



Биолог. журн. Армении, 2 (70), 2018

ДЕЙСТВИЕ *TRIFOLIUM PRATENSE* (КЛЕВЕР ЛУГОВОЙ) НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

И.А. БАДАЛЯН*, А.А. ТРЧУНЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии
irinabadalyan@ysu.am

Показано, что гипобарическая гипоксия вызывает оксидативный стресс, который активизирует перекисное окисление липидов (ПОЛ), вследствие чего возрастает накопление конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) в тканях мозга и печени крыс. При добавлении в рацион крыс измельченных цветков *Trifolium pratense* (клевер луговой) в количестве 0.5 г на 100 г массы животного в день в течение 10 и 25 дней накопление МДА при гипоксии значительно снижается в результате, по-видимому, повышения антиоксидантной защиты (АОЗ) организма. Предлагается включение этих растений в рацион питания.

Гипобарическая гипоксия – перекисное окисление липидов – Trifolium pratense (клевер луговой) – антиоксидантная система защиты

Ցույց է տրված, որ հիպոբարիկ հիպոքսիան առաջացնում է օքսիդացիոն սթրես, որն ակտիվացնում է լիպիդային գերօքսիդացումը (ԼԳՕ), ինչի արդյունքում առնետների ուղեղի և լյարդի հյուսվածքներում մեծանում է ԼԳՕ-ի վերջնական արգասիքը՝ մալոնային դիալդեհիդը (ՄԴԱ): Առնետների կերի մեջ *Trifolium pratense* (երեքնուկ մարգագետնային) բույսի մանրացված ծաղիկների ավելացման դեպքում մեկ օրում կենդանու 100 գ թաշին 0,5 գ բանակով 10 կամ 25 օրերի ընթացքում ՄԴԱ-ի կուտակումը հիպոքսիայի պայմաններում զգալիորեն նվազում է՝ օրգանիզմի հակաօքսիդանտային պաշտպանության ակտիվացման հետևանքով: Առաջարկվում է մտնդակարգում այդ բույսի ընդգրկումը:

Հիպոբարիկ հիպոքսիա – լիպիդների գերօքսիդացում – Trifolium pratense (երեքնուկ մարգագետնային) – հակաօքսիդանտային պաշտպանության համակարգ

It has been shown that hypobaric hypoxia caused oxidative stress, which triggers lipid peroxidation, increasing accumulation of the end product of lipid peroxidation – malondialdehyde (MDA) in the tissues of brain and liver of rats. At the addition of shredded flowers of plant *Trifolium pratense* (red clover) to the diet of animals in the amount of 0.5 g per 100 g rats weight per day during 10 or 25 days, accumulation of the MDA at hypoxia was significantly decreased as a result of activation of antioxidant protection of organism. The using of this plant material in diet is suggested.

Hypobaric hypoxia – lipid peroxidation – Trifolium pratense (red clover) – antioxidant defense system

Активные формы кислорода (АФК), образующиеся при различных патологических процессах у человека и животных, способны инициировать и активировать

процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), являющиеся одним из механизмов, ответственных за модификацию состава и физико-химических свойств клеточных мембран [5]. При физиологических условиях ПОЛ участвует в поддержании структурной целостности мембран и обеспечении работы транспортных систем, рецепторов и ферментов. Уровень ПОЛ зависит от свойств и соотношения про- и антиоксидантных систем и отражает функциональное состояние ткани, а также пластичность клеточных мембран. При выраженных нарушениях системы антиоксидантной защиты (АОЗ), включающей ферменты – супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу, ряд витаминов и другие компоненты, происходит вовлечение ПОЛ в механизмы постстрессорных и нейродегенеративных патологий [3, 11]. Большое значение в активации АОЗ имеют различные биологически активные вещества, содержащиеся в растениях: в частности, *Trifolium pratense* (клевер луговой) (рис. 1) содержит изофлавоноиды, генистеин и дайдзеин, а также другие фенолы, обладающие высокой антиоксидантной активностью и потому применяемых в пищу и народной медицине [7, 10]. Показана корреляция между содержанием фенолов и флавоноидов и антиоксидантной активностью у этих растений, при этом большое содержание их отмечается в цветках [10].



Рис. 1. *Trifolium pratense* (клевер луговой).

Гипоксия относится к одному из наиболее распространенных и клинически значимых стрессогенных факторов у человека и животных. Тяжелые формы гипоксии/ишемии с последующей реоксигенацией вызывают внутриклеточный оксидативный стресс – мощное усиление свободно-радикальных процессов ПОЛ [3, 6, 9]. Известно, что оксидативный стресс развивается также при гипобарической (высотной) гипоксии [3, 6]. В патогенезе гипоксии важную роль играет структурно-функциональная дестабилизация клеточных мембран, вызываемая ПОЛ. Активация ПОЛ и угнетение АОЗ приводят к подавлению пролиферативных процессов и вызывают значительные токсические эффекты, непосредственно затрагивающие центральную нервную систему [1, 6]. При тяжелой гипобарической гипоксии в наиболее чувствительных к кислородному голоданию образованиях мозга (гиппокампе и неокортексе) резко изменяется степень окисленности мембран, что обусловлено не только увеличением количества двойных связей в жирных кислотах липидов, но и уменьшением количества углеводородных цепей. Таким образом, тяжелая гипобарическая гипоксия вызывает оксидативный стресс – нарушение баланса про- и антиоксидативных систем в пользу первых, которые инициируют и активизируют ПОЛ [3]. Однако биохимические механизмы активации АОЗ остаются неясными. Непонятно также действие различных антиоксидантов, в том числе содержащихся в растениях и поступающих в организм с пищей.

Целью настоящей работы явилось исследование процессов ПОЛ в мозге и печени крыс в условиях гипобарической гипоксии (7.5-8 км над ур. моря), а также влияния растительного материала *T. pratense* на динамику ПОЛ в этих условиях.

Материал и методика. Животные и их подготовка к эксперименту, растительный материал. Эксперименты проводились на белых беспородных крысах (использовано 20 экспериментальных крыс) в возрасте 4-6 месяцев массой 150-200 г в нормальных условиях и условиях гипоксии, созданных в барокамере. Крыс “поднимали” на высоту 7.5-8 км (300 мм рт. ст.) на 30 мин. Гипоксии подвергались животные с обычным рационом (сухой хлеб и зерновые) без диеты и с добавлением в корм цветков *T. pratense* из расчета 0,5 г измельченного растительного материала на 100 г массы животного в день в течение 10 и 25 дней. Растения *T. pratense* собирали возле Анкавана (Котайкская область, Армения), находящегося на высоте 1900 м над ур. моря. Животных декапитировали после воздействия гипоксии, извлекали головной мозг и печень и готовили 10%-ный гомогенат в 1,2%-ном КСІ. Процедуры проводили в соответствии с правилами биоэтики, утвержденными Национальным комитетом по биоэтике (Армения).

Определение ПОЛ. Интенсивность ПОЛ в гомогенате тканей определяли по концентрации малонового диальдегида (МДА) в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [4, 8]. Содержание МДА выражали в единицах концентрации (мкМ) на г ткани (гомогената). Данные представляли в виде средних арифметических величин со стандартной ошибкой в соответствии с программой Microsoft Excel 2013. Статистическая обработка данных разных серий экспериментов проводилась с использованием критерия Стьюдента (p); разница между результатами разных серий экспериментов принималась достоверной, если $p < 0,5$.

Результаты и обсуждение. Исследовались процессы ПОЛ в мозге и печени крыс в нормальных условиях и при высотной гипоксии (7.5-8 км над ур. моря). Согласно полученным данным, в нормальных условиях (без гипоксии) содержание одного из конечных продуктов ПОЛ–МДА в мозге и печени составляло 12,65 мкМ/г и 6,4 мкМ/г соответственно (табл. 1). Однако в условиях гипоксии резко увеличивается накопление МДА – в мозге до 53.85 мкМ/г, в печени до 36.85 мкМ/г (табл. 1). Можно заключить, что содержание МДА в нормальных условиях, а также его накопление, вызванное гипоксией, в мозге значительно превышает эти показатели в печени.

Таблица 1. Влияние гипоксии на процесс перекисного окисления липидов в головном мозге и печени крыс (n=4; p<0,01)

Условия опыта	Содержание МДА (мкМ/г ткани)	
	Мозг	Печень
Норма	12.65 ± 1.50	6.40 ± 0.75
Гипоксия	53.85 ± 4.20	36.85 ± 3.62

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о довольно низком уровне АОЗ в мозге и большом содержании ферментов этой системы в печени [1]. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что при гипоксическом воздействии в тканях происходит накопление ненасыщенных жирных кислот, что создает субстрат для развития цепных реакций ПОЛ при реоксигенации. В работах других авторов [3] также показано значительное увеличение первичных и в результате их распада образование вторичных (МДА) продуктов ПОЛ при гипобарической гипоксии. При реоксигенации резко возрастает образование АФК, которые могут повреждать клетку за счет активации перекисного окисления [5]. Следует заметить, что гипоксия угрожает функциям мозга человека в течение всей жизни, начиная с ранних стадий внутриутробного развития до старости [1].

Влияние растительного материала *T. pratense* на ПОЛ. Существуют различные способы адаптации к гипоксии, одним из которых является воздействие на организм антиоксидантов и антигипоксантов. Антиоксидантные и антигипоксические эффекты, присущие фенолам и другим химическим соединениям, выявляются у многих растений, к числу которых относится *T. pratense* [9, 10]. Антигипоксическое влияние различных частей этого растения было показано при исследовании амидированности мозга и печени крыс; при этом происходящее при гипоксии амидирование белков тканей крыс заметно снижалось при добавлении в рацион животных цветков вышеуказанного растения, динамика амидных групп при этом также приближалась к показателям контрольной группы [2].

При исследовании в условиях гипоксии процессов ПОЛ в мозге и печени крыс (табл. 2) при добавлении в рацион животных цветков *T. pratense* в течение 10 дней было обнаружено значительное снижение накопления МДА как в мозге – до 33,15 мкМ/г, так и в печени – 22,95 мкМ/г.

Таблица 2. Влияние растений *Trifolium pratense* на процесс перекисного окисления липидов в головном мозге и печени крыс в условиях гипоксии (n=4; p<0,01)

Условия опыта	Содержание МДА (мкМ/г ткани)	
	Мозг	Печень
Гипоксия	53.85 ± 4.20	36.85 ± 3.62
Диета 10 дней + гипоксия	33.15 ± 3.30	22.95 ± 2.10
Диета 25 дней + гипоксия	13.75 ± 1.70	6.80 ± 0.43

При 25–дневной диете наблюдалось еще большее снижение МДА – до 13,75 мкМ/г в мозге и 6,8 мкМ/г в печени, в результате чего содержание МДА при гипоксии приближается к величинам МДА в норме – 12,65 мкМ/г в мозге и 6,4 мкМ/г в печени (табл. 2). Следовательно, влияние растительного материала зависит от количества (или продолжительности) его использования: оно сильнее при более длительном его использовании.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что растение *T. pratense* обладает выраженным антиоксидантным свойством, благодаря которому происходит снижение уровня ПОЛ в результате, по-видимому, сдвига в соотношении про- и анти-оксидантных систем защиты в пользу последних в условиях гипобарической гипоксии. Не исключается и изменение активности ферментов АОЗ [5, 9, 11]. При этом участие различных компонентов АОЗ может усиливаться за счет, например, фенолов и флавоноидов растительного материала [9, 10], что может стать предметом дальнейших исследований и получить практическое применение. Возможно предложить включение растительного материала *T. pratense* в диету и обосновать его применение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Граф А.В., Гончаренко Е.Н., Соколова Н.А., Ашмарин И.П. Антенатальная гипоксия: участие в развитии патологий ЦНС в онтогенезе. *Нейрохимия*, 25, 11-16, 2008.
2. Карапетян М.А., Адамян Н.Ю., Бадалян И.А., Давтян М.А. Влияние *Trifolium pratense* на нейрофизиологические процессы и амидированность белков головного мозга крыс при гипоксии. *Мат. конференции “Физиологические механизмы регуляции деятельности организма.”* Ереван. с. 180-185, 2012.

3. Кислин М.С., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Динамика перекисного окисления липидов в гиппокампе и неокортексе крыс после тяжелой гипобарической гипоксии. *Нейрохимия*, 26, 213-219, 2009.
4. Рогожин В.В., Курилюк Т.Т., Кершенгольц Б.М. Способ определения концентрации малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты, Патент Российской Федерации № 2112241, 1998.
5. Северин Е.С. Перекисное окисление липидов, роль в патогенезе повреждений клетки, В кн.: *Биохимия*, 5-е изд., с. 419-423, 2009.
6. Трофимова Л. К., Маслова М.В., Граф А.В., Маклакова А.С., Соколова Н.А., Кудряшова Н.Ю., Крушинская Я.В., Гончаренко Е.Н., Байжуманов А.А. Влияние антеннаматального гипоксического стресса разной этиологии на самцов: корреляция поведенческих паттернов с изменениями активности антиоксидантной защиты и метаболизма ГАМК. *Нейрохимия*, 25, 86-89, 2008.
7. Esmaili K.A, Taha M.R, Mohajer S., Banisalam B. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from *in vivo* and *in vitro* grown *Trifolium pratense* L. (red clover). *BioMed Res. Intern.* Article ID 643285, 1-11, 2015.
8. Janero D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology Med.*, 9, 515-540, 1990.
9. Pisoschi A.M., Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.*, 97, 55-74, 2015.
10. Vlaisavljević S, Kaurinović B, Popović M, Vasiljević S. Profile of phenolic compounds in *Trifolium pratense* L. extracts at different growth stages and their biological activities. *Int. J. Food Properties*, 20, 3090-3011, 2017.
11. Mu H., Bai Y.H., Wang S.T., Zhu Z.M., Zhang Y.W. Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). *Phytomedicine*, 16, 314-319, 2009.

Поступила 19.01.2018