

Т. В. Горбач, Г. И. Губина-Вакулик, С. А. Денисенко

*Харьковский национальный медицинский университет МЗ Украины,
61022 Харьков*

ВЛИЯНИЕ ГЕНОМОДИФИЦИРОВАННОЙ СОИ В РАЦИОНЕ ПИТАНИЯ БЕЛЫХ КРЫС НА МЕТАБОЛИЗМ И ГИСТОЛОГИЮ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК У РОДИТЕЛЕЙ И ПОТОМКОВ

Изучено влияние длительного использования в рационе экспериментальных животных генномодифицированной сои на метаболические показатели и морфофункциональное состояние печени и почек у крыс-матерей и их потомков. Результаты исследования свидетельствуют о появлении повреждений печени и почек с исходом в ускоренное старение этих органов и организма в целом.

Ключевые слова: генномодифицированная соя, крысы, печень, почки, метаболизм, гистология.

В настоящее время вопрос о безопасности генномодифицированных (ГМ) продуктов остается открытым и приобретает все большую актуальность. В научной литературе имеются данные как о безопасности употребления продуктов, содержащих ГМО (генномодифицированные организмы), так и о возможных негативных последствиях. Так, в работах китайских исследователей показано, что кормление лабораторных мышей ГМ-свиной, богатой на омега-3 полиненасыщенные кислоты, не оказало существенного влияния на биохимические показатели крови, распределение Т-клеток, иммуноглобулинов и количества бактерий в кишечнике и фекалиях [5]. Аналогичный вывод был сделан при постановке эксперимента на трех поколениях крыс *Sprague-Dawley*, которые получали корм, на 70 % состоящий из рисовой муки, полученной из трансгенной линии риса, обогащенной амилозой и резистентным крахмалом [6]. При этом, по словам авторов, наблюдались некоторые статистически значимые различия по сравнению с крысами, получавшими изогенную рисовую диету или обычную стандартную диету, но авторы посчитали эти различия случайными.

В других исследованиях показано, что при длительном употреблении ГМ-кукурузы у крыс изменяется гормональный фон, в 2 раза чаще разви-

вается рак, тяжелые нефропатии [5]. Учитывая наблюдаемое расширение списка ГМО, активное продвижение ГМ-продуктов на полки магазинов, необходимо продолжить экспериментальные исследования последствий использования ГМ-продуктов в рационе питания современного человека, исходя из гипотетической вероятности развития ускоренного старения.

Цель работы — оценить влияние генномодифицированной сои в рационе питания экспериментальных животных (родителей и потомков) на метаболические процессы и гистологическую картину печени и почек, трактуя результаты с точки зрения геронтологии.

Материал и методы. Эксперимент проведен на половозрелых крысах-самках в возрасте 3 мес, распределенных на 3 группы (по 6 особей в каждой). 1 — интактные находились на стандартном рационе вивария (группа Инт), 2 — группа Эксп. Соя, рацион которых содержал немодифицированную сою сорта "Рядова" в количестве, покрывающем 50 % потребности в белках; 3 — группа ГМ-соя, в рацион которых в аналогичном соотношении входила генномодифицированная соя (сорт "Roundup Ready" линии 40-3-2, которая содержала трансгены *cp4epsps* и регуляторные элементы — промотер *E35S* и терминатор *NOS*).

Через 2 мес после начала эксперимента к самкам подсадили самцов, получили потомство. После перехода на самостоятельное питание крысята имели такой же рацион, как и их матери. То есть были сформированы такие же группы животных-потомков: гр. Инт — 20 крысят, Эксп.Соя — 19 крысят, группа ГМ-соя — 25 крысят.

Крысы-самки употребляли специфический пищевой рацион в течение 6 мес и были выведены из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом в возрасте 9 мес. Животных-потомков выводили из эксперимента путем декапитации в возрасте 3 мес, то есть у этих животных внутриутробное развитие и период материнского вскармливания протекали на фоне употребления крысой-матерью специфического рациона, затем в течение двух мес для самостоятельного питания использовали тот же специфический рацион.

Постановка эксперимента проведена согласно требованиям, предъявляемым к экспериментам на животных (Страсбург, 1985, Украина, 2001).

Для биохимических исследований использовали сыворотку крови и гомогенат тканей. В сыворотке крови определяли активность сорбитолдегидрогеназы спектрофотометрическим методом [2] и активность трансаминазы спектрофотометрически по цветной реакции Саккагуй [1]. Разделение белков и определение молекулярной массы проводили методом электрофореза [3]. Содержание АТФ и гликогена в гомогенатах ткани определяли спектрофотометрическими методами [3]. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования, активность НАД-изоцитратдегидрогеназы митохондрий определяли спектрофотометрическим методом [3]. Активность аминотрансфераз, щелочной фосфатазы (ЩФ), содержание общего белка, липидов в гомогенатах печени и почек определяли с помощью наборов реагентов фирмы "Филисит Диагностика" (Днепропетровск, Украина). Альдо-

лазную активность определяли с помощью наборов реактивов фирмы "Ольвекс" (РФ).

Для морфологического исследования печень и почки обрабатывали по обычной методике: фиксация в 10 % растворе формалина, спиртовая проводка, заливка в парафин и изготовление срезов. Использовали окраски срезов гематоксилином-эозином и галлоцианином по Эйнарсону (суммарные нуклеиновые кислоты). Полученные гистологические препараты изучали с помощью микроскопа "Axiostar-plus" (Zeiss, Германия) с последующей морфометрией на компьютерных изображениях микропрепаратов по программе "ВидеТест" (С-Пб., РФ).

Статистический анализ проведен методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Изучение биохимических показателей в сравниваемых группах позволило выявить следующие закономерности. Так, использование в рационе питания экспериментальных животных немодифицированной сои не привело к изменению значений изучаемых показателей метаболизма в печени и почках (табл. 1, 2).

Таблица 1
Биохимические показатели в гомогенатах печени 9-месячных крыс-самок в условиях разных рационов питания, $M \pm m$

Группа	Общий белок, мг/г ткани	Общие липиды, мг/г ткани	Гликоген, мг/г ткани	АсАТ, ммоль/ (мин·г белка)	АлАТ, ммоль/ (мин·г белка)	ЩФ, ммоль/ (с·г белка)
Инт.	237,65 ± 19,08	65,66 ± 5,42	82,12 ± 4,41	12,24 ± 1,05	45,23 ± 2,13	1,38 ± 0,09
Эксп. Соя	215,23 ± 16,73	61,05 ± 3,47	86,49 ± 5,79	11,48 ± 1,06	43,72 ± 3,11	1,29 ± 0,07
ГМ-соя	187,39 ± 15,16*	78,39 ± 4,68**	74,68 ± 5,45	15,59 ± 1,34**	51,25 ± 2,64**	2,43 ± 0,16**

Примечания (здесь и в табл. 2–4): * — $P < 0,05$ по сравнению с группой Инт., # — $P < 0,05$ по сравнению с группой Эксп. Соя.

Таблица 2
Биохимические показатели в гомогенатах почек 9-месячных крыс-самок в условиях разных рационов питания, $M \pm m$

Группа	Общий белок, мг/г ткани	АсАТ, ммоль/ (мин·г белка)	АлАТ, ммоль/ (мин·г белка)	Изоцитрат-дегидрогеназа, мкмоль/ (мин·г белка)	Альдолаза, мкмоль/ (мин·г белка)	АТФ, мкмоль/ г ткани
Инт.	153,28 ± 11,22	2,32 ± 0,16	3,09 ± 0,27	34,68 ± 2,27	4,28 ± 0,41	1,43 ± 0,17
Эксп. Соя	140,0 ± 10,25	2,09 ± 0,13	2,92 ± 0,14	35,48 ± 2,66	3,97 ± 0,24	1,34 ± 0,22
ГМ-соя	132,11 ± 8,43*	3,04 ± 0,29**	3,37 ± 0,21	30,25 ± 2,37	6,33 ± 0,42**	0,82 ± 0,04*

У 9-месячных самок группы ГМ-соя в гомогенатах печени отмечается тенденция снижения содержания гликогена, достоверное снижение содержания общего белка, достоверное увеличение содержания общих липидов, а также активности аминотрансфераз и ЩФ (см. табл. 1). Активация аминотрансфераз свидетельствует о повышенном катаболизме белков, что вероятно, является причиной снижения содержания белка в гомогенатах печени.

О нарушении морфофункционального состояния печени свидетельствует также достоверное увеличение активности сорбитолдегидрогеназы в крови, которая является органоспецифическим ферментом печеночной ткани, попадающим в кровь при разрушении гепатоцитов: группа Инт — $(1,34 \pm 0,07)$ нмоль/(с·л), группа Эксп. Соя — $(1,49 \pm 0,11)$ нмоль/(с·л), ($P > 0,05$); группа ГМ-соя — $(3,28 \pm 0,16)$ нмоль/(с·л) ($P < 0,05$).

Изучение фракционного состава белков сыворотки крови путем разделения белков по молекулярным массам в SDS-ПААГЕ в системе Лемли показало достоверное (в 20 раз) увеличение содержания низкомолекулярных белков (с молекулярной массой 15709 Да и 11064 Да) у 9-месячных животных группы ГМ-соя, что также подтверждает высокий уровень катаболизма белков.

При исследовании почечной ткани выявлено, что в митохондриях клеток у 9-месячных самок группа ГМ-соя установлено снижение активности изоцитратдегидрогеназы при увеличении активности альдолазы (см. табл. 2), что может свидетельствовать о снижении аэробных процессов окисления и увеличении роли гликолиза в энергообеспечении ткани. Такие изменения могут быть связаны с дисфункцией митохондрий. Концентрация АТФ в гомогенатах ткани почек снижена, что, по-видимому, связано с нарушением синтеза АТФ в митохондриях.

В гомогенатах почек также повышена активность АсАТ (достоверно) и АлАТ (недостоверно), снижено содержание белка, что свидетельствует о повышенном катаболизме белков. Подтверждением активации деструктивных процессов в почечной ткани является увеличение активности трансаминазы в сыворотке крови; поскольку этот фермент является органоспецифичным для почечной ткани, появление его в крови свидетельствует о разрушении нефроцитов. Активность трансаминазы в сыворотке крови в группе Инт. — 0 в Эксп. Соя — $(1,64 \pm 0,12)$ ммоль/(с·л), в группе ГМ-соя — $(18,64 \pm 1,22)$ ммоль/(с·л).

Данные биохимических исследований о процессах разрушения в паренхиме почек и печени при наличии в рационе животных ГМ сои подтверждены морфологически.

У крыс-матерей группы ГМ-соя, в отличие от Эксп. Соя и группы Инт. в печени обнаружено формирование объемного макрофагально-лимфоцитарного инфильтрата вокруг триад и склероза этих участков. В средней части трабекул появляются небольшие очаги цитолиза, включающие в себя 1-2-3 гепатоцита; однако миграция лейкоцитов к таким очажкам отсутствует, поэтому мы полагаем, что их появление — это результат форсированного апоптоза. Цитоплазма гепатоцитов вакуолизована, содержание РНК снижено, т. к. оптическая плотность цитоплазмы при окраске галлоцианинхромовыми квасцами по Эйнарсону достоверно меньше, чем в группе Инт. То есть гистологическая картина печени соответствует хроническому персистирующему гепатиту.

В почках животных группы ГМ-соя, в отличие от крыс других групп, резко увеличено количество редуцированных и склерозированных клубочков, а остальные клубочки компенсаторно гипертрофированы с макрофагально-лимфоцитарной инфильтрацией расширенного

мезангиума. Юкстагломерулярный аппарат почек гиперплазирован, эпителий канальцев дистрофизирован, частично дескамирован, в цитоплазме нефроцитов уменьшено содержание РНК, т. к. оптическая плотность цитоплазмы нефроцитов при окраске галлоцианинхромовыми квасцами по Эйнарсону достоверно меньше, чем в группе Инт. Строма почек существенно склерозирована с небольшой макрофагально-лимфоцитарной инфильтрацией. То есть и в почках наблюдается гистологическая картина ускоренного разрушения паренхимы и развития склероза, соответствующая хроническому мезангиально-пролиферативному гломерулонефриту и тубуло-интерстициального нефриту.

Биохимические изменения, выявленные в тканях печени, почек и в сыворотке крови у крыс-самок, употреблявших ГМ-сою в течение 6 месяцев, обнаруживаются и у потомков. Причем у потомков эти изменения развились уже в возрасте 3 месяцев (табл. 3, 4), то есть гораздо раньше, чем у крыс-матерей.

Таблица 3

Биохимические показатели в гомогенатах печени 3-месячных крыс-потомков в условиях разных рационов питания, $M \pm m$

Группа	Белок, мг/г ткани	Липиды, мг/г ткани	АсАТ, ммоль/ (мин·г белка)	АлАТ, ммоль/ (мин·г белка)	ЩФ, ммоль/ (с·г белка)
Инт.	211,44 ± 18,31	72,43 ± 5,17	15,48 ± 1,22	53,18 ± 3,14	1,79 ± 0,16
Эксп. Соя	198,33 ± 16,05	68,34 ± 6,0	17,06 ± 1,43	55,24 ± 4,08	1,66 ± 0,14
Группа ГМ-соя	170,22 ± 15,0*	84,11 ± 6,07**	22,16 ± 1,72**	68,45 ± 4,22**	1,83 ± 0,17

Таблица 4

Биохимические показатели в гомогенатах почек 3-месячных крыс-потомков в условиях разных рационов питания, $M \pm m$

Группа	Белок, мг/г ткани	АсАТ, ммоль/ (мин·г белка)	АлАТ, ммоль/ (мин·г белка)	АТФ, мкмоль/г ткани
Инт.	145,23 ± 10,21	2,75 ± 0,22	6,41 ± 0,47	1,32 ± 0,11
Эксп. Соя	139,55 ± 12,11	3,02 ± 0,29	5,97 ± 0,52	1,24 ± 0,12
Группа ГМ-соя	120,06 ± 14,38	2,51 ± 0,14	8,0 ± 0,44**	0,79 ± 0,05**

В гомогенатах печени у них обнаружено снижение содержания белка, повышение содержания липидов, повышение активности АлАТ и АсАТ. В гомогенатах почек животных-потомков также выявлено сниженное содержание белка, повышение активности АлАТ, уменьшение содержания АТФ. При морфологическом исследовании печени и почек потомков оказалось, что в Эксп. Соя гистологическая картина не отличается от группы Инт.

В группе ГМ-соя трабекулярность печеночной ткани сохранена. Заметное количество гепатоцитов имеют темные, гиперхромные ядра — карнопикнотические. Отмечается большое количество двуядерных и полиплоидных гепатоцитов, что имеет компенсаторное значение. Обнаружены многочисленные локусы цитолиза, что привело к формированию внутريدольковых маленьких очагов воспаления. В эндотелиальной выстилке

синусоид отмечается увеличение количества эндотелиоцитов и клеток Купфера. Склероз имеет не только перипортальный характер, но и формируется и вокруг центральных вен долек, а также во II зоне ацинусов. В целом морфологическая картина печени крыс-потомков группы ГМ-соя может быть оценена как хронический активный гепатит.

В почках у животных-потомков группы ГМ-соя обнаружены признаки внутриутробной гиперплазии клубочков и приобретенного хронического мезангиального гломерулонефрита во всех функционирующих клубочках. Существенная часть клубочков редуцированы, склерозированы, а юстагломерулярный аппарат в клубочках на границе с мозговым веществом гиперплазирован, как и у крыс-матерей. Канальцевый эпителий значительно поврежден. Строма склерозирована и инфильтрирована макрофагами, лимфоцитами, много активных фибробластов, что позволяет диагностировать и интерстициальный нефрит.

Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют о значительном влиянии ГМ сои на метаболические показатели у крыс (родителей и потомков) при длительном кормлении этим продуктом. Повышение катаболизма белков в тканях печени и почек, сопровождающееся низкоэнергетическими сдвигами в адениловой системе, свидетельствует об ускоренном старении организма.

Полностью совпадает с этим выводом результат морфологического исследования печени и почек. В обоих органах наблюдается повреждение паренхимы, хронический воспалительный процесс и склероз, что также можно расценить как путь ускоренного старения.

Возможно, обнаруженные нами изменения в морфофункциональном состоянии печени и почек связаны с длительным поступлением в организм гербицида раундапа, в небольших количествах содержащегося в сое. Фирмы-экспортеры ГМ-соеи утверждают, что в продукте отсутствуют гербициды. При очень небольшом содержании гербицида в сое при кратковременном кормлении у животных не выявляются метаболические нарушения. Однако длительное применение продукта привело к кумулятивному эффекту и проявлению метаболических нарушений.

Можно предположить и другой механизм патогенеза повреждения почек и печени — наличие в ГМ-сое, в отличие от немодифицированной сои, новых белков, плохо подвергающихся гидролизу в ЖКТ. В этом случае активируются процессы гниения в кишечнике, что приводит к увеличению концентрации токсинов эндогенного происхождения. О наличии хронической интоксикации свидетельствует активация катаболизма белков и повышение содержания средне- и низкомолекулярных белков в сыворотке крови.

Список использованной литературы

1. *Визначення активності трансамідаз в сироватці крові уніфікованим методом // Клінічна біохімія / за ред. проф. О. П. Тимошенко. — К.: Професіонал, 2005. — С. 261–263.*
2. *Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. проф. В. В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.*

3. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) /* Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 256 с.
4. *Seralini G. E., Claire E., Mesnag R. et al. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize // Food Chem Toxicol.* — 2012. — **50**, Issue 11. — P. 4221–4231.
5. *Tang M., Qian L., Jiang S. et al. Functional and safety evaluation of transgenic pork rich in omega-3 fatty acids // Transgenic Res.*— 2014. — **23**, № 4. — P. 557–571.
6. *Zhou X. H., Dong Y., Zhao Y. S. et al. A three generation reproduction study with Sprague-Dawley rats consuming high-amylose transgenic rice // Food Chem Toxicol.* — 2014. — **74**. — P. 20–27.

Поступила 15.02.2016

ВПЛИВ ГЕННОМОДИФІКОВАНОЇ СОЇ У РАЦІОНІ ХАРЧУВАННЯ БІЛИХ ЩУРІВ НА МЕТАБОЛІЗМ ТА ГІСТОЛОГІЮ ПЕЧІНКИ І НИРОК У БАТЬКІВ І НАЩАДКІВ

Т. В. Горбач, Г. І. Губіна-Вакулік, С. А. Денисенко

Харківський національний медичний університет
МОЗ України, 61022 Харків

Вивчено вплив тривалого використання в раціоні експериментальних тварин генномодифікованої сої на метаболічні показники та морфологічний стан печінки і нирок у щурів-матерів та їх нащадків. Результати дослідження свідчать про появу пошкоджень печінки і нирок з виходом в прискорене старіння цих органів і організму в цілому.

INFLUENCE OF GENETICALLY MODIFIED SOY IN EXPERIMENTAL ANIMALS DIET ON THE METABOLISM AND HISTOLOGY OF LIVER AND KIDNEYS

T. V. Gorbach, G. I. Gybina-Vakulyck, S. A. Denisenko

Kharkov National Medical University Ministry of Health Ukraine,
61022 Kharkov

Effects of the long-term use of the genetically modified soybeans in the experimental rats (mothers and their descendants) on the metabolic parameters and morpho-functional state of the liver and kidneys have been studied. The findings revealed the appearance of damages in the liver and kidneys followed by an accelerated aging of these organs and organism as a whole.

Сведения об авторах

Г. И. Губина-Вакулік — профессор кафедры патологической анатомии, д.м.н.

Кафедра биологической химии

Т. В. Горбач — доцент кафедры, к.б.н.

С. А. Денисенко — доцент кафедры, к.б.н. (SV.A.Deni@rambler.ru)