

© Кулик Я.М., Рауцкієне В.Т., Обертюх Ю.В., Хіміч О.В., Римша О.В.

УДК: 633.34:636.084:599.32

Кулик Я.М.¹, Рауцкієне В.Т.¹, Обертюх Ю.В.², Хіміч О.В.², Римша О.В.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018), Інститут кормів та сільського господарства Поділля НААН (просп. Юності, 16, м. Вінниця, Україна, 21100)

ВИЯВЛЕННЯ НЕІДЕНТИФІКОВАНОГО ФАКТОРУ ТРАНСГЕННОЇ СОЇ У ВНУТРІШНІХ ОРГАНАХ ЩУРІВ ПРИ ЇЇ ДОВГОТРИВАЛОМУ ЗГОДОВУВАННІ

Резюме. При довготривалому згодовуванні щурам генетично модифікованої сої вперше виявлено наявність у водному екстракті внутрішніх органів щурів (печінка, нирки, серце та легені) біологічно активних сполук, які стимулюють розмноження і підвищення життєздатності інфузорій тетрахімена піріформіс.

Ключові слова: трансгенна соя, щури, екстракт внутрішніх органів, інфузорії.

Вступ

Генетично модифіковані (ГМ) сільськогосподарські культури входять до складу багатьох харчових продуктів, у тому числі й тих, що використовуються у харчуванні дітей. Найбільша частка модифікованих продуктів припадає на сою, жито, кукурудзу, рис та цукровий буряк. За даними [Тутельян, 2007; Левченко та ін., 2010], сьогодні близько 70 % сої генетично модифіковано. Причому вона не відрізняється від звичайної сої ні за зовнішніми ознаками, ні за смаком. Входить до складу різноманітних продуктів харчування: ковбасних виробів, фаршу, консервів, хлібобулочних виробів, кетчупів, жирів тощо. Важливо відмітити, що наявність зміненої генетичної інформації у сировині можна виявити лише зі спеціальним обладнанням для перевірки ДНК.

Сьогодні у науковому світі існують абсолютно протилежні думки щодо можливого впливу генетично модифікованих організмів (ГМО) на здоров'я людини, причому прихильники різних точок зору наводять переконливі аргументи. Але при цьому у більшості країн Євросоюзу з 2004 року використання ГМО в продуктах харчування для дітей до 4-х років заборонено [Кузнецов и др., 2010]. Прихильники використання ГМО вважають, що чужорідні генетичні вставки або плазміди повністю розщеплюються в шлунково-кишковому тракті тварини і людини, тому не можуть бути шкідливими. Протилежної думки дотримуються інші автори, які вважають, що дія ГМО на організм людини ще достатньо глибоко не вивчена, тому необхідною є заборона їх використання [Cantani, 2001; Кузнецов и др., 2010]. Слід пам'ятати, що всі теплокровні, в т. ч. і людина, мають ендосимбіонтів, зокрема, кишкову бактеріальну флору (*Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus*, *L. caucasicus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* та ін.). Відомо, що бактерії здатні до трансформації, причому трансформації піддаються як кільцеві, так і лінійні форми ДНК з інвертованими повтореннями [Lin et al., 2001]. Так фрагменти трансгенної ДНК були ідентифіковані у вмісті кишечника, крові, молоці корів і свиней, яким згодовували генетично модифіковану сою [Phipps et al., 2003; Chowdhury et al., 2003]. Плазміди і ГМ-вставки були виявлені в крові та

клітинах різних органів тварин і людей, які споживали ГМО [Schubbert et al., 1994; 1998; Netherwood et al., 1999]. У досліджах на лабораторних тваринах (миші, щури та хом'яки) при згодовуванні їм різних ГМ культур, як кормів у складі раціону, було встановлено патологічні зміни в печінці, підшлунковій і щитовидній залозах, селезінці та сім'яниках [Pusztai, 1998; Malatesta et al., 2002; 2003; Vecchio et al., 2003]. Поряд із цим виявлено порушення репродуктивних функцій у щурів, зміни гормонального балансу і безпліддя в наступних поколіннях [Ермакова, 2006, 2009; Ермакова, Барсков, 2008; Мальгин, Ермакова, 2008]. При дослідженні на мишах впливу білкового ізоляту, одержаного з ГМ сої (лінії 40-3-2, "Монсанто К", США), спостерігалось посилення в самок агресивності по відношенню до свого потомства і втрата материнського інстинкту [Носенко, 2008]. І, незважаючи на результати зазначених досліджень, дискусії відносно використання в харчуванні людей ГМ продуктів продовжуються.

Оскільки будь-яка думка щодо використання ГМ сої в продуктах харчування повинна обґрунтуватися результатами досліджень, нами за об'єкт досліджень було взято внутрішні органи щурів, яким тривало (протягом року) згодовували ГМ сою. Метою дослідження було виявлення можливого токсичного, поки-що неідентифікованого фактору ГМ сої у внутрішніх органах щурів.

Матеріали та методи

Дослідження проводили в умовах віварію Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова. Щурам (у кількості 36 тварин) дослідної групи з 2-місячного віку згодовували додатково до стандартного раціону впродовж року раундапостійку трансгенну сою у вигляді змелених, термічно оброблених бобів. Контрольна група щурів утримувалась на збалансованому стандартному раціоні. Доступ до кормів основного раціону, води та ГМ сої був вільним.

Через рік після згодовування щурам ГМ сої по 6 тварин із дослідної і контрольної групи декапітували. Евтаназію проводили під легким ефірним наркозом, без порушень норм гуманного поводження з лаборатор-

ними тваринами і з урахуванням загальноприйнятих біоетичних норм [Шевелева і др., 2008]. Від кожної тварини відбирали печінку, нирки, серце і легені. Внутрішні органи 2-х щурів обох груп паралельно поміщали в скляні стакани, доливали по 100 мл дистильованої води і кип'ятили 30 хвилин. Таким чином отримували по 3-и проби водного екстракту внутрішніх органів щурів дослідної і контрольної груп для дослідження в них можливого фактору трансгенної сої.

На нашу думку, у бобах ГМ сої можуть бути присутні поки що неідентифіковані активні сполуки, які синтезовані введеними генами ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens* або метаболіти гліфосату (раундапу).

Для виявлення фактору можливої токсичної дії ГМ сої у внутрішніх органах щурів, які тривало її споживали, нами був взятий метод визначення токсичності біопробу на інфузоріях тетрахімена піріформіс [ДСТУ 3570-97]. Метод базується на екстракції ацетоном токсичних сполук досліджуваної проби з наступним його випаровуванням і подальшому розчиненні залишку у воді та дії цих водних розчинів на інфузорії тетрахімена піріформіс. Ступінь токсичності досліджуваного матеріалу визначається за кількістю живих інфузорій через 30 і 60 хвилин після початку випробувань. У даний метод нами були внесені зміни, а саме: із внутрішніх органів щурів одержували водний екстракт (бульйон при кип'ятінні), тобто живильне середовище для інфузорій, спостереження за ними проводили не 60 хвилин, а впродовж 3-х днів.

Результати. Обговорення

При кип'ятінні в дистильованій воді внутрішніх органів щурів (печінки, серця, нирок і легень) у водний розчин переходять термостійкі водорозчинні білки, мінеральні речовини, нуклеїнові кислоти та інші низькомолекулярні сполуки. При цьому в дослідних варіантах, можливо, у розчин потрапляють і плазмідні, тобто кільцеві структури ДНК ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*, продукти синтезу гена цієї бактерії в бобах сої, тобто токсичні низькомолекулярні сполуки чи залишки гліфосату та його метаболітів, які є токсичними для одноклітинних живих організмів - інфузорій.

При постановці біопроби на інфузоріях з водними екстрактами печінки, нирок, серця і легень щурів, яким довготривало згодовували ГМ сою, нами передбачалась пригнічувальна дія цих водних екстрактів на життєздатність одноклітинних живих організмів - тетрахімена піріформіс, а виявлено стимулювання їх розмноження і підвищення життєздатності. Підтвердженням цьому є реакція інфузорій тетрахімена піріформіс у живильному середовищі водного екстракту печінки, нирок, серця і легень щурів, які впродовж року одержували додатково до раціону віварію прожарену ГМ сою порівняно із такими ж щурами за віком, але які не одержували ГМ сої (табл. 1).

Аналіз одержаних результатів досліджень засвідчує,

Таблиця 1. Результати спостереження за життєздатністю інфузорій тетрахімена піріформіс у живильному середовищі водного екстракту печінки, нирок, серця і легень щурів, яким згодовували ГМ сою.

Термін спостереження	Контроль	Дослід
1 день, водний екстракт внутрішніх органів 2-х щурів (1, 2, 3 проби)	Спостерігається розмноження і активний рух	Спостерігається активне розмноження і активний рух
2 день, водний екстракт внутрішніх органів 2-х щурів (1, 2, 3 проби)	Розмноження не спостерігається, рух повільний	Спостерігається розмноження і активний рух
3 день, водний екстракт внутрішніх органів 2-х щурів (1, 2, 3 проби)	Спостерігається загибель інфузорій до 80 %	Спостерігається загибель інфузорій до 60 %

що у внутрішніх органах, зокрема, в печінці, нирках, серці та легенях щурів, яким згодовували впродовж року трансгенну сою, очевидно знаходяться біологічно активні сполуки синтез яких, на нашу думку, обумовлюють плазмідні *Agrobacterium tumefaciens*, які є фактором стимулювання розмноження і життєздатності інфузорій тетрахімена піріформіс, і не мають токсичного впливу на їх життєздатність. Слід зазначити, що інфузорії - це одноклітинний живий організм близький до клітин організму тварин і людини. Живуть інфузорії у прісних водоймах і живляться рослинними рештками і різними бактеріями, а також ймовірно, ґрунтовими *Agrobacterium tumefaciens*. Відомо, що інфузорії розмножуються безстатевим шляхом - поперечним поділом клітини або пупкуванням, і періодично в їх життєвому циклі відбувається статевий процес - кон'югація, а також автогамія.

Відомо, що при патологічних процесах, особливо за їх тривалого перебігу, в біологічних рідинах організму накопичується значна кількість продуктів метаболізму - молекули середньої маси: від 300-500 до 5000 Да, які є досить точним критерієм наявності та виразності синдрому метаболічної інтоксикації [Громашевская, 1997]. Дослідженнями О.П. Долайчука та ін. [2013] встановлено, що за умови введення до раціону щурів ГМ сої спостерігалось підвищення концентрації молекул середньої маси в крові щурів, зокрема, $1,55 \pm 0,06$ г/л проти $1,48 \pm 0,05$ г/л у контрольній групі, але ця різниця була не вірогідна. Поряд із цим ГМ соя стійка до гербіциду - гліфосату, що означає, що в цій рослині й бобах міститься новий білок, який не властивий не ГМ сої. Цей білок виконує основну функцію стійкості рослини до гліфосату, але при надходженні в шлунково-кишковий тракт тварин і людей його функції невідомі.

Трансгенні білки, що забезпечують стійкість рослин-реципієнтів до враження різними видами комах, грибовими і бактеріальними агентами, можуть здійснювати токсичну або алергенну дію. До цієї групи належать білки, вражаючими факторами яких є: ферментативна активність до компонентів клітинної стінки цільових

організмів, що викликають руйнування клітин і загибель цільових організмів; активність лектинів (лектини й арселіни), що призводить до зв'язування білка з певними рецепторами і мембранними глікопротеїнами, а також до злипання клітин шлунково-кишкового тракту і порушення активності ферментів комах-шкідників; інгібування функціонування рибосомальних білків (RIPs-білки), що призводить до порушення синтезу нових клітинних поліпептидів; інгібування функцій травних ферментів протеаз і амілаз цільових організмів; формування наскрізних каналів у клітинній мембрані і лізис атакованих цими поліпептидами клітин; проникнення фрагментів вихідного білка крізь стінки кишечника і зв'язування з гангліозидами клітинних мембран (рослинні протоксини: уреазі і канатоксини), що призводить до екзоцитозу клітин різних типів, руйнування кров'яних тілець і в результаті до загибелі цільового організму [Кузнецов и др., 2010]. Трансгенні білки збільшують ризик виникнення небезпечних алергічних реакцій, харчових отруєнь і мутацій, можливий розвиток несприйнятливості до антибіотиків. ГМО можуть призвести до безплідності, онкологічних захворювань, високого рівня смертності й захворювань дітей, спричинити пригнічення імунітету. Існують думки, що генетично модифіковані організми можуть викликати мутації в організмі людини і цей процес може стати неконтрольованим. У результаті генетичних маніпуляцій людина не просто хворітиме, а мутації організму можуть знищити людину як вид [Шевелева и др., 2008; Левченко та ін., 2010].

Сучасні методи аналітичного контролю продуктів харчування з ГМ рослин і конкретно раундапостійкої сої констатують наявність активного фактору в продук-

тах, і цим насторожують щодо безпечності їх опосередкованого впливу на людей при використанні трансгенних кормів, зокрема, ГМ сої в годівлі тварин [Чернышева, Сорокина, 2013].

Відомо, що в сої містяться ізофлавоноїди. Виходячи з цієї позиції соя корисна для людського організму. Ізофлавоноїди - це рослинні аналоги жіночих статевих гормонів і вони сприятливо впливають на стан здоров'я людей, особливо в боротьбі з онкологічними захворюваннями. Але якщо говорити про трансгенну сою, дослідження німецьких вчених показали, що вміст цих фітоестрогенів у модифікованій сої дуже високий. Якщо споживання звичайної сої може запобігти онкологічним захворюванням, то трансгенний аналог, навпаки, може спровокувати подібні захворювання, а саме передчасне старіння клітин головного мозку і ракові захворювання статевих органів [Носенко, 2008].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Водний екстракт внутрішніх органів щурів, яким тривало згодовували ГМ сою, містить біологічно активні сполуки, які активізують розмноження інфузорій і підвищують їх життєздатність. Існує вірогідність, що в організмі людини ці сполуки можуть стимулювати певні види клітин до неконтрольованого розмноження, тому вплив ГМ сої в продуктах харчування на людину потребує подальшого вивчення.

Перспективою подальших досліджень є виявлення генетичних вставок ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens* у продукції сільськогосподарських тварин, при згодовуванні їм трансгенної сої.

Список літератури

- Беляев Е. Н. Гигиеническая характеристика продуктов питания, содержащих генетически модифицированные компоненты / Е. Н. Беляев, А. А. Иванов, М. В. Фокин // Гигиена и санитария: научно-практический журнал. - 2006. - № 4. - С. 7-11.
- Вплив генетично модифікованих продуктів на стан здоров'я людини / Л. А. Левченко, Т. Л. Заведя, К. А. Левченко [та ін.] // Здоров'я дитини: наук.-практ. журнал. - 2010. - № 2 (23). - С. 93-96.
- Генетически-модифицированные источники пищи: оценка безопасности и контроль: монография; под ред. В. А. Тутельяна. - М., 2007. - 548 с.
- Громашевская Л. Л. Средние молекулы как один из показателей метаболической интоксикации в организме / Л. Л. Громашевская // Лаб. диагностика. - 1997. - № 1. - С. 11-16.
- Долайчук О. П. Вплив компонентів натуральної та генетично модифікованої сої на показники імунної і репродуктивної систем у самиць щурів / О. П. Долайчук, Р. С. Федорук, І. І. Ковальчук // Фізіологічний журнал: науково-теоретичний журнал. - 2013. - № 2 (59). - С. 65-70.
- ДСТУ 3570-97 "Зерно фуражне, продукти його переробки, комбікорми. Методи визначення токсичності". - Режим доступу: <http://lindex.net.ua/ua/shop/bibl/500/doc/2183>
- Ермакова И. В. Влияние сои с геном EPSPS CP4 на физиологическое состояние и репродуктивные функции крыс в первых двух поколениях / И. В. Ермакова // Современные проблемы науки и образования. - 2009. - № 5. - С. 15-21.
- Ермакова И. В. Генетически модифицированная соя приводит к снижению веса и увеличению смертности крысят первого поколения. Предварительные исследования / И. В. Ермакова // ЭкоСинформ, 2006. - № 1. - С. 4-10.
- Ермакова И. В. Изучение физиологических и морфологических параметров у крыс и их потомства при использовании диеты содержащей сою с трансгеном EPSPS CP4 / И. В. Ермакова, И. В. Барсков // Современные проблемы науки и образования. Биологические науки. - 2008. - № 6. - С. 19-20.
- Кузнецов В. В. Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры и полученные из них продукты: пищевые, экологические и агротехнические риски / В. В. Кузнецов, А. М. Куликов, В. Д. Цыдендамбаев // Известия аграрной науки. - 2010. - Т. 8, № 3. - С. 10-30.
- Малыгин А. Г. Влияние соевой диеты на репродуктивные функции мышей / А. Г. Малыгин // Современные проблемы науки и образования. Биологические науки. - 2008. - № 6. - С. 23.
- Малыгин А. Г. Соевая диета подавляет репродуктивные функции грызунов / А. Г. Малыгин, И. В. Ермакова // Современные проблемы науки и образования. Биологические науки. - 2008. - № 6. - С. 26.

- Носенко Ю. Трансгенная соя / Ю. Носенко // Зерно. - 2008. - № 7. - С. 41-47.
- Требования к медико-биологической оценке и гигиеническому контролю за оборотом пищевой продукции, полученной из генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов / С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина, Л. Н. Нестеренко [и др.] // Вопросы питания. - 2008. - Т. 77, № 3. - С. 49-57.
- Чернышева О. Н. Методы аналитического контроля пищевой продукции, произведенной из генно-инженерно-модифицированных растений / О. Н. Чернышева, Е. Ю. Сорокина // Вопросы питания. - 2013. - Т. 82, № 3. - С. 53-60.
- Cantani A. Genetically modified foods and children potential health risks / A. Cantani, M. Micera // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. - 2001. - Vol. 5, № 1. - P. 25-29.
- Detection of Genetically Modified Maize DNA Fragments in the Intestinal Contents of Pigs Fed StarLink CBH351 / E. Chowdhury, O. Mikami, Y. Nakajima [et al.] // Vet. Hum. Toxicol. - 2003. - Vol. 45, № 2. - P. 95-96.
- Fine structural analyses of pancreatic acinar cell nuclei from mice fed on GM soybean / M. Malatesta, M. Biggiogera, E. Manuali [et al.] // Eur. J. Histochem. - 2003. - Vol. 47. - P. 385-388.
- Gene transfer in the gastrointestinal tract / T. Netherwood, R. Bowden, P. Harrison [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. - 1999. - Vol. 65, № 11. - P. 5139-5141.
- Inverted Repeats as Genetic Elements for Promoting DNA Inverted Duplication: Implications in Gene Amplification / C. T. Lin, W. H. Lin, Y. L. Lyu, J. Whang-Peng // Nucl. Acids Res. - 2001. - Vol. 29, № 17. - P. 3529-3538.
- On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the foetus / R. Schubbert, U. Hohlweg, D. Renz, W. Doerfler // Molecules, Genes and Genetics. - 1998. - Vol. 259. - P. 569-76.
- Phipps R. H. Detection of Transgenic and Endogenous Plant DNA in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood, and feces of lactating dairy cows / R. H. Phipps, E. R. Deaville, B. C. Maddison // J. Dairy Sci. - 2003. - Vol. 86, № 12. - P. 4070-4078.
- Pusztai A. Report of project coordinator on data produced at the Rowett Research Institute / Pusztai A. // SOAEFD flexible Fund Project Ro 818. - 22 October 1998.
- Schubbert R. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice / R. Schubbert, C. Lettmann, W. Doerfler // Molecules, Genes and Genetics. - 1994. - Vol. 242. - P. 495-504.
- Ultrastructural analysis of testes from mice fed on genetically modified soybean / L. Vecchio, B. Cisterna, M. Malatesta [et al.] // Eur. J. Histochem. - 2003 - Vol. 48. - 449-453.
- Ultrastructural, morphometrical and immunocytochemical analysis of hepatocyte nuclei from mice fed on genetically modified soybean / M. Malatesta, C. Caporalony, S. Gavaudan [et al.] // Cell Struct. Funct. - 2002. - Vol. 27. - P. 173-180.

Кулик Я.М., Рауцкиене В.Т., Обертюх Ю.В., Химич О.В., Римша Е.В.

ВЫЯВЛЕНИЕ НЕИДЕНТИФИЦИРОВАННОГО ФАКТОРА ТРАНСГЕННОЙ СОИ ВО ВНУТРЕННИХ ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ЕЕ ДЛИТЕЛЬНОМ СКАРМЛИВАНИИ

Резюме. При длительном скармливании крысам генетически модифицированной сои впервые выявлено наличие в водном экстракте внутренних органов крыс (печень, почки, сердце и легкие) биологически активных соединений, которые стимулируют размножение и повышение жизнеспособности инфузорий тетрахимены пириформис.

Ключевые слова: трансгенная соя, крысы, экстракт внутренних органов, инфузории.

Kulyk Ya.M., Rautskiene V.T., Obertiukh Yu.V., Khimich O.V.

DETECTION OF UNIDENTIFIED FACTOR TRANSGENIC SOYBEANS IN THE INTERNAL ORGANS OF RATS FED WITH ITS LONG

Summary. The long-term feeding rats genetically modified soybeans for the first time revealed the presence of an aqueous extract of the internal organs of rats (liver, kidney, heart and lungs) biologically active compounds that stimulate reproduction and increase the viability of ciliates tetrahymena piriformis.

Keywords: transgenic soybeans, rats, extract of the internal organs, ciliates.

Рецензент - д.мед.н., проф. Луцук М.Б.

Стаття надійшла до друку 12.05.2015 р.

Кулик Ярослава Михайлівна - к.мед.н., доцент кафедри педіатрії Вінницького медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 43-77-85; kulikmf@mail.ru

Рауцкієне Варвара Тихонівна - к. мед. н., доцент кафедри патологічної анатомії, судової медицини та права Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 43-79-92

Обертюх Юрій Володимирович - к.с.г.н., ст. наук. співробітник, провідний науковий співробітник лабораторії технології заготівлі та використання кормів Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН; +38 0432 46-40-27; zoolab@ukr.net

Хімич Олександр Володимирович - к.с.г.н., завідувач лабораторії зоотехнічної оцінки кормів Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН; +38 0432 43-81-94; zoolab@ukr.net

Римша Олена Вікторівна - к.мед.н., асистент кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 35-15-58