

Исследование цитотоксичности различных фракций одного из видов пива

КАЛИНИНА А.Г. ФГУ «ННЦ наркологии» Минздравсоцразвития РФ
КОВАЛЕНКО Н.А. Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития РФ
АБАКУМОВА О.Ю. НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН
ЖДАНОВ Д.Д. Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития РФ

Предпринято фракционирование одного из сортов пива с целью обнаружения токсического компонента в опытах in vitro (на культивируемых клетках). Фракционирование проводили путем осаждения высокомолекулярных компонентов высаливанием сульфатом аммония или 70%-ным этанолом с последующей гель-фильтрацией осадков и надосадков на колонке с сефадексом. Цитотоксическая активность выявляется в низкомолекулярных фракциях исследуемого сорта пива.

Ключевые слова: цитотоксическая активность, фракционирование пива, токсические компоненты пива

Введение

Потребление пива в России сейчас находится на уровне 65—68 л на человека в год, в то время как среднестатистический европеец выпивает до 110 л пива. Самый высокий уровень потребления пива принадлежит чехам — они выпивают больше 170 л в год. Максимальное потребление пива в нашей стране зарегистрировано в Москве и Санкт-Петербурге, 90 и 100 л в год на человека соответственно [2, 5].

Основная причина заметного роста потребления пива — его высокая доступность и абсолютная терпимость к повсеместному потреблению. Вкусовые качества едва ли могут привлекать потребителей, по крайней мере, на начальных сроках потребления. Пиво пьют более половины совершеннолетних россиян, в основном молодые люди мужского пола. Отмечен рост потребления пива среди подростков обоего пола [4, 5]. Данные эпидемиологов Лондонской школы гигиены и тропической медицины также свидетельствуют о том, что потребление пива в России и ряде других стран постсоветского пространства наиболее распространено среди молодых лиц, в основном мужского пола [12]. Многие исследователи отмечают, что риск развития алкогольной зависимости у потребителей пива выше, чем у потребителей вина или крепких алкогольных напитков [8, 9].

При злоупотреблении алкогольными напитками, как известно, развивается острый и хронический токсический гепатит, гепатиты смешанной этиологии, панкреатит, язвенная болезнь различных отделов желудочно-кишечного тракта. В последнее время эти заболевания особенно часто обнаруживаются при употреблении преимущественно слабоалкогольных напитков (вино, пиво, коктейли). При этом отмечаются особенно тяжелое течение заболевания и сложность терапевтических подходов. Среди заболевших преобладает молодежь 18—26 лет [8, 9].

Отмечено влияние потребления пива даже в умеренных количествах на возрастание риска заболевания раком пищевода. По данным южноафриканских исследователей, причиной этого является употребление пива, приготовленного из зараженного плесенью зерна [6]. Наличие микотоксинов доказано и для ряда африканских сортов пива, приготовленных из зараженного сорго [11]. Как показали перекрестные популяционные исследования, потребление пива втрое увеличивает риск развития возрастной атрофии желтого пятна сетчатки, тогда как потребление вина снижает этот риск на 30—50% [7].

Перспективные исследования шведских авторов, наблюдавших 61 081 женщину на протяжении 13,5 года, показали наличие прямой корреляции между объемом потребляемого пива и риском возникновения эпителиального рака яичников. Доказано, что это действие пива не может объясняться только эффектом алкоголя, в качестве вероятной причины авторы рассматривают наличие в нем канцерогенных нитрозаминов [10].

Описываемой работе предшествовал ряд экспериментов на беспородных крысах и крысах линии Вистар, которые подвергались длительной интоксикации одним из видов пива, широко потребляемых молодым населением России, в частности Москвы. Животные получали пиво в качестве единственного источника жидкости для питья на протяжении 15—18 недель по 5 дней в неделю с перерывом в 2 дня для предотвращения депривации. В эти 2 дня животным предоставлялась питьевая вода.

Были обнаружены серьезные нарушения в органах крыс: среднекапельное ожирение гепатоцитов, особенно прилежащих непосредственно к центральным венам, в цитоплазме гепатоцитов массово представлен алкогольный гиалин, на стенке центральных вен и паравенулярных отделах накопление коллагенов I и

III типов. Обнаружено большое количество некротизированных гепатоцитов и апоптозных телец (тельца Каунсильмена).

Поджелудочная железа поражена перидуктальным склерозом с множеством некротических очагов. В головном мозге обнаружены как атрофированные, так и резко увеличенные («набухшие») нейроны. Массово представлена пролиферация сосудов эндотелия [3].

С целью экспериментальной проверки возможного токсического действия компонентов пива была принята данная работа. В качестве объекта исследования использовалось пиво той же марки, что и пиво, используемое для экспериментов *in vivo*.

Материалы и методы

Для определения принадлежности токсического действия какому-либо компоненту напитка пиво подвергали фракционированию. В первой серии опытов пиво высаливали сульфатом аммония (Serva, Германия) до 80% насыщения при перемешивании и температуре 4°C, поддерживая pH = 7,0—7,5 концентрированным раствором NaOH (Sigma, США). Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 6000g. Далее материал осадка растворяли в минимальном количестве буфера РМ16 (Serva, Германия).

Супернатант после высаливания концентрировали лиофилизацией приблизительно в 5 раз.

Растворенный материал осадка (в дальнейшем — О1) и материал концентрированного супернатанта (в дальнейшем — С1) подвергали фракционированию на колонке с сефадексом G25 fine (Pharmacia, Швеция) размером: высота — 23 см, диаметр 2,5 см. Вносили для разделения 2,5 мл, собирали фракции по 5 мл. Результаты фракционирования фиксировали с помощью измерения поглощения каждой фракции на спектрофотометре при следующих длинах волн: 210 нм, 260 нм и 280 нм.

Определения концентрации белка в соответствующих фракциях проводили по формуле:

$$C \text{ [мг/мл]} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260},$$

где A_{260} , A_{280} — значения оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм.

Во второй серии опытов доводили концентрацию этанола в пиве до 70%, прибавляя 96%-ный этанол при перемешивании и температуре 4°C. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 6000g, далее материал осадка растворяли в минимальном количестве буфера РМ16 (Serva, Германия). Супернатант концентрировали в роторном испарителе приблизительно в 20 раз. Материал растворенного осадка (О2) и сконцентрированного супернатанта С2 подвергали фракционированию на колонке с сефадексом G25 fine, как это описано для О1 и С1.

Для определения цитотоксичности фракций пива в опытах *in vitro* использовали культивируемые клетки НГУК 1 (глиальные клетки Гассерова узла крысы), К-562 (клетки эритромиелоидного лейкоза человека), ЭФЛЧ (эмбриональные фибробласты легких человека), НерG2 (гепатокарцинома человека) и MCF-7 (клетки аденокарциномы молочной железы человека).

Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях. Клетки MCF-7, НерG2 и ЭФЛЧ культивировали в среде ДМЕМ (Gibco, США), клетки К-562, НГУК 1 — в среде RPMI 1640 (Serva, Германия). Все среды содержали 10% эмбриональной телячьей сыворотки и глутамакс (Gibco, США), антибиотики пенициллин и стрептомицин 10 ед. и 10 мкг на 1 мл соответственно («Панэко», Россия).

Для определения цитотоксичности каждой полученной при хроматографии фракции клетки в логарифмической фазе роста пассировали в 96-луночные планшеты (Costar, США) по 100 мкл в лунку с плотностью $2,5 \times 10^3$ клеток в лунку для MCF-7, НерG2, ЭФЛЧ и НГУК1 и 5×10^3 клеток в лунку для К-562. Клетки преинкубировали в планшетах в течение 24 ч для их адаптации перед добавлением препаратов. Аликвотные части фракций — 15 мкл — добавляли к клеткам и далее культивировали в течение 72 ч. Количество метаболически активных клеток определяли, используя МТТ-тест, который проводили, как описано в работе [1]. Результаты тестирования в четырех повторениях выражали в доле (%) выживших клеток по сравнению с контролем (100%).

Результаты и обсуждение

В случае фракционирования сульфатом аммония и далее гелефильтрацией в О1 обнаруживается довольно выразительный пик, принадлежащий высокомолекулярным соединениям (рис. 1, фракции 6—12), вероятно, преимущественно белковой природы. В супернатанте — С1 — высокомолекулярных соединений гораздо меньше (рис. 2, фракции 6—12).

На рис. 3—6 представлены результаты испытания цитотоксичности фракций, полученных после хроматографии на сефадексе G25 fine О1 и С1.

Как видно на рисунках, фракции, принадлежащие высокомолекулярным веществам (1—10 фракции), не проявляют цитотоксическую активность в отношении всех клеток, используемых в эксперименте. Цитотоксичность в отношении большинства тестируемых клеток проявили более низкомолекулярные фракции, наиболее часто фракции 17—22 и О1, и С1. Наличие цитотоксической активности в одних и тех же фракциях после гелефильтрации и в О1, и в С1 позволяет сделать предположение об одной и той же субстанции, проявля-

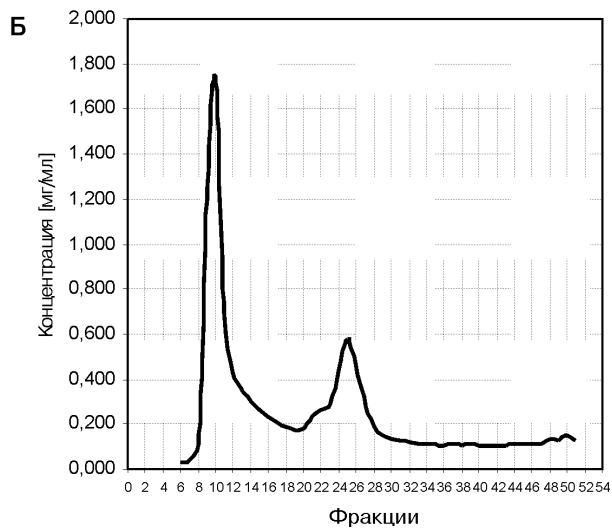
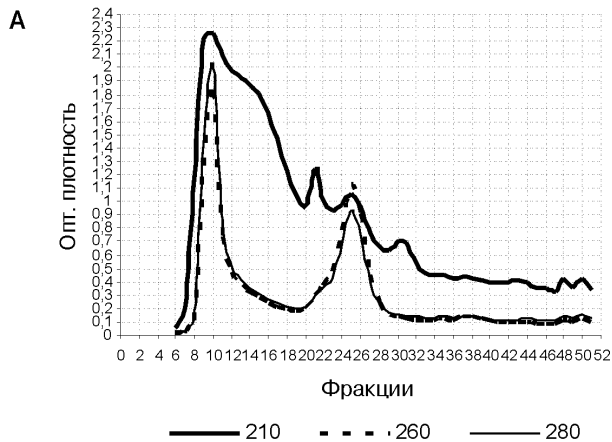


Рис. 1. А — хроматография высушенного материала (O1) на сефадексе G 25 fine; Б — концентрация белка (и, возможно, пептидов) во фракциях высушенного материала (O1)

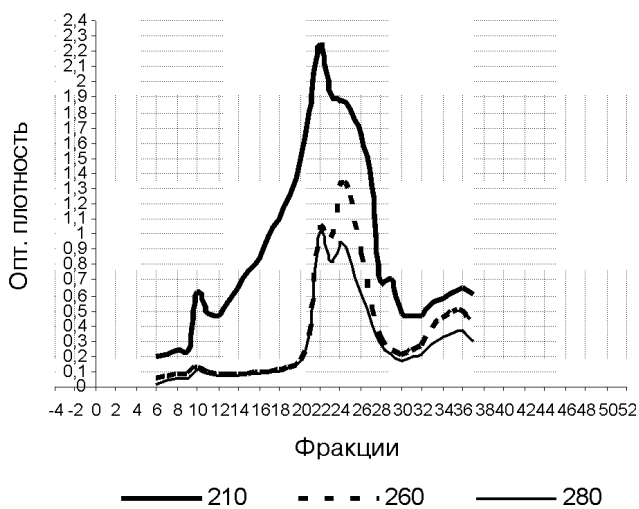


Рис. 2. Хроматография супернатанта (C1) после высаливания сульфатом аммония на сефадексе G 25 fine.

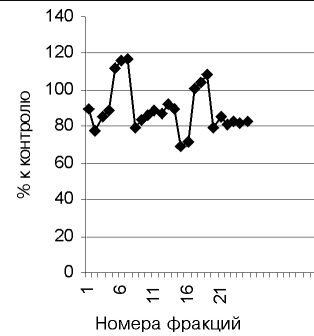


Рис. 3. Определение цитотоксичности для клеток MCF-7 фракций осадка — O1 (15 мкл, 48 ч), полученного после осаждения субстанций пива при 80%-ном насыщении сульфатом аммония

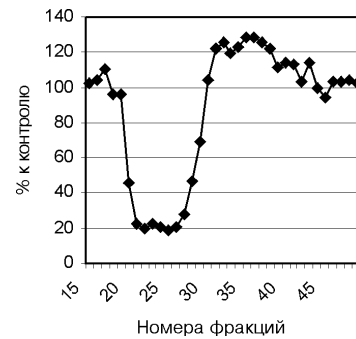


Рис. 4. Определение цитотоксичности для клеток MCF-7 супернатанта — C1 (15 мкл, 48 ч инкубации), полученного после осаждения субстанций пива при 80%-ном насыщении сульфатом аммония



Рис. 5. Определение цитотоксичности для клеток K-562 супернатанта — C1 (10 мкл, 72 ч инкубации), полученного после осаждения субстанций пива при 80%-ном насыщении сульфатом аммония

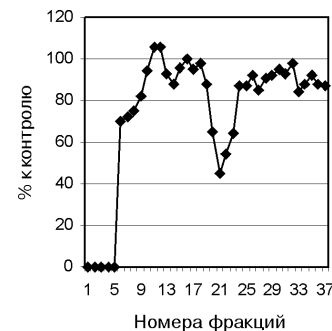


Рис. 6. Определение цитотоксичности для клеток НГУК1 супернатанта — C1 (15 мкл, 72 ч инкубации), полученного после осаждения субстанций пива при 80%-ном насыщении сульфатом аммония

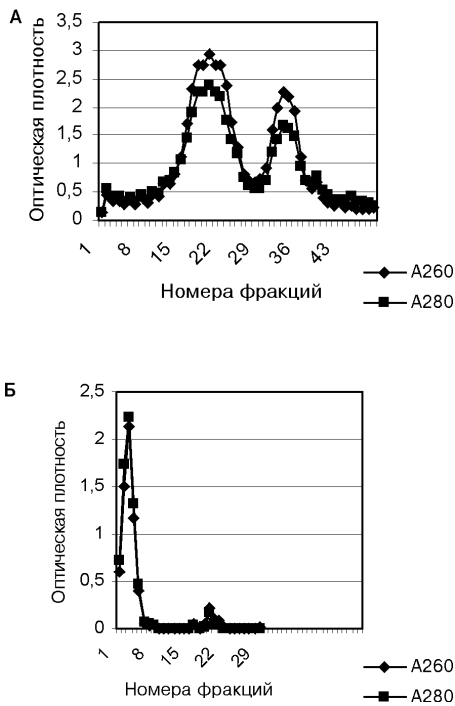


Рис. 7. Хроматография супернатанта — С2 (А) и материала осадка — О2 (Б) пива после осаждения 70%-ным этанолом

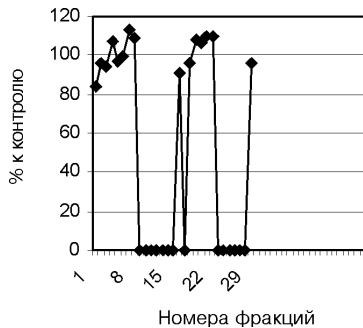


Рис. 8. Определение цитотоксичности для клеток Нер G2 фракций осадка пива — О2 (15 мкл, 72 ч) после осаждения этанолом 70%-ной концентрации

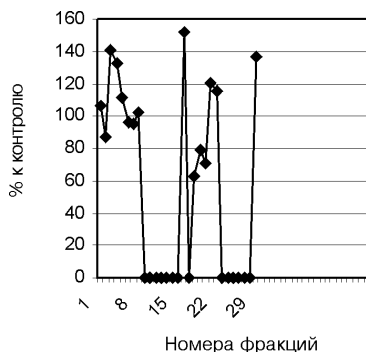


Рис. 9. Определение цитотоксичности для клеток ЭФЛЧ фракций осадка пива — О2 (15 мкл, 72 ч) после осаждения этанолом 70%-ной концентрации

ющей цитотоксичность. Однако в случае гель-фильтрации С1 фракции 21—22 совпадают с началом элюции с колонки сульфата аммония, что вызвало необходимость изменения способа фракционирования. Поскольку в высокомолекулярной фракции при неденатурирующих условиях высаливания цитотоксическая активность не была обнаружена, были применены более жесткие условия осаждения высокомолекулярных компонентов — этиловым спиртом с последующей гель-фильтрацией (рис. 7). Высокомолекулярная фракция присутствует в материале осадка — О2 и практически отсутствует в супернатанте — С2.

В опытах на клетках Нер G2 и ЭФЛЧ с высокомолекулярными фракциями О2, как и в случае с фракциями О1, цитотоксическое действие не выявлено (рис. 8, 9). Фракции О2 (21—25) проявили цитотоксическую активность в отношении клеток ЭФЛЧ (рис. 9), в тех же фракциях проявляется цитотоксическая активность и у С2 (рис. 10), кроме того, для С2 обнаружена цитотоксическая активность в отношении клеток ЭФЛЧ во фракциях 12—14. Фракции 25 и 37—39 С2 проявляют цитотоксичность в отношении клеток MCF7 (рис. 11). Так же, как и в случае с О1 и С1, чаще всего цитотоксическая активность обнаруживается в хроматографических фракциях 22—26.

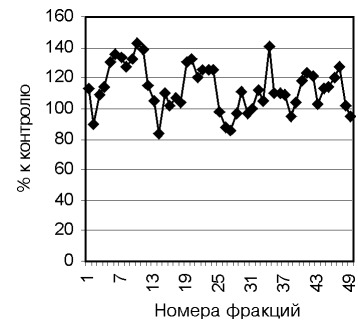


Рис. 10. Определение цитотоксичности для клеток ЭФЛЧ фракций супернатанта — С2 (15 мкл, 72 ч) после осаждения этанолом 70%-ной концентрации

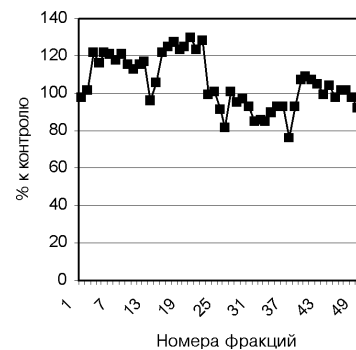


Рис. 11. Определение цитотоксичности для клеток MCF-7 фракций супернатанта — С2 (15 мкл, 72 ч) после осаждения этанолом 70%-ной концентрации

Таким образом, некоторые компоненты исследуемого пива обладают цитотоксической активностью, которая не связана с высокомолекулярными веществами. Наибольшая токсическая активность присуща фракциям пива с низкой молекулярной массой, что следует из результатов хроматографии на колонке с сефадексом. Наиболее часто цитотоксическая активность на разных клетках выявляется в 22—26 фракциях хроматографии надосадков.

Полученные результаты предполагают продолжение работы с целью:

- идентификации соединений, обеспечивающих токсичность фракций пива;
- исследования ряда сортов пива для отработки методики возможного создания универсальной тест-системы для определения качества и безопасности напитков, получаемых путем брожения субстратов растительного происхождения.

Выводы

1. Разработана методика, позволяющая определить принадлежность токсической активности какой-либо фракции пива.

2. Наибольшая токсическая активность присуща фракциям исследуемого пива с низкой молекулярной массой.

3. Высокомолекулярные фракции исследуемого пива не обладают цитотоксической активностью.

Список литературы

1. Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Борисова А.А., Сидорук К.В., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Покровская М.В., Кондакова Л.И., Соколов Н.Н. Противоопухолевая

активность L-аспарагиназы из *Yersinia pseudotuberculosis* // *Вопр. мед. химии.* — 2008. — Т. 54. — Вып. 6. — С. 712—719.

2. Егоров А.Ю. Рано начинающийся алкоголизм: современное состояние проблемы // *Вопр. наркологии.* — 2002. — №2. — С. 50—54.

3. Калинина А.Г., Тутаева Л.И., Савельев А.В., Костин А.Ю. Токсичность алкогольных напитков // *Материалы 1 Российского национального конгресса по наркологии с международным участием.* Москва, 24—29 ноября 2009 г. — С. 11—12.

4. Провинциальные студенты как потребители. Потребление алкогольных напитков, 2005 (<http://www.consumers.narod.ru/students/stalk.html>).

5. Российский рынок пива. Аналитический обзор по итогам 2005 года. — Союз российских производителей пива, 2006. — 72 с.

6. Dlamini Z., Bhoola K. Esophageal cancer in African blacks of Kwazulu Natal, South Africa: an epidemiological brief // *Ethn. Dis.* — 2005. — Vol. 15(4). — P. 786—789.

7. Fraser-Bell S., Wu J., Klein R. et al. Smoking, alcohol intake, estrogen use, and age-related macular degeneration in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study // *Am. J. Ophthalmol.* — 2006. — Vol. 141(1). — P. 79—87.

8. Gronbaek M., Jensen M.K., Johansen D. et al. Intake of beer, wine and spirits and risk of heavy drinking and alcoholic cirrhosis // *Biol. Res.* — 2004. — Vol. 37(2). — P. 195—200.

9. Hillemecher T., Bayerlein K., Reulbach U. et al. Influence of beer, wine and spirits consumption on craving // *Addict. Biol.* — 2005. — Vol. 10(2). — P. 181—186.

10. Larsson S.C., Wolk A. Wine consumption and epithelial ovarian cancer // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2004 — Vol. 13(11 Pt 1). — P. 1823.

11. Nkwe D.O., Taylor J.E., Siame B.A. Fungi, aflatoxins, fumonisin B1 and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana // *Mycopathologia.* — 2005. — Vol. 160(2). — P. 177—186.

12. Pomerleau J., McKee M., Rose R. et al. Drinking in the Commonwealth of Independent States—evidence from eight countries // *Addiction.* — 2005. — Vol. 100(11). — P. 1647—1668.

THE INVESTIGATION OF CYTOTOXICITY OF DIFFERENT FRACTIONS OF ONE SORT OF BEER

KALININA A.G.

FGU National Research Center on Addictions
of Ministry of Public Health and social development of Russian Federation

KOVALENKO N.A.

I.M. Sechenov First Moscow Medical Academy
of Ministry of Public Health and social development of Russian Federation

ABAKUMOVA O.Yu.

V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences

ZHDANOV D.D.

I.M. Sechenov First Moscow Medical Academy
of Ministry of Public Health and social development of Russian Federation

Fractionation of one sort of beer was made to detect toxic component during *in vitro* experiments (using cell culture method). This fractionation was fulfilled by the precipitation of high-molecular-weight components using salting out with ammonium sulfate or 70% ethanol followed by gel filtration technique on sefadex column. It was found that low-molecular-weight fractions of the investigated beer had cytotoxic activity.

Key words: cytotoxicity, fractionation of beer, toxic components of beer