение уровня глюкозы в крови у лиц, регулярно занимающихся физическими упражнениями.

Положительный эффект применения продукта по второму воплощению настоящему изобретения также наиболее явен, когда физическая нагрузка продолжительная и/или напряженная. «Продолжительная» означает, что физическая работа/спортивное упражнение совершается более 30 минут, обычно более 1 часа, предпочтительно более 2 часов. «Напряженная» означает, что частота сердечных сокращений превышает 100-150 ударов в минуту или более (в зависимости от тренированности или возраста человека).

Второе воплощение настоящего изобретения также предоставляет способ уменьшения ущерба от окислительного стресса у лиц, регулярно совершающих физические упражнения/работу, путем ежедневного потребления продукта, содержащего от 5 мг до 200 мг одного или более полифенолов.

Количество потребляемых полифенолов при ежедневном приеме может составлять от 25 мг до 150 мг в сутки, предпочтительно от 50 мг до 100 мг в сутки.

Количество потребляемого эпикатехина при ежедневном приеме может составлять от 6 мг до 80 мг, предпочтительно от 10 мг до 50 мг.

По желанию суточное количество можно принимать за один раз или же в несколько приемов течение дня.

При ежедневном потреблении продукта, содержащего большее количество этого полифенола или смеси полифенолов, например 100-200 мг, следует исключить из рациона другие продукты с такой же калорийностью. Потребителю должны предоставляться диетологические рекомендации, чтобы заменять сходные продукты, имеющиеся в рационе.

Во втором воплощении настоящего изобретения предназначенный для приема через рот продукт по настоящему изобретению, содержащий полифенол или полифенолы, может быть в твердой либо жидкой форме - раствор, суспензия или порошок. Например, его можно потреблять как какао-массу, какао-порошок, молочный шоколад или же темный (горький) шоколад. Его также можно потреблять в составе таких пищевых продуктов, как зерновые хлопья, молочные продукты (например, йогурт), энергетические батончики, желе, или в виде таких напитков, как какао или горячий шоколад. Продукт по настоящему изобретению также можно потреблять как биологически активную добавку в форме капсул, таблеток, пилюль, леденцов или пастилок для рассасывания, драже либо порошка.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение иллюстрируют приведенные ниже примеры.

Пример 1

В качестве испытываемого шоколада (DC) использовали 100-граммовую плитку темного шоколада (70% тертых какао-бобов), содержащую какао-массу, сахар, масло какао, молочный жир, лецитин и ваниль (общее содержание жиров 44%). В качестве контроля (CON) использовали шоколад с по возможности таким же содержанием жиров и углеводов и такой же калорийностью. В 71 г контрольного шоколада (CON) содержались все те же ингредиенты, что и в испытываемом шоколаде (DC) за исключением какао-массы (0%), но содержалось 41 г масла какао для того, чтобы содержание жиров составляло 62%, так что 71 г контрольного шоколада содержали

столько же жиров, сколько 100 г DC.

Четырнадцать здоровых мужчин в возрасте 21-23 года и массой тела 70-73 кг на протяжении 48 часов перед первым испытанием (привыкание) вели дневник потребления пищевых продуктов натошак и от них требовалось придерживаться

такого же рациона на протяжении 48 часов перед каждым основным испытанием. Все испытуемые были некурящими, и от них требовалось воздерживаться от потребления алкоголя, кофеина и от интенсивной физической нагрузки в течение 48 часов перед каждым испытанием, а накануне каждого испытания они весь день отдыхали.

Испытуемые также не должны были принимать минеральные или витаминные добавки или любые другие препараты антиоксидантного действия в течение 4 недель перед испытанием и во время самого испытания. Испытуемых обеспечивали перечнем пищевых продуктов с высоким содержанием полифенолов, которые следовало исключить из рациона в течение 48 часов перед каждым основным испытанием.

Испытуемые получали контролируемым рандомизированным образом либо 100 г испытываемого темного шоколада (DC), либо 71 г контрольного шоколада (CON) с таким же содержанием жиров и углеводов, либо ничего не получали (NONE). Через 2 часа каждый испытуемый работал на велотренажере в течение 2,5 часов при 60% VO_{2max} . Между различными испытаниями ни по одной переменной, физиологически важной для выполнения физической работы, не наблюдалось разницы (см. Табл. 1).

Таблица 1			
Данные физической нагрузки: усредненные за период продолжительности испытания (2,5 часа)			
	DC	CON	NONE
Частота сердечных сокращений (ударов в минуту)	143(4)	142(4)	140(4)
Степень ощущаемого напряжения (RPE)	12(0)	12(0)	12(0)
Максимальное потребление кислорода (VO_{2max}), %	57(1)	57(1)	57(1)
Коэффициент дыхательного обмена (RER)	0,94(0,02)	0,93(0,01)	0,93(0,02)
Значения средние (SEM). CON (испытание с контрольным шоколадом), DC (испытание с темным шоколадом), NONE (испытание без воздействия).			

Забор крови у испытуемых осуществляли до приема шоколада, 2 часа спустя непосредственно перед выполнением физической работы, сразу после физической нагрузки продолжительностью 2,5 часа и через 1 час отдыха. В образцах крови определяли инсулин, полифенолы (эпикатехин), глюкозу и свободные F2-изопростаны в плазме.

Испытуемые подвергались физической нагрузке рандомизированным образом с контрбалансировкой в трех различных условиях:

- a) испытание NONE (отсутствие воздействия),
- b) испытание DC (темный шоколад) или
- c) испытание CON (контрольный шоколад без какао-массы).

Испытуемые приходили в лабораторию в 8.30 утра в дни основных испытаний натошак (>10 часов без приема пищи). За 2 часа до начала физической работы испытуемые съедали шоколад (или - в испытании NONE - ничего не ели) и выпивали 200 мл воды. Кроме того, они еще принимали воду в начале выполнения физической работы/упражнения, каждые 15 минут в процессе ее выполнения и по завершении подхода упражнения из расчета 2,5 мл на 1 кг массы тела.

Образцы венозной крови брали по следующей схеме:

- a) до потребления шоколада (состояние покоя),
- b) непосредственно перед началом физической работы (до нагрузки)

с) непосредственно после завершения подхода упражнения (после нагрузки) и
d) через 1 час отдыха (1 ч после нагрузки).

В каждом случае брали 25 мл крови из вены в сгибе локтя с помощью иглы-бабочки (21 g) и шприца. Взятую кровь разливали в три пробирки Vacutainer (Becton Dickinson, Oxford, UK): две пробирки с K_3EDTA и одна пробирка с гепарином. Для определения VO_2 и RER (коэффициента дыхательного обмена) выдыхаемый воздух собирали в мешки Дугласа (образец брали в течение 1 минуты) на 15-й и 30-й минуте и затем каждые 30 минут в процессе физической нагрузки. Частоту сердечных сокращений и степень ощущаемого напряжения определяли каждые 15 минут в ходе физической нагрузки.

Порядок, в котором каждый испытуемый находился в каждом из трех условий (DC, CON и NONE), был рандомизирован с контрбалансировкой с применением основного плана латинских квадратов. Возможны 6 различных последовательностей, в которых можно провести испытания DC, CON и NONE. Испытуемых относили случайным образом к каждой из возможных последовательностей, так что на каждую из них приходилось по два человека. Поскольку испытуемых было 14, на две из шести последовательностей приходилось по одному дополнительному участнику.

Образцы крови в двух пробирках Vacutainer с K_3EDTA использовали для определения изменений концентраций в плазме крови глюкозы, инсулина, полифенолов, свободных F_2 -изопростанов, триглицеридов и жирных кислот; пробирки с гепарином использовали для определения изменений концентраций в плазме крови витаминов С и Е.

Чтобы сравнить результаты испытаний трех различных типов - DC, CON и NONE, применяли дисперсионный анализ ANOVA с повторными измерениями по двум факторам (испытание \times время). Данные, не имевшие нормального распределения, нормализовали путем логарифмического преобразования и преобразования квадратного корня. В тех случаях, когда это было возможно, проводили апостериорный анализ (Post Hoc), применяя двухвыборочный t-критерий с коррекцией вероятной ошибки по методу Холма-Бонферрони. Когда дисперсионный анализ ANOVA по двум переменным демонстрировал значимое взаимодействие испытание \times время (что свидетельствовало о различных временных ответах в зависимости от испытания), применяли также дисперсионный анализ ANOVA с повторными измерениями по одной переменной, чтобы определить временной ответ в каждом испытании независимо). Ко всем значениям P, полученным с помощью ANOVA, применяли поправку Гринхауза-Гейссера.

А. КОНЦЕНТРАЦИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

В аликвотах плазмы крови с K_3EDTA определяли концентрацию полифенолов (эпикатехина и катехина) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Плазму крови быстро оттаивали, центрифугировали при $4^\circ C$ и 14000 об/мин в течение 5 минут и 200 мкл смешивали с 12 мкл раствора, содержащего 10% аскорбиновой кислоты - 40 мМ KH_2PO_4 - 0,1% EDTA, с 20 мкл раствора фосфата калия (50 мМ, pH 7,4), с 20 мкл раствора катехин-галлата (1,0 мкг/мл) в качестве внутреннего стандарта, с 500 Е β -d-глюкуронидазы типа X-A из *E. coli* (Sigma Chemical Co, St Louise, MO, USA) и 4 Е сульфатазы типа VIII из внутренностей морского уха (Sigma). Смесь инкубировали при $37^\circ C$ в течение 45 минут. Реакцию останавливали, добавляя 2 мл этилацетата, после чего энергично перемешивали путем встряхивания в течение 20 минут и центрифугировали при $4^\circ C$ и 2000 g в течение 5 минут. Супернатант переносили в чистую пробирку и повторяли

экстракцию этилацетатом. К объединенной фракции супернатанта прибавляли 10 мкл 0,02%-ного раствора аскорбиновой кислоты с 0,005% EDTA и перемешивали круговыми движениями. Затем супернатант выпаривали досуха в токе азота в течение 2 часов при комнатной температуре. Образцы разводили в 200 мкл смеси метанол:вода (1:2 объем/объем), хорошо перемешивали круговыми движениями, подвергали воздействию ультразвука в течение 10 минут и центрифугировали при 4°C и 14000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант в количестве 20 мкл наносили в систему HPLC, состоящую из системы подачи раствора ESA Model 582, устройства автоматического ввода проб (автосэмплера) ESA Model 542, электрохимического детектора ESA 5600 CoulArray (ESA, Bedford, MA, USA), снабженную программным обеспечением CoulArrayWin Software 1.12, нагревателем колонки Eppendorf CH-30, защитной колонки Cig Phenomenex (4,0 мм L × 3,0 мм) и колонки SUPELCO Ascentis RP-Amide column (15 см × 4,6 мм внутренний диаметр, размер частиц 5 мкм). Стандартные растворы флаванола и внутреннего стандарта (катехин-галлата) готовили на смеси метанола и воды (1:2 объем/объем) и хранили при -70°C. Колонку элюировали при 35°C начиная со скорости потока 1 мл/мин 70% буферного раствора А (40 мМ одноосновный фосфат аммония, рН доводили до 3,0 фосфорной кислотой) и 30% буферного раствора В (40 мМ одноосновный фосфат аммония 50%/л: 50% ацетонитрил/л, рН доводили до 3,0 фосфорной кислотой). Через 1 мин градиент изменяли линейно от 70% буферного раствора А и 30% буферного раствора В до 10% буферного раствора А и 90% буферного раствора В (1-10 мин), 70% А/30% В (10-12 мин). Сходящую с колонки жидкость анализировали путем электрохимической детекции при потенциале -30, 100, 230 и 400 мВ. Преобладал канал детекции 230 мВ.

Изменения концентрации эпикатехина в плазме крови показаны на Фигуре 1. Апостериорный (Post Hoc) анализ продемонстрировал, что концентрация эпикатехина в плазме крови до физической нагрузки (т.е. 2 часа спустя после приема шоколада) была значительно выше в испытании DC по сравнению с испытанием CON. За два часа после приема темного шоколада концентрация эпикатехина в плазме крови возрастала в 11 раз. В конце выполнения физической работы концентрация эпикатехина в плазме крови была в 6 раз выше, чем в состоянии покоя, а через 1 час после физической нагрузки она была примерно в 4 раза выше, чем в состоянии покоя. В испытаниях CON и NONE концентрация эпикатехина в плазме крови оставалась неизменной по сравнению с состоянием покоя на протяжении всего испытания. На концентрацию катехина в плазме крови потребление DC или CON не влияло.

В. КОНЦЕНТРАЦИИ ВИТАМИНОВ С И Е В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Концентрацию витамина С в плазме крови определяли в плазме, полученной из гепаринизированной крови по Liu et al. (1982), используя специфический спектрофотометрический метод с аскорбат-оксидазой (Е 1.10.3.3). В плазме, полученной из гепаринизированной крови, определяли антиоксидантную активность в эквивалентах тролокса (ТЕАС) при помощи автоматического анализатора (Cobas-Mira Plus, Roche, Basle, Switzerland), используя имеющийся в продаже готовый набор (Randox, County Antrim, UK) для измерения способности плазмы нейтрализовать катион-радикал АВТС - 2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат). В качестве стандарта использовали тролокс, так что общий антиоксидантный статус (ТАS) выражали в единицах антиоксидантной активности в эквивалентах тролокса (мкмоль). Антиоксидантную емкость плазмы в эквивалентах витамина Е определяли в плазме, полученной из гепаринизированной крови с помощью хемоллюминесцентного метода измерения способности плазмы нейтрализовать пероксинитрит (ABEL, Knight Scientific,

Plymouth, UK).

В отношении концентрации витамина С наблюдался значимый эффект времени. Апостериорный (Post hoc) анализ показал, что сразу после физической нагрузки и через 1 час после нее концентрация витамина С была выше, чем перед физической нагрузкой. В отношении концентрации в плазме витамина Е в токофероловых эквивалентах наблюдался значимый эффект взаимодействия основное испытание × время и главный эффект времени (Таблица 2). Во всех трех испытаниях концентрация витамина Е в токофероловых эквивалентах была значительно выше сразу после физической нагрузки и через 1 час после нее, чем в состоянии покоя и перед физической нагрузкой. Однако концентрация витамина Е в токофероловых эквивалентах была значительно выше через 1 час после физической нагрузки в испытаниях DC и CON по сравнению с испытанием NONE.

С. КОНЦЕНТРАЦИЯ СВОБОДНЫХ F₂-ИЗОПРОСТАНОВ

Для определения концентрации свободных F₂-изопростанов образцы плазмы крови с K₃EDTA до анализа хранили при -80°C в присутствии 0,005% 3,5-ди-трет-4-бутилгидрокситолуола. Концентрацию свободных F₂-изопростанов в плазме крови определяли с помощью набора для ELISA (Cayman Chemical Co., MI, USA) по инструкции производителя.

Как показывает Таблица 2, концентрация свободных F₂-изопростанов в плазме крови была значительно выше перед физической нагрузкой в испытаниях DC по сравнению с испытаниями NONE, но через 1 час после физической нагрузки она была значительно ниже в испытаниях DC по сравнению с испытаниями NONE. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA для каждого испытания в отдельности показал, что в случае испытаний CON концентрация свободных F₂-изопростанов в плазме крови по сравнению с уровнем перед физической нагрузкой была значительно выше сразу после физической нагрузки, но не через 1 час спустя, а в случае испытаний NONE сразу после физической нагрузки и через 1 час после нее она была значительно выше, чем перед физической нагрузкой. Снижение уровня F₂-изопростанов считается положительным явлением при окислительном стрессе.

Таблица 2

Концентрации в плазме крови витаминов С и Е и свободных F₂-изопростанов

	В покое	До нагрузки	Сразу после нагрузки	Через 1 час после нагрузки	Значения Р для основных эффектов (испытание; время; испытание × время)
Витамин С (мкМ)					
DC	57 (4)	55 (4)	69 (4)	60 (4)	0,158; <0,001; 0,453
CON	56 (4)	53 (5)	68 (4)	58 (5)	
NONE	57 (4)	56 (3)	74 (6)	65 (5)	
Витамин Е (мкМ)					
DC	588 (16)	609 (15)	746 (22)	742 (21)	0,353; <0,001; 0,001
CON	608 (14)	580 (18)	753 (18)	758 (21)	
NONE	614 (16)	606 (13)	739 (22)	699 (18)	
F₂-изопростаны (пкг/мл)					
DC	14,4 (0,4)	14,8 (0,6)	16,1 (0,9)	14,3 (0,5)	0,252; <0,001; 0,014
CON	14,1 (0,5)	13,2 (1,0)	16,0 (1,1)	15,5 (0,7)	
NONE	13,3 (0,5)	12,6 (0,5)	15,7 (0,7)	15,8 (0,5)	

Д. КОНЦЕНТРАЦИЯ ИНСУЛИНА И ГЛЮКОЗЫ

Для определения концентрации инсулина анализировали аликвоты плазмы крови

с K_3EDTA , используя набор Ultrasensitive kit (DRG Diagnostics, Marburg/Lahn, Germany). Концентрацию глюкозы в плазме крови определяли колориметрически с помощью автоматического анализатора (Cobas Mira Plus, Roche, Basle, Switzerland) и тест-набора глюкозооксидаза-РАР (Randox, County Antrim, UK). Свободные жирные кислоты определяли в образцах плазмы крови с EDTA, используя набор Wako 999-75406 NEFA-C; триглицериды определяли в плазме крови с гепарином, используя готовый набор, имеющийся в продаже.

Концентрация инсулина в плазме крови, как правило, уменьшалась после физической нагрузки, но общий временной ответ различался в зависимости от типа испытания (Фигура 2). В испытаниях DC по сравнению с испытаниями CON концентрация инсулина в плазме крови перед физической нагрузкой и через 1 час после нее была значительно выше. Также концентрация инсулина в плазме крови перед физической нагрузкой была выше в испытаниях CON по сравнению с испытаниями NONE (натощак). Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, проведенный независимо по каждому испытанию, показал, что в испытаниях CON нет разницы между значениями в состоянии покоя и перед физической нагрузкой, а значения сразу после нагрузки и через 1 час спустя значительно ниже, чем до нагрузки. И наоборот, в испытаниях DC наблюдалось существенное увеличение по сравнению с состоянием покоя значений перед физической нагрузкой и существенное уменьшение по сравнению с уровнем перед нагрузкой значений сразу после нее и 1 час спустя. В испытаниях CON имело место значительное понижение по сравнению с состоянием покоя значений перед физической нагрузкой и значительное понижение по сравнению с уровнем перед физической нагрузкой значений сразу после нее и 1 час спустя.

Концентрация глюкозы в плазме крови через 1 час после физической нагрузки была значительно выше в испытаниях DC по сравнению с испытаниями CON. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, проведенный независимо по каждому испытанию, показал, что во всех испытаниях была значимый главный эффект времени (Фигура 3). В испытаниях DC уровень глюкозы в плазме крови перед физической нагрузкой не отличался существенно от такового в состоянии покоя, но сразу после нагрузки и через 1 час после нее он был ниже, чем в покое. Сразу после нагрузки концентрация глюкозы в плазме крови незначительно отличалась от значения перед нагрузкой, а через 1 час после нагрузки разница по сравнению с уровнем перед нагрузкой была существенной. В испытаниях CON уровень глюкозы в плазме крови перед физической нагрузкой, сразу после нее и 1 час спустя был значительно ниже, чем в состоянии покоя. Значения сразу после нагрузки и через 1 час были существенно ниже, чем перед нагрузкой. В испытаниях NONE уровень глюкозы в плазме крови перед физической нагрузкой не отличался существенно от такового в состоянии покоя, но сразу после нагрузки и 1 час спустя он был значительно ниже, чем в покое. Значения сразу после нагрузки и через 1 час после нее были значительно ниже значений перед нагрузкой. В испытаниях с темным шоколадом (DC), уровень глюкозы в плазме крови после физической нагрузки был значительно выше, чем в контрольных испытаниях (CON).

Итак, потребление темного, или темного шоколада (DC) за 2 часа до продолжительного подхода напряженной физической работы/спортивного упражнения (2,5 часа при $60\%VO_{2max}$) может привести к заметной инсулинемии и изменениям уровня глюкозы в плазме крови, отличным от таковых при потреблении контрольного шоколада без какао-массы (CON со сходными энергосодержанием и концентрацией основных питательных веществ) либо в отсутствие потребления чего-

либо (NONE - натошак). Прием темного шоколада может также значительно увеличить концентрацию эпикатехина в плазме крови; ненамного, но существенно увеличить антиоксидантную емкость плазмы крови; положительно повлиять на концентрацию F₂-изопростанов в плазме крови после физической нагрузки, совершаемой после потребления темного шоколада, по сравнению с контрольным шоколадом без какао-массы (CON).

Пример 2

В этом эксперименте использовали темный шоколад (DC), который представлял собой 100-граммовые плитки, содержащие 70% тертых какао-бобов (в составе какао-массы), сахар, масло какао, жир молока, лецитин и ваниль; общее содержание жиров составляло 44%, энергосодержание - 551 ккал. Контрольный шоколад (CON) имел такое же энергосодержание (насколько это было возможно). В 76 г контрольного шоколада (CON) содержались такие же ингредиенты, как в испытываемом шоколаде (DC) за исключением какао-массы (0%), так что 76 г контрольного шоколада содержали 47 г жира и 28 г сахарозы, энергосодержание было таким же, как в 100 г темного шоколада - 551 ккал.

В этом эксперименте 20 здоровых, физически активных мужчин в возрасте 18-35 лет с массой тела 73-76 кг получали (контролируемым рандомизированным образом) ежедневно в течение двух недель либо 2 x 40 г темного шоколада Nestle Noir, либо 2x30,4 г контрольного шоколада с таким же содержанием углеводов и таким же энергосодержанием и еще 40 г Nestle Noir либо 30,4 г контрольного шоколада с таким же содержанием углеводов и таким же энергосодержанием за 2 часа до подхода упражнения.

Испытуемые выполняли физическую работу в двух различных условиях: испытание DC (с темным шоколадом) и испытание CON (с контрольным шоколадом, не содержащим какао-массы); по этим группам они распределялись рандомизированным образом с контрбалансировкой. Испытуемые приходили в лабораторию в 9.30 утра в дни основных испытаний, проведя перед этим более 10 часов без приема пищи и в 08:00 позавтракав только шоколадом (40 г DC либо 30,4 г CON) и водой (500 мл). По прибытии в лабораторию испытуемых просили посетить туалет и опорожнить мочевой пузырь, после чего измеряли их массу тела. Затем испытуемые выполняли два теста для оценки когнитивных функций - тест Струпа и тест на скорость обработки зрительной информации (RVIP), заполняли шкалы субъективной оценки тяжести нагрузки и садились на велотренажеры на расстоянии не более 1 м от экрана монитора компьютера. Во всех испытаниях в ходе всех тестов на оценку когнитивных функций для того, чтобы свести к минимуму возможный внешний шум, испытуемые пользовались ушными вкладышами (берушами). Подходы упражнения начинались в 10:00. В начале подхода, каждые 15 минут в ходе выполнения физической работы и по ее завершении испытуемый пил воду (2,5 мл на 1 кг массы тела). Упражнение состояло во вращении педалей велотренажера с постоянной скоростью при 60% VO_{2max} в течение 1,5 часа; каждые 10 минут интенсивность нагрузки увеличивалась до 90% VO_{2max} на 30 секунд. В конце полуторачасового подхода испытуемому давали отдохнуть 5 минут, после чего он сразу же работал с истощающей нагрузкой (при 90% VO_{2max}). В процессе истощающей нагрузки испытуемым велели придерживаться определенного темпа вращения педалей - более 50 об/мин; все время оставаться в сидячем положении и стараться выполнять это упражнение как можно дольше. Никакого поощрения извне они не получали. Во время выполнения упражнения испытуемые не могли слушать музыку;

во время истощающей нагрузки им не по чему было судить, сколько прошло времени. Во время истощающей нагрузки каждые 5 минут измеряли частоту сердечных сокращений, делая это так, чтобы не мешать испытуемым выполнять упражнение. В конце испытуемых взвешивали, чтобы определить потерю массы тела.

5 У испытуемых брали образцы венозной крови в состоянии покоя непосредственно перед началом выполнения физической работы (Pre-Ex), тотчас по окончании полторачасового подхода (Post-Ex), тотчас по окончании периода истощающей нагрузки (Post-Exh) и через 1 час восстановления (1 ч Post-Ex). В каждом случае
10 брали 25 мл крови из вены в сгибе локтя с помощью иглы-бабочки (21 g) и шприца. Взятую кровь разливали в пять пробирок Vacutainer (Becton Dickinson, Oxford, UK): четыре пробирки с K₃EDTA и одну пробирку с гепарином. Для определения VO₂ и RER (коэффициента дыхательного обмена) выдыхаемый воздух собирали в мешки Дугласа (образец брали в течение 1 минуты) на 25-й, 55-й и 75-й минуте выполнения
15 упражнения. Частоту сердечных сокращений определяли через 15 минут после начала подхода и затем каждые 10 минут в процессе физической нагрузки.

В течение 48 часов, предшествовавших первому испытанию (привыкание) испытуемые вели дневник питания, и им велели придерживаться того же рациона
20 всякий раз в течение 48 часов перед основным испытанием. Все испытуемые были некурящими, и от них требовалось воздерживаться от употребления спиртных напитков, кофеина и продуктов, содержащих полифенолы (не считая предписанного шоколада), и не выполнять тяжелой физической работы в течение 48 часов перед
25 каждым испытанием, а накануне испытания весь день отдыхать. Кроме того, испытуемые не должны были принимать никаких минеральных, витаминных или каких-либо иных антиоксидантных препаратов в течение четырех недель, предшествующих исследованию.

Испытуемым предоставили список продуктов питания, которые следовало
30 исключить из рациона, чтобы избежать пищи с высоким содержанием полифенолов и кофеина в течение 48 часов перед каждым основным испытанием. Из четырех образцов крови с K₃EDTA в пробирках Vacutainer один использовали для гематологического анализа, включая определение гемоглобина, гематокрита, общего содержания лейкоцитов и лейкоцитарной формулы; это осуществляли с помощью
35 автоматического гематологического анализатора (A^C.TTM 5diff analyser, Beckman Coulter, UK). Изменения объема плазмы крови рассчитывали по методу Дилла и Костила (1974). Остальные пробы с K₃EDTA и гепаринизированную цельную кровь центрифугировали при 1500 g в течение 10 минут в центрифуге с охлаждением при 4°C
40 не позже чем через 10 минут после забора крови. Полученную плазму сразу помещали для хранения при -80°C вплоть до использования для анализа. Определяли изменения концентрации в плазме крови маркеров окислительного стресса, инсулина и циркулирующих в кровотоке метаболитов.

45 Концентрация свободных F₂-изопростанов

Концентрацию свободных F₂-изопростанов в плазме крови определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа (ELISA) согласно инструкциям производителя (Cayman Chemical Co., MI, USA).

Концентрация окисленных липопротеинов низкой плотности в плазме крови

50 В аликвотах плазмы крови с K₃EDTA определяли концентрацию окисленных липопротеинов низкой плотности (LDL) и содержание карбонильных групп белков с помощью имеющихся в продаже наборов для иммуноферментного анализа (ELISA) производства Mercodia AB (Уппсала, Швеция) и Zentech, Biocell Corporation (Новая

Зеландия).

В отношении концентрации свободных F₂-изопростанов в плазме крови наблюдалось значимое взаимодействие основное испытание × время (P<0,035) и главные эффекты времени (P<0,001) и испытания (P=0,003). В испытаниях DC концентрация свободных F₂-изопростанов в плазме крови после истощающей физической нагрузки (P<0,001) и через 1 час после нее (P<0,05) была значительно ниже, чем в испытаниях CON (Таблица 3).

В отношении концентрации окисленных LDL в плазме крови наблюдалось значимое взаимодействие основное испытание × время (P=0,025) и главные эффекты времени (P<0,001) и испытания (P=0,001) (Таблица 5). В испытаниях DC концентрация окисленных LDL в плазме крови перед физической нагрузкой, после нее и после истощающей физической нагрузки (во всех трех случаях P<0,001) была значительно ниже, чем в испытаниях CON (Таблица 3).

Маркеры окислительного стресса до и после физической нагрузки					
	До нагрузки	Сразу после 1,5-часовой нагрузки	Сразу после истощающей нагрузки	Через 1 час после истощающей нагрузки	Значения P для главных эффектов (испытание; время; испытание × время)
F ₂ -изопростаны (пкг/мл)					
DC	22,6 (7,4)	34,1 (15,5)	35,8 (8,7)	29,8 (15,0)	0,003; <0,001; 0,035
CON	31,0 (17,0)	35,0 (15,0)	56,7 (25,0)	44,9 (17,7)	
Окисленные LDL (Е/л)					
DC	46,8 (16,2)	54,1 (18,3)	58,6 (21,8)	54,1 (19,1)	<0,001;<0,001; 0,025
CON	57,8 (22,0)	64,4 (20,4)	65,9 (19,9)	56,6 (17,3)	

Приведены средние значения (SD). CON - испытание с контрольным шоколадом, DC - испытание с темным шоколадом. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) представлены в шестой колонке.

В отношении концентрации инсулина в плазме крови имел место значимый главный эффект времени (P<0,001) и тенденция к взаимодействию испытание × время (P=0,071). Концентрация инсулина в плазме крови перед физической нагрузкой в испытаниях DC была значительно выше, чем в испытаниях CON (P=0,018). Концентрация инсулина в плазме крови обычно снижалась после физической нагрузки, но общая картина ее изменений во времени не различалась в зависимости от типа испытания (Таблица 4).

Циркулирующий в крови инсулин до и после физической нагрузки					
	До нагрузки	Сразу после 1,5-часовой нагрузки	Сразу после истощающей нагрузки	Через 1 час после истощающей нагрузки	Значения P для главных эффектов (испытание; время; испытание × время)
Инсулин (мЕ/л)					
DC	7,3 (4,0)	4,3 (4,2)	3,6(4,3)	1,8 (1,3)	>0,1; <0,001; 0,071
CON	4,9 (3,5)	2,6(2,2)	3,4(3,1)	1,6(1,2)	

Приведены средние значения (SD). CON - испытание с контрольным шоколадом, DC испытание с темным шоколадом. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) представлены в шестой колонке.

Для циркулирующих в крови метаболитов (глюкоза, свободные жирные кислоты и триглицериды) были получены следующие результаты.

В отношении концентрации глюкозы в плазме крови не наблюдалось главного эффекта испытания (P>0,1) или взаимодействия испытание × время (P>0,1); однако

имел место значимый эффект времени ($P=0,002$), а концентрация глюкозы в плазме крови через 1 час после физической нагрузки была ниже, чем перед нагрузкой в обоих испытаниях ($P<0,001$ в случае CON и $P=0,01$ в случае DC; Таблица 5). Определение глюкозы в крови при заборе капиллярной крови из мочки уха на 15-й, 35-й, 55-й и 75-й минуте физической работы показало, что в отношении концентрации глюкозы в крови отсутствуют значимый главный эффект испытания или же времени, а также взаимодействие испытание \times время (во всех случаях $P>0,1$). Концентрация глюкозы в крови держалась, как правило, на уровне $4,2\pm 0,8$ ммоль/л с 15-й до 75-й минуты физической работы.

В отношении концентрации свободных жирных кислот в плазме крови имел место главный эффект времени и все значения после физической нагрузки были выше, чем до нагрузки (во всех случаях $P<0,001$). Наблюдался также значимый главный эффект испытания ($P=0,007$) и взаимодействие ($P=0,03$, причем прием DC приводил к более высоким уровням свободных жирных кислот сразу после 1,5-часовой нагрузки и после истощающей нагрузки, чем прием контрольного шоколада ($P<0,01$ - апостериорный критерий Бонферрони).

В отношении концентрации триглицеридов в плазме крови имел место главный эффект времени, причем концентрация триглицеридов в плазме крови сразу после 1,5-часовой нагрузки и сразу после истощающей нагрузки была выше, чем перед нагрузкой в обоих испытаниях ($P<0,001$), а через 1 час после физической нагрузки она возвращалась к базальному уровню. Однако в этот момент концентрация триглицеридов в плазме крови в испытаниях с DC была значительно ниже, чем в испытаниях с CON 1 ($P=0,04$). (См. Таблицу 5.)

Циркулирующие в кровотоке метаболиты до и после физической нагрузки						Таблица 5
	Перед нагрузкой	Сразу после 1,5-часовой нагрузки	Сразу после истощающей нагрузки	Через 1 час после истощающей нагрузки	Значения P для главных эффектов (испытание; время; испытание \times время)	
Глюкоза (мМ)						
DC	4,97 (0,50)	4,82 (0,78)	4,85 (0,90)	4,53 (0,78)	$>0,1; 0,002; >0,1$	
CON	5,05 (0,40)	4,84 (0,52)	5,06 (0,92)	4,58 (0,44)		
FFA (мМ)						
DC	0,27 (0,17)	1,35 (0,56)	1,09 (0,59)	1,19(0,53)	0,007; $<0,001; 0,030$	
CON	0,19 (0,10)	1,05 (0,44)	0,83 (0,39)	1,07 (0,40)		
Триглицериды (мМ)						
DC	0,72 (0,31)	1,01 (0,32)	0,99 (0,37)	0,70 (0,25)	$>0,1; <0,001; 0,112$	
CON	0,78 (0,46)	1,0 (0,35)	1,05 (0,43)	0,83 (0,43)		

Приведены средние значения (SD). CON - испытание с контрольным шоколадом, DC - испытание с темным шоколадом. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) представлены в шестой колонке.

В отношении концентрации интерлейкина-10 (IL-10) в плазме крови имел место значимый главный эффект времени, причем концентрация IL-10 в плазме крови сразу после 1,5-часовой нагрузки, сразу после истощающей нагрузки и 1 час после истощающей нагрузки была выше, чем перед нагрузкой в обоих испытаниях ($P<0,001$). Однако через 1 час после истощающей нагрузки концентрация IL-10 в плазме крови в испытании с DC была значительно выше, чем в испытании с CON ($P=0,03$).

Интерлейкин-10 в плазме крови до и после физической нагрузки.		Таблица 6
---------------------------------------------------------------	--	-----------

	Перед нагрузкой	Сразу после 1,5-часовой нагрузки	Сразу после истощающей нагрузки	Через 1 час после истощающей нагрузки	Значения P для главных эффектов (испытание; время; испытание × время)	
5	IL-10 (пкг/мл)					
	DC	1,9 (1,7)	2,7 (1,5)	2,8 (1,9)	3,7 (2,7)	>0,1; 0,027;
	CON	1,8 (1,2)	2,3 (1,2)	2,9 (1,5)	2,5 (1,9)	0,059
Приведены средние значения (SD). CON - испытание с контрольным шоколадом, DC - испытание с темным шоколадом. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) представлены в шестой колонке.						

10 Какие бы то ни были различия между испытаниями (темный шоколад по сравнению с контрольным шоколадом), можно интерпретировать как эффект какао-массы, присутствующей в темном шоколаде.

Обнаружено, что темный шоколад снижает уровни F₂-изопростанов и окисленных LDL как в состоянии покоя, так и в процессе физической нагрузки.

15 Снижение содержания маркеров окислительного стресса рассматривается как благотворное явление.

Также темный шоколад значительно повышает общий антиоксидантный статус перед выполнением физической работы, что считается защитным эффектом. Темный шоколад значительно повышает уровень инсулина перед выполнением физической работы. Темный шоколад увеличивает концентрацию свободных жирных кислот в плазме крови, снижает уровень триглицеридов в плазме крови через 1 час после физической нагрузки. Темный шоколад повышает уровень обладающего противовоспалительным действием IL-10 через 1 час после физической нагрузки, что рассматривается как благотворное явление.

20 Описанные выше результаты Примера 2 показывают, что регулярное (ежедневное) потребление темного шоколада в течение двух недель, а также экстренно (за 2 часа) перед продолжительным подходом интенсивного физического упражнения (1,5 часа при ~60% VO_{2max}) по сравнению с таким же потреблением контрольного шоколада с равным содержанием углеводов и энергосодержанием приводит к следующему:

30 а) Потребление темного шоколада ассоциировано со значительно более низкими уровнями в плазме крови в состоянии покоя и после физической нагрузки маркеров окислительного стресса - F₂-изопростанов и окисленных LDL. Следовательно, темный шоколад, по-видимому, обеспечивает некоторую защиту против окислительного стресса до и в процессе физической нагрузки.

35 б) Прием темного шоколада ассоциирован со значительной инсулинемией, но без различий в изменениях уровня глюкозы в крови в ответ на истощающую нагрузку. Это предполагает, что темный шоколад, по-видимому, дает более высокий уровень инсулина перед физической нагрузкой, и это согласуется с результатами, описанными в Примере 1; но влияния на уровень глюкозы не наблюдалось, что не согласуется с результатами, описанными в Примере 1. Однако количество шоколада, поглощаемого в экстренном порядке, в Примере 2 было меньше - 40 г, а не 100 г, и, возможно, имел значение режим потребления - регулярно на протяжении двух недель или же однократно.

40 в) По сравнению с контрольным шоколадом прием темного шоколада ассоциирован с большим увеличением уровня FFA в плазме крови с тенденцией к снижению коэффициента дыхательного обмена (RER) на поздних стадиях выполнения упражнения и меньшей концентрации триглицеридов через 1 час после физической нагрузки. Делается вывод: большее увеличение уровня свободных жирных кислот в процессе физической нагрузки и меньшая величина коэффициента дыхательного

обмена на поздних стадиях выполнения упражнения в случае темного шоколада указывают на то, что в испытаниях с DC по сравнению с испытаниями с CON в качестве источника энергии больше используются жиры, чем углеводы. Более низкий уровень триглицеридов через 1 час после физической нагрузки также можно расценивать как защитный для здоровья.

d) Темный шоколад обуславливает повышение уровня обладающего противовоспалительным действием IL-10 через 1 час после физической нагрузки. Это предполагает, что темный шоколад может в какой-то степени защищать от воспаления.

Итак, результаты, описанные в Примере 2, показывают, что потребление темного шоколада ежедневно на протяжении двух недель и за 2 часа до продолжительной физической нагрузки повышает концентрацию инсулина в плазме крови перед физической нагрузкой и положительно влияет на антиоксидантную емкость плазмы крови, уровни маркеров окислительного стресса и временные изменения концентраций FFA, триглицеридов и IL-10 в плазме крови. Это свидетельствует в поддержку того, что потребление темного шоколада положительно влияет на некоторые показатели стресса после физической нагрузки.

Формула изобретения

1. Применение по меньшей мере 25 мг полифенолов для изготовления продукта, предназначенного для потребления до или в процессе физической нагрузки для подавления снижения содержания глюкозы в крови после физической нагрузки.

2. Применение по п.1 также для подавления снижения содержания инсулина в крови после физической нагрузки.

3. Применение по п.1, когда физическая нагрузка продолжительная и/или интенсивная.

4. Применение по п.1, когда продукт потребляется перед началом или в процессе подхода к физическому упражнению.

5. Применение по п.1, когда полифенолы являются полифенолами какао.

6. Применение по п.1, когда полифенолы являются эпикатехином.

7. Применение по п.1, когда полифенолы являются катехином.

8. Применение по п.1, когда полифенолы являются олигомером эпикатехина.

9. Применение по п.1, когда количество полифенолов в продукте, измеренное при помощи реактива Фолина и выраженное в эквивалентах эпикатехина, составляет от 50 мг до 2500 мг.

10. Применение по п.6, когда количество эпикатехина в продукте составляет от 30 мг до 200 мг.

11. Применение по п.1, когда продукт, содержащий полифенолы и предназначенный для приема через рот, представляет собой какао-массу, какао-порошок, молочный или темный шоколад, зерновые хлопья, молочный продукт, энергетический батончик, желе, какао (напиток), горячий шоколад или биологически активную добавку.

12. Применение по п.11, когда биологически активная добавка представляет собой капсулу, таблетку, пилюлю, леденец или пастилку для рассасывания, драже или порошок.

13. Применение по п.1, когда продукт представляет собой темный шоколад, потребляемый перед началом подхода к физическому упражнению в количестве от 30 до 150 г.

14. Применение по п.1, когда продукт содержит до 0,5 г кофеина и/или до 1,0 г теобромина.

15. Применение по п.1, когда продукт практически не содержит жиров или сахара.

16. Применение по п.1 также для

- 5 - усиления мобилизации жиров после физической нагрузки,
- усиления бета-окисления жирных кислот после физической нагрузки,
- усиления глюконеогенеза в процессе и после физической нагрузки,
- усиления гликогенолиза в печени в процессе и после физической нагрузки,
- 10 - сокращения общего оборота глюкозы в организме в процессе и после физической нагрузки,
- уменьшения иммунодепрессии после физической нагрузки,
- ослабления изменений в уровнях некоторых гормонов (например инсулина) после физической нагрузки,
- 15 - снижения концентрации свободных F2-изопропанов в плазме крови после физической нагрузки,
- подавление снижения уровня инсулина в плазме крови (инсулинемии) после физической нагрузки,
- 20 - снижения уровня окисленных LDL в покое и в ходе физической нагрузки,
- повышения уровня IL-10, обладающего противовоспалительным действием,
- снижения утомления или ощущаемого напряжения,
- сокращения времени восстановления при утомлении или напряжении и после физической нагрузки и/или
- 25 - улучшения выполнения физического упражнения.

17. Применение по п.1, также для уменьшения ущерба от окислительного стресса в процессе или после физической нагрузки.

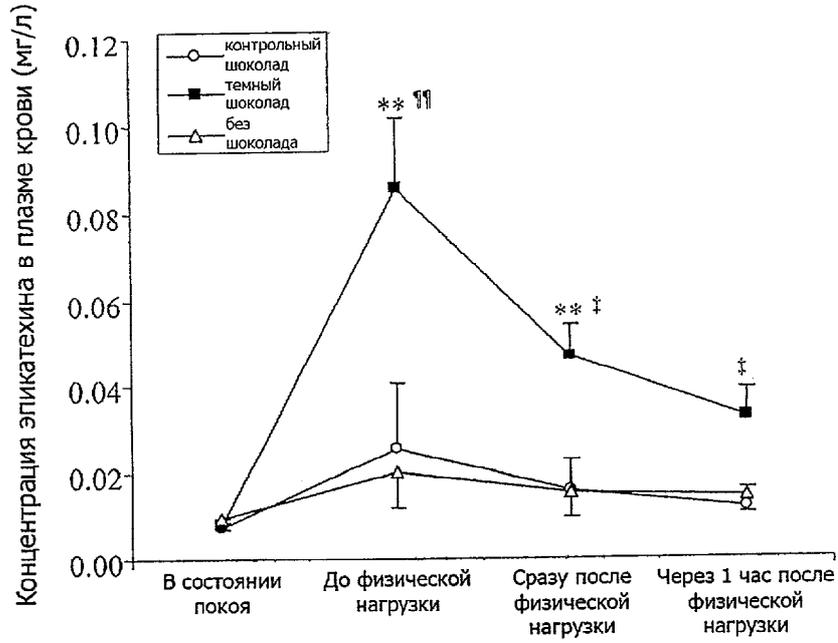
18. Применение по меньшей мере 25 мг полифенолов для изготовления продукта, предназначенного для потребления до или в процессе физической нагрузки для увеличения содержания полифенолов в крови после физической нагрузки.

19. Применение от 5 мг до 200 мг одного или более полифенолов для изготовления продукта, предназначенного для ежедневного потребления для подавления снижения содержания глюкозы в крови после физической нагрузки у лица, регулярно занимающегося физическими упражнениями.

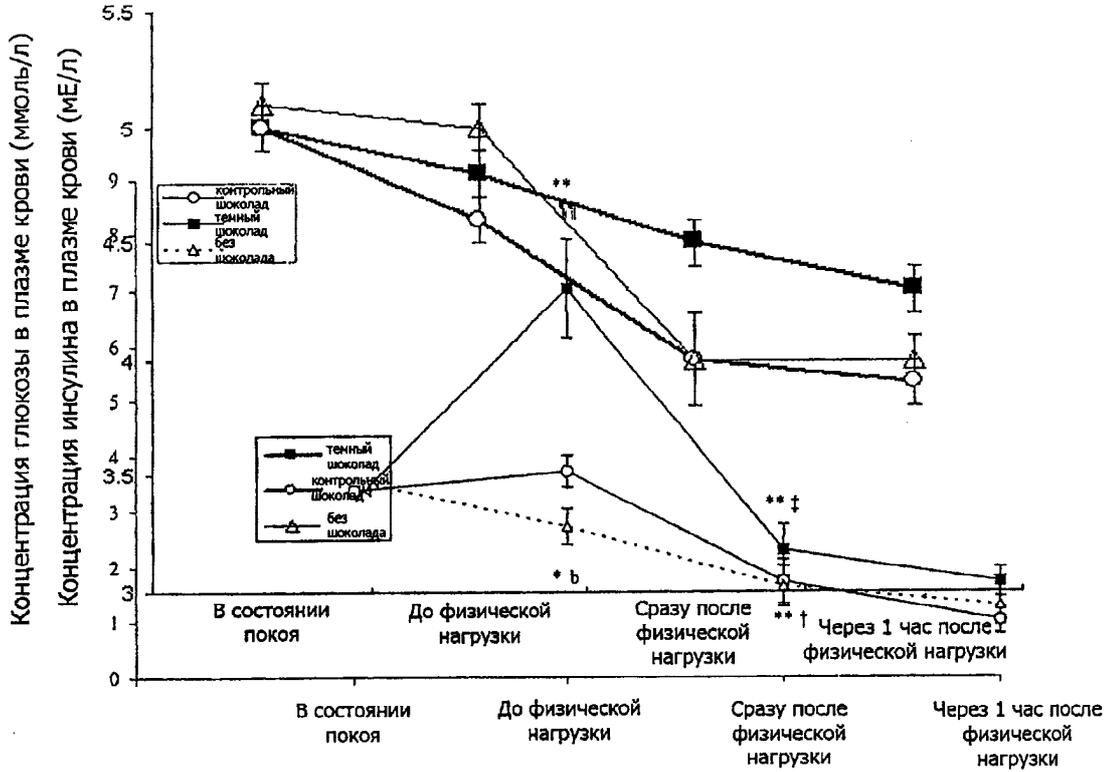
40

45

50



Фиг. 1



Фиг. 2