

СОДЕРЖАНИЕ ФИТОЭСТРОГЕНОВ В СЕРБСКИХ СОРТАХ КРАСНОГО КЛЕВЕРА

С. Васильевич, М. Бурсать*, Е. Цвейич*, В. Михайлович, Дж. Карагич,
Д. Милич, Б. Милошевич, С. Катански

Институт полеводства и овощеводства, Нови Сад, Сербия

**Медицинский факультет, кафедра фармации, университет Нови Сад, Сербия*

e-mail: sanja.vasiljevic@nsseme.com

Введение

Клевер луговой, или, иначе, **красный клевер** (*Trifolium pratense* L.) наряду с люцерной является наиболее важной многолетней бобовой кормовой культурой как в мире, так и в Сербии. Родиной красного клевера является Малая Азия и Юго-Восточная Европа. В древние времена, особенно в античном Риме, клевер носил ореол священного растения или веры в удачу, использовался как лекарственное растение для приготовления чая.

Как кормовое растение клевер луговой отличается высоким урожаем зелёного корма (40–60 т га⁻¹), быстрым восстановлением после скашивания и отличным качеством корма. Благодаря высокому индексу конкуренции красный клевер используется для выращивания в смеси с многолетними злаковыми травами. Клевер в травосмесях обеспечивает производство самых дешёвых кормов.

Одновременно клевер обладает высокой потенциальной способностью биологической азотфиксации, улучшает физическое состояние почвы. В почвенном слое клевер накапливает большое количество корневых остатков и до 110-150 кг/га биологического азота. В мире красный клевер выращивается на 20 млн га, а в Республике Сербия площадь под красным клевером в последние годы составляла около 116 тыс га (Статистический ежегодник Республики Сербия 2002–2012 гг.).

Производство семян красного клевера в Сербии в течение ряда лет не отвечает потребности для внутреннего обеспечения производственных посевов. Согласно последним данным Министерства сельского, лесного и водного хозяйства Сербии о производстве семян красного клевера в Республике Сербия в рамках различных договоров, наблюдается тенденция непрерывного снижения внутреннего производства семян красного клевера. Большинство семян видов клевера по-прежнему импортируется, хотя это не всегда обоснованно, учитывая слабую адаптацию иностранных сортов к почвенно-климатическим условиям страны.

Работа по селекции клевера лугового в Институте полеводства и овощеводства в г. Нови Сад началась в 90-х годах XX века с целью обеспечения внутреннего рынка качественным ассортиментом и необходимым количеством семян этой культуры, являющейся ведущей кормовой культурой на кислых почвах центральной части Республики Сербия. Главная цель селекции клевера лугового – создание долголетних сортов (до трех лет) с высокой урожайностью качественного корма, толерантных к экономически значимым болезням. Для того чтобы добиться успехов в селекционной работе, кроме адекватно выбранных методов селекции, очень важно собрать по возможности большее генетическое разнообразие.

Благодаря селекционной работе в Республике Сербия созданы многочисленные отечественные сорта клевера лугового. Они представляют собой ценный материал для производства недорогого и качественного корма для животных. Результатом проведенных работ по селекции клевера лугового стало включение в государственный реестр шести сортов из Нови Сада (НС): Колубара (2000 г.), Уна (2004), Авала (2008), НС-Млава (2010), НС-Раваница (2010) и НС Петница (2012).

Фитоэстрогены. История научного интереса к фитоэстрогенам начинается примерно с 30-х годов прошлого века [1], когда появились первые сообщения об изменениях эструса у

самок некоторых животных, избирательно поедающих некоторые виды растений. Известна так называемая «клеверная болезнь», впервые описанная у овец в Австралии, преимущественно питавшихся клевером, в результате чего страдала их плодовитость.

Другой факт касается разведения гепардов в питомниках, куда животные помещались для восстановления исчезающей популяции. Получая питание вне естественной среды обитания из рук человека, животные демонстрировали нарушение фертильности. Анализ диетических особенностей выявил избыточное содержание соевых продуктов. После устранения «соевого перекаса» положение выправилось.

Несколько позднее проблема фитоэстрогенов приобрела новый качественный оттенок. А именно, фитоэстрогены стали рассматриваться как средство профилактики гормонозависимых опухолей – рака молочной железы и рака предстательной железы. Изменение научного акцента произошло на волне всеобщего интереса к так называемому «японскому феномену». Суть его заключается в том, что японки значительно реже, нежели жительницы Европы и США, болеют раком молочной железы. После того, как стало ясно, что решающее влияние оказывает образ питания, были выделены его особенности. Они заключаются в употреблении большого количества морепродуктов, водорослей, рыбы, а также овощей и особенно сои. Впоследствии из сои были выделены флавоноиды генистеин и дайдзеин, для которых на большом экспериментальном материале была доказана активность по отношению к гормональной сфере.

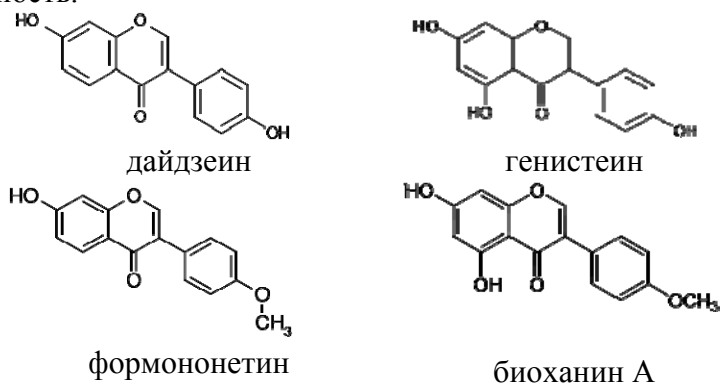
В частности, изучена и обоснована роль фитоэстрогенов, как средства профилактики и лечения постменопаузальных проблем – остеопороза и дистрофии слизистых половых органов.

В настоящее время процесс углубления знаний о фитоэстрогенах продолжается. Можно сказать, что в основном сформировался список растительных веществ, обладающих свойствами фитоэстрогенов, а также список растений с высоким содержанием фитоэстрогенов (соя, клевер луговой, люцерна, хмель, солодка, софора желтеющая). В главных аспектах раскрыты закономерности фармакологии данной группы веществ и отработаны методики определения количества и качества фитоэстрогенов в средах организма, в растительном сырье и в готовых препаратах [2, 3, 4, 5].

Некоторые образцы клевера лугового содержат высокий уровень фитоэстрогенов и их можно использовать для производства различных фармацевтических препаратов, которые предназначены для облегчения симптомов у женщин, которые находятся в периоде менопаузы [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

С другой стороны, так как клевер луговой широко используется для выпаса овец, программа селекции клевера для их кормления и улучшенной плодовитости должна быть направлена на создание сортов с низким содержанием фитоэстрогена формонетина [13].

Красный клевер является источником четырех фитоэстрогенных изофлавонов (дайдзеин, генистеин, формонетин, биоханин А), которые могут комплексно взаимодействовать с рецепторами эстрогенов у человека и животных и модулировать эстрогенную активность.



Методы исследования

Содержание изофлавонов в клевере луговом контролируется двумя факторами: генетическим и экологическим. Целью данного исследования было определить влияние генотипа (четыре сорта – Колубара, Уна, Авала и К-17 – имеющих происхождение из Сербии) на содержание изучаемых фитоэстрогенных изофлавонов (дайдзеин, генистеин, формононетин и биоханин А) в различных частях растений (листья, стебель и соцветия).

Образцы клевера лугового для анализа были взяты в фенологической фазе начала цветения со второго укоса из трёх повторений опыта (питомника красного клевера в Нови Саде) во второй год жизни клевера (2010-й год).

Метод определения фитоэстрогенов в клевере луговом

1.1 Подготовка образцов

Отдельные фракции растений в количестве 0,3–1 г (листья, цветы и стебли) смешивают с 2 мл воды и инкубируют в водяной бане в течение 30 минут при 37°C. Потом добавляют 16 мл этанола и 2 мл 3М соляной кислоты и образцы нагревают при перемешивании до кипения. После охлаждения экстракт фильтруют через фильтровальную бумагу. Для дальнейшей очистки экстрактов перед анализом с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) используют метод твердофазной экстракции [14].

1.2 Анализ изофлавонов с помощью ВЭЖХ

Изофлавоны были идентифицированы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием калибровочных кривых, соответствующих стандартным соединениям [15].

Результаты и обсуждение

Анализ общего содержания фитоэстрогенных изофлавонов в различных частях растений местных сортов клевера лугового (рисунок 1) показал, что оно самое высокое в листьях (5,36 мг/г), а самое низкое – в стеблях (1,05 мг/г). В среднем, сорт Колубара имел наибольшее общее содержание изофлавонов (3,27 мг/г), а сорт Уна – наименьшее (2,07 мг/г). Сорт Колубара отличался самым высоким содержанием изофлавонов в листьях (7,48 мг/г).

Биоханин А был доминирующим изофлавоном в листьях (1,26–3,62 мг/г – рисунок 2) и соцветиях (0,42–0,65 мг/г – рисунок 3). Генистеин у трех сортов (Авала, Уна, Колубара) из четырех имел самую высокую концентрацию в стеблях (0,14–0,52 мг/г – рисунок 4).

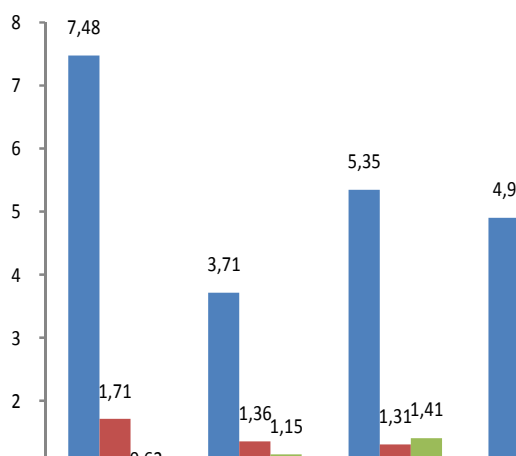


Рисунок 1 – Общее содержание изучаемых фитоэстрогенных изофлавонов (мг/г) в различных частях растений у сербских сортов клевера лугового

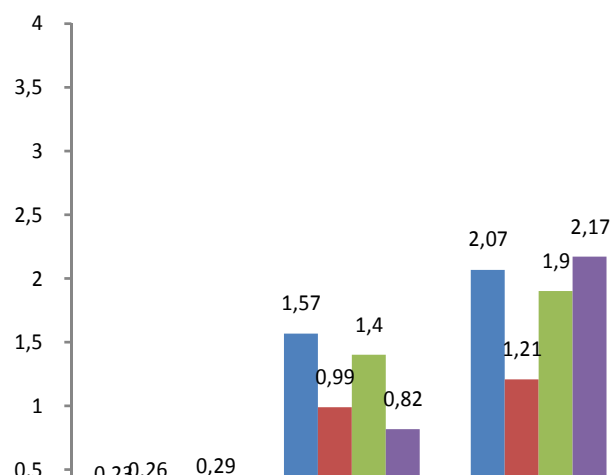


Рисунок 2 – Содержание изучаемых фитоэстрогенных изофлавонов (мг/г) в листьях у сербских сортов клевера лугового

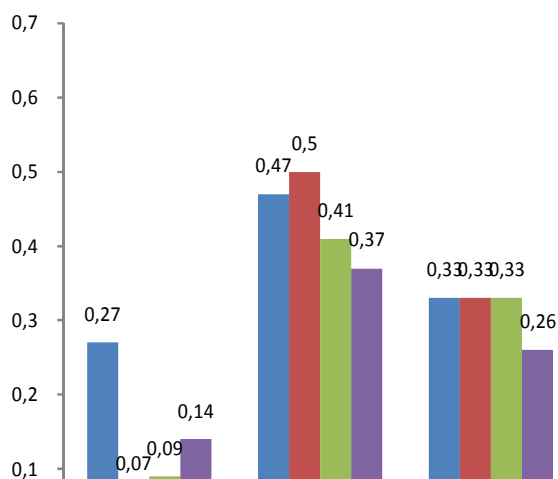


Рисунок 3 – Содержание изучаемых фитоэстрогенных изофлавонов (мг/г) в соцветиях у сербских сортов клевера лугового

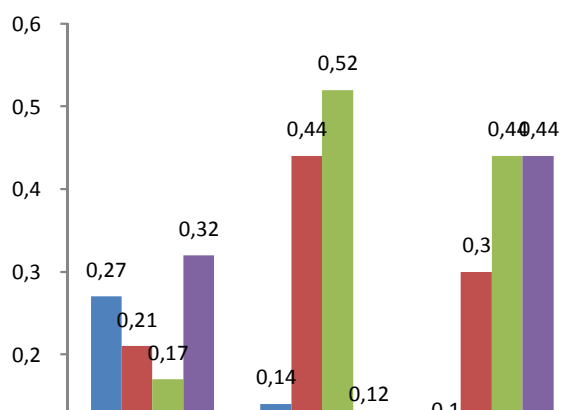


Рисунок 4 – Содержание изучаемых фитоэстрогенных изофлавонов (мг/г) в стеблях у сербских сортов клевера лугового

Ранее проведенные исследования подтвердили существование различия в содержании изофлавонов среди сортов клевера лугового [7, 16]. Также подтверждено влияние некоторых экологических факторов на содержание изофлавонов в красном клевере [7, 9].

Технология производства корма (сроки скашивания) также может влиять на содержание изофлавонов. Оказалось, что в случае задержки первого укоса в течение приблизительно 21 дня концентрация формонетина уменьшается примерно на 39%. Следует учитывать, что различие сортов по скороспелости может обуславливать различия в содержании изофлавонов при скашивании в один и тот же срок.

Изофлавоны имеют разную концентрацию в различных частях растений. Было обнаружено, что стебель и черешки листьев содержат более низкие концентрации формонетина и биоханина А, чем листья [8]. Самое высокое содержание изофлавонов обнаружено в листьях, а самое низкое – в соцветиях клевера лугового [8]. Способ сохранения и использования клевера лугового как корма значительно влияет на концентрацию изофлавонов [7]. Было обнаружено, что клевер луговой, который используется как силос, содержит на 18% изофлавонов больше, чем сено.

Если вывести средний процент изучаемых фитоэстрогенных изофлавонов во всех анализируемых образцах клевера лугового, можно констатировать, что биоханин А составил 35%, формонетин 32%, генистеин 25% и дайдзеин 8% от общего содержания изофлавонов (рисунок 5).

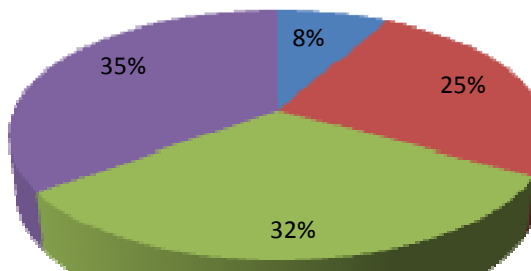


Рисунок 5 – Средний процент изучаемых фитоэстрогенных изофлавонов во всех анализируемых образцах клевера лугового

Выводы

Концентрация изофлавонов наибольшая в листьях клевера лугового. Сорт Колубара отличается самым высоким содержанием изофлавонов в листьях (7,48 мг/г). Доминирующим изофлавоном во всех анализируемых образцах клевера лугового является биоханин А. Общее содержание изофлавонов варьирует у различных сортов. В среднем, у сорта Колубара самое высокое содержание изофлавонов (3,27 мг/г), а у сорта Уна – самое низкое (2,07 мг/г).

Список литературы

1. Алефиров А.Н. Фитоэстрогены в онкологии. Лекция №18./ XVII Российский национальный конгресс «Человек и Лекарство», г. Москва, 12-16.04.2010 г.
2. Cvejić J. Isoflavone composition in F1 soybean progenies./ Cvejić J, Tepavčević V, Bursać M, Miladinović J, Malenčić Đ // *Food Research International* 2011;44:2698-2702.// doi:10.1016/j.foodres.2011.05.024.
3. Tepavčević V. Isoflavone Composition, Total Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in Soybeans of Different Origin./ Tepavčević V, Atanacković M, Miladinović J, Malenčić Dj, Popović J, Cvejić J// *Journal of Medicinal Food*, (2010) Vol. 13(3), pp1-8. (IF 1.390).
4. Malenčić Đ. Polyphenol Content and Antioxidant Properties of Colored Soybean Seeds from Central Europe/ Malenčić Đ, Cvejić J, Miladinović J// *Journal of Medicinal Food*, (2011), 15 (1):89-95.
5. Cvejić J. Determination of phytoestrogen composition in soybean cultivars in Serbia. / Cvejić J, Malenčić Đ, Tepavčević V, Poša M, Miladinović J// *Natural Product Communications*, (2009), Vol. 4 (8), 1069-1074. (IF 0.745).
6. Kovačević N, Kundaković T (2005): Biljni proizvodi u prevenciji i terapiji blažih oblika simptoma menopauze. *Arhiv za farmaciju*, 55, 2, 197-208.
7. Sivesind E. Effects of the Environment, Cultivar, Maturity and Preservation Method on Red Clover Isoflavone Concentration./ Sivesind E, Seguin Ph // *J Agric Food Chem* -2005-Vol. 53. P. 6397-6402.
8. Tsao R. Isoflavone Profiles of Red Clover and Their Distribution in Different Parts at Different Growing Stages./ Tsao R, Papadopoulos Y, Yang R, Yang J C, McRae K.// *J Agric Food Chem* – 2006 – Vol. 54, P. 5797-5805.
9. Booth N L. Seasonal Variation of Red Clover (*Trifolium pretense* L., Fabaceae) Isoflavones and Estrogenic Activity./ Booth N L, Overk C R, Yao P, Totura S, Deng Y, Hedayat A S, Bolton J L, Pauli G F, Farnsworth N R// *J Agric Food Chem*. – 2006 – Vol. 54, P. 1277-1282.
10. Bursać M. Isoflavone profiles in different plant parts of red clover./ Bursać M, Atanacković M, Cvejić J, Vasiljević S. // Meeting Abstract; Antalya, Turkey GA 2011), *Planta Medica*, 2011;77(12):1365.
11. Bursać M. Antioxidant activity and total phenolic content of red clover extracts. International conference / Bursać M, Atanacković M, Cvejić J, Vasiljević S, Milić N.// *Medicinal and aromatic plants in generating of new values in 21st century*, 9-12 novembar 2011, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, Knjiga sažetaka , 39-40.
12. Cvejić J. Content of isoflavones in red clover extracts. International conference / Cvejić J, Bursać M, Atanacković M, Vasiljević S.// *Medicinal and aromatic plants in generating of new values in 21st century*, 9-12 novembar 2011, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, Knjiga sažetaka ,55-56.
13. McDonald M F. Reproductive performance of ewes after grazing on G27 red clover, a low formononetin selection in cultivar Pawera / McDonald M F, Anawar M, Koegh R G.// *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* - 1994 – Vol. 54, P. 231-234.
14. Klejdus, B. et al. (1999) *J Chromatogr A* 839:261-263
15. Krenn, L. et al. (2002) *J Chromatogr B* 777:123-128.
16. Grazielle P Ramos. Genetic variability of isoflavones in the USDA red clover core collection/ Grazielle P Ramos, Paula M B Dias, Cláudia B Moraes, Miguel Dall 'agnol, José A S Zuanazzi // *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 11/2012; DOI:http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000130

Благодарности:

– Двустороннее сотрудничество «Селекция кормовых бобовых растений в Беларуси и Сербии, как две восточно европейской области с различным экологическими условиями (КОРМОБОБ)».

– Проект, № 31024 Министерства образования, науки и технологического развития Республики Сербии.