

УДК: 612.82; 57.02

ВЛИЯНИЕ СОИ С ГЕНОМ EPSPS CP4 НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ И РЕПРОДУКТИВНЫЕ ФУНКЦИИ КРЫС В ПЕРВЫХ ДВУХ ПОКОЛЕНИЯХ

Ермакова И.В.

*Учреждение Российской Академии Наук Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Россия*

Изучалось влияние диеты, содержащей генетически модифицированную (ГМ) сою с геном EPSPS CP4 (RR, линия 40.3.2), на физиологическое состояние и репродуктивные функции крыс линии Вистар. Самкам крыс к стандартному виварному корму добавляли либо ГМ-сою, либо изолят белка ГМ сои, либо традиционную сою Arcon SJ 91-330, либо ничего не добавляли (группа «Контроль»). При введении в диету самок ГМ-сои был выявлен высокий уровень смертности крысят в первом поколении, недоразвитость части из них и отсутствие второго поколения по сравнению с другими группами. Таким образом, диета с ГМ соей (линия 40.3.2) может оказывать негативное влияние на крыс и их потомство.

Ключевые слова: трансген, модификация, ГМО, потомство, диета.

Введение.

В последние годы большой интерес вызывают генетически модифицированные организмы (ГМО), получение которых связано со «встраиванием» чужого гена в ДНК других растений или животных с целью изменения свойств или параметров последних [1]. Для встраивания гена используют вирусы, транспозоны или плазмиды (кольцевые ДНК), способные проникнуть в клетку организма и использовать клеточные ресурсы для создания множества собственных копий или внедриться в клеточный геном (как и «выпрыгнуть» из него) [14]. Однако до сих пор неясно, как вновь созданные ГМ-организмы взаимодействуют с другими организмами, влияют на них и их потомство.

Все больше поступает данных о том, что ГМО приводят к нарушению репродуктивных функций и патологическим изменениям во внутренних органах как у насекомых [2, 4], так и у млекопитающих [3,5, 8, 9,10,11].

В приведенных выше работах указывалось на серьезные изменения во внутренних органах животных, независимо от того, какой сорт или линия ГМ-культуры использовались. Предполагается, что одной из причин опасности ГМО может быть несовершенство самого процесса внедрения гена в геном другого организма [1,12]. Плазмиды и ГМ-вставки были обнаружены в крови и клетках разных органов животных и человека, использующих в пищу ГМО [6, 8, 9].

В литературе практически отсутствуют данные о влиянии разных линий ГМО на потомство млекопитающих. Целью настоящей работы было исследование воздействия ГМ-сои (RR, линия 40.3.2), устойчивой к гербициду раундапу, на физиологическое состояние и выживаемость крысят первого и второго поколений.

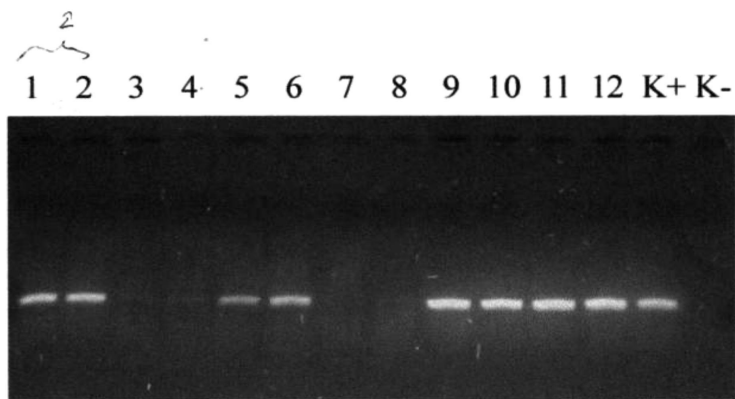
Методика.

В экспериментах участвовали 4 группы крыс Вистар, весом 200-220гг. Самок крыс первой группы («Контроль») кормили стандартным виварным кормом без ка-

ких-либо добавок. Самки трех других групп получали к корму добавку в виде соевой пасты, полученной в результате разведения соевой муки водой (20г*40 мл воды). Так, самкам второй группы к стандартному виварному корму добавляли пасту, приготовленную из муки ГМ сои, устойчивой к гербициду раундапу (трансген EPSPS CP4, Roundup Ready - RR, линия 40.3.2, содержание белков ~ 35%). Самкам третьей группы к корму добавляли пасту из муки Изолята белка ГМ-сои (RR, линия 40.3.2, содержание белков ~ 90%), а четвертой – из муки традиционного сорта сои Argon SJ 91-330 (содержание белков ~35%). Муку ГМ сои и

Трад. сои получали путем помола соевых семян в соответствующих компаниях. В составе стандартного виварного корма не было сои или соевого шрота. Перед началом экспериментов образцы соевой муки были проверены на наличие трансгенов в специальной лаборатории. Проверка осуществлялась слепым методом (рис. 1). Таким образом, в экспериментах участвовало четыре группы крыс: 1-я группа – «Контроль», 2-я группа - «ГМ-соя»; 3-я группа – «Изолят белка ГМ-сои», 4-я группа – «Трад. соя». Животные находились в одном помещении и в одинаковых условиях.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 К ПРОТОКОЛУ №1(ИВНД) обязательное



Электрофореграммы продуктов ПЦР с ДНК из образцов биологического материала и праймерами для амплификации фрагмента генетически модифицированной ДНК сои (фрагмент гена-вставки EPSPS CP4):

треки 1, 2 – образец №2 (регистрационный номер 1332);
 треки 3, 4 – образец №3 (регистрационный номер 1333);
 треки 5, 6 – образец №4 (регистрационный номер 1334);
 треки 7, 8 – образец №5 (регистрационный номер 1335);
 треки 9, 10 – образец №6 (регистрационный номер 1336);
 треки 11, 12 – образец №7 (регистрационный номер 1337);
 К+ - положительный контроль, К- - отрицательный контроль.

Рис.1. Электрофореграммы продуктов ПЦР с ДНК из биологических образцов.

Образец №2 (треки 1,2) - ГМ-соя (мука)
 Образец №3 (треки 3,4) - Трад. Соя (мука)
 Образец №4 (треки 5,6) - Изолят белка ГМ-сои (мука)
 Образец №5 (треки 7,8) - Трад Соя (семена)
 Образец №6 (треки 9,10) - ГМ-соя (семена), t⁰
 Образец №7 (треки 11,12) -ГМ-соя (семена)

Сою добавляли к виварному корму самкам крыс Вистар за две недели до спаривания, во время спаривания, беременности и выкармливания крысят. Процедура эксперимента была следующей. В каждой клетке находилось по три самки, которым к стандартному виварному корму добавляли соевую пасту: на каждую крысу по 6-7 г соевой муки. Соевую пасту ставили в отдельной плошке внутрь клетки. Через две недели после начала кормления в клетку самок подсаживали по очереди двух самцов (по три дня каждый). Перед рождением крысят каждую самку отсаживали в отдельную клетку. После рождения крысят количество с ои увеличивали до 1г на одного родившегося крысенка, а после того, как крысята подрастали и начинали есть сами, увеличивали до 2-3г. Подсчитывали количество родивших самок, число рожденных и умерших крысят. У крысят, родившихся, приблизительно, в одно и то же время ($\pm 1-2$ дня), определяли мас-

су тела (~80% крысят от общего количества). Всего было исследовано 30 самок и 221 крысенок.

Статистический анализ.

Для статистического анализа уровня смертности использовали One-Way ANOVA с применением Newman-Keuls теста для долевого участия; для анализа веса использовали Mann-Whitney, для распределения веса у крысят - Chi-square в программе StatSoft Statistica v6.0 Multilingua (Россия).

Результаты.

Анализ данных показал, что после добавления к общевиварному корму самок за две недели до спаривания, во время спаривания, беременности и лактации генетически модифицированной сои в группах «ГМ-соя» была выявлена высокая смертность крысят (~ 51,6%), которая была статистически достоверно выше, чем смертность крысят в группах «Изолят белка ГМ сои» (15,1%), «Трад. соя» (10%) и «Контроль» (8,1%) (табл.1).

Таблица 1. Данные смертности крысят через три недели

Группы	Число родивших самок	Число родившихся крысят	Кол-во родившихся крысят на одну самку (целые числа)	Число умерших крысят	Число умерших крысят в %
Контроль	7/9	74	~11	6 p<0.001*	8.1% p<0.001*
ГМ-соя	6/9	64	~11	33	51.6%
Изолят белка ГМ-сои	4/6	33	~8	5 p<0.01*	15.1% p<0.01*
Трад соя	5/6	50	~10	5 p<0.001*	10% p<0.001*

*- по сравнению с группой «ГМ-соя»

Высокая смертность крысят наблюдалась у всех самок из группы «ГМ-соя» (табл.2). Уровень смертности крысят в группе «Изолят белка ГМ-сои» был ниже, чем в группе «ГМ соя», но выше, чем в группах «Трад. Соя» и

«Контроль» (табл.1). В последних двух случаях различие было статистически недостоверным.

ГМ соя не повлияла на рождаемость крысят: в среднем на одну самку было 10-11 крысят как и в группах «Контроль»

и «Трад. соя» (табл.1). В то же самое время рождаемость крысят в группе «Изолят белка ГМ-сои» была достоверно ниже, чем в других группах (в среднем на одну самку ~8 крысят).

Смертность крысят в группах «Контроль», «Трад. соя» и «Изолят белка ГМ-сои» наблюдалась в течение двух недель, а в группе «ГМ-соя» - в течение трех недель.

Таблица 2. Число умерших крысят в группе «ГМ-соя»

Самки	Число родившихся крысят	Кол-во умерших крысят	Кол-во умерших крысят %
1 самка	11	7	64%
2 самка	8	4	50%
3 самка	13	6	46%
4 самка	13	8	62%
5 самка	12	5	42%
6 самка	7	3	43%

Через две недели после рождения определяли вес большей части крысят (~80%), родившихся, примерно, в одно и то же время \pm 1-2 дня. Анализ показал пониженный вес у крысят из группы «ГМ-соя» по сравнению с весом крысят из групп «Трад. соя» и «Конт-роль» (табл.3), при этом более трети крысят из группы «ГМ-соя» имели очень низкий вес (менее 20г) по сравнению с группами «Контроль» и «Трад-соя», что свидетель-

ствовало об ослабленном состоянии большого количества крысят из группы «ГМ-соя» (табл.3, рис. 2). Были также обнаружены небольшие изменения по ряду изучаемых параметров и при добавлении традиционной сои (табл.3). Так, вес основной части крысят из группы «Трад. соя» был меньше, чем вес крысят из «Контроля», и, в основном, приходился на интервал от 20 - 30г (табл.3).

Таблица 3. Распределение веса крысят через две недели после рождения в разных группах

Группы	50-40г	40-30г	30-20г	20-10г
Контроль n=49	8.2%	38.8%	40.8%	12.2%
ГМ-соя n=27	0	26%	40.7%	33.3%
Изолят белка ГМ-сои n=28	0	21,4%	71,4%	7,2%
Трад-соя n=31	0	9.7%	77,4%	12,9%

*- по сравнению с группой ГМ-соя

При спаривании самок и самцов первого поколения (F1) из группы ГМ-соя не удалось получить потомство. При этом схема кормления была разной. В первой группе 12 самок F1 и 12 самцов F1 подкармливали ГМ соей до и во время спаривания. В другой группе 12 F1 самок и 12 самцов F1 прекратили кормить до спаривания. В обеих группах потомство F2 не получили. В третьей группе 12 самок F1 из группы «ГМ-соя» спаривали с 12 самцами из группы «Контроль», родители которых были без соевой диеты. До начала и во время спаривания животные получали обычный корм без сои. Потомство удалось получить у 75% крыс. При этом количество крысят у одной самки в среднем (~ 8) было меньше, чем в группе «Контроль» (~11 крысят).

Таким образом, были выявлены серьезные статистически достоверные изменения по развитию и выживаемости

крысят из группы «ГМ-соя» по сравнению с крысятами из групп «Трад соя», «Изолят белка ГМ-соя» и «Контроль».

Обсуждение.

Было выдвинуто несколько версий негативного влияния ГМ сои на потомство. Действие ГМ сои могло быть связано с неустойчивостью и нестабильностью генетической конструкции и проникновением чужеродных генов, в том числе и фрагментов плазмид, в клетки репродуктивных органов и в половые/стволовые клетки животных согласно многочисленным экспериментальным данным [6,8,9]. Нестабильность генетической вставки была показана для трансгенной сои [13]. Не исключено и мутагенное воздействие вновь созданных ГМ-организмов на животных, поглощающих их [1, 12]. Причиной негативного влияния могло быть накопление токсичного гербицида раундапа

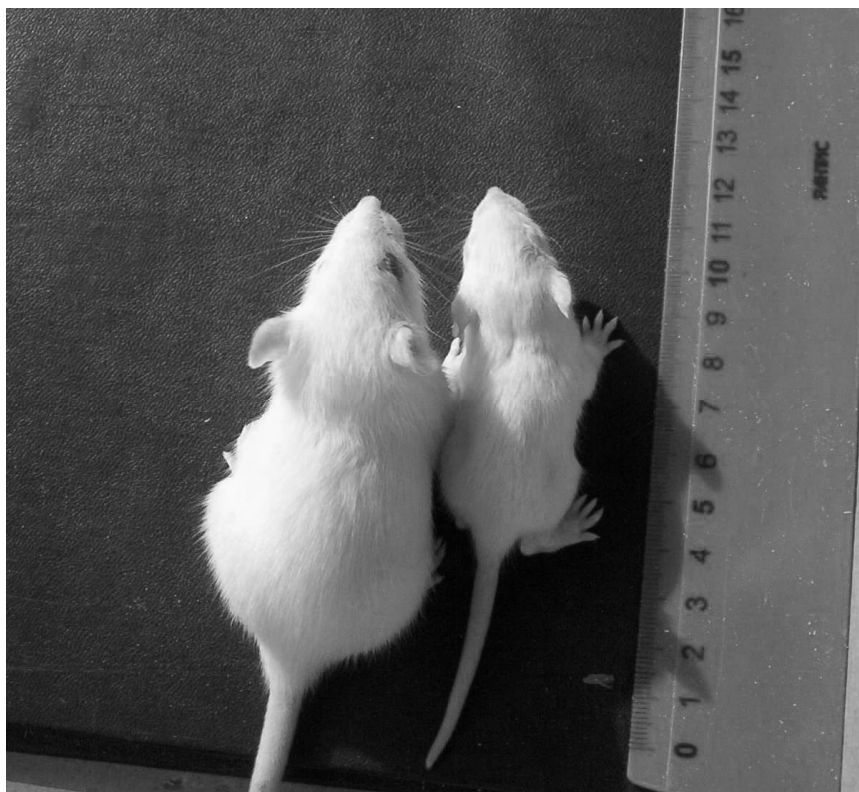


Рис. 2. Крысята одного возраста (19 дней) из двух разных групп: большой нормальный крысенок – из группы "Контроль", маленький недоразвитый крысенок - из группы "ГМ-соя".

в растениях, устойчивых к нему, и, таким образом, вместе с растением поглощалось и само токсическое вещество [7]. В связи с тем, что поскольку ни самки, ни подросшие крысята, которые начинали сами есть ГМ сою, не умирали, то предполагается, что наиболее вероятными являются первые три версии. Подтверждением этих версий является и отсутствие высокой смертности крысят, матерей которых подкармливали мукой изолята белка ГМ-сои, содержащей, в основном, белки. Полученные данные свидетельствуют о том, что включенная в корм соя, модифицированная геном EPSPS CP4, может представлять определенную опасность для живых организмов, приводя к повышенной смертности и недоразвитости части новорожденных крысят первого поколения и отсутствию второго поколения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Кузнецов В.В., Куликов А.М. // Российский химический журнал. 2005. 69 (4). С.70.
2. Birch A.N.E., Geoghegan I.E., Majerus M.E.N., Hackett C., Allen J.//Vet Hum Toxicol. 2003. 45(2). P.68.
3. Ewen S.W., Pusztai A.// Lancet. 354 (9187). 1999.
4. Losey J.E., Rayor L.S., Carter M.E.// Nature.1999. 399. P.214.
5. Malatesta M., Caporalony C., Gavaudan S., Rocchi M.B.L., Tiberi C., Gazzanelli G.// Cell Struct. Funct. 2002. 27. P.173.
6. Netherwood T., Bowden R., Harrison P., O'Donnell A.G., Parker D.S., Gilbert H.J.//Gene// Appl Environ Microbiol. 1999. 65(11). P. 5139.
7. Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N. and Seralini GE// Environ. Health Perspect. 2005. 113 (6). 716.
8. Schubbert R., Hohlweg U., Renz D. and Doerfler W.// Molecules, Genes and Genetics. 1998. 259. P.569.
9. Schubbert R., Lettmann C., Doerfler W.// Molecules, Genes and Genetics. 1994. 242. P.495.
10. Seralini G.E., Cellier D., Vendomois JS. //Arch. Environ. Contam. Toxicol, 2007. 52(4). P.596.
11. Vecchio L., Cisterna B., Malatesta M., Martin T.E., Biggiogera B.// Eur. J. Histochem. 2003. 48. P.449.
12. Wilson A., Latham J., Steinbrecher R.// Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 2006. 23. P.209.
13. Windels P., Taverniers I., Depicker A., Van Bockstaele E., De Loose M.// Eur. Food Res. Technol., 2001. 231. P.107.
14. World Scientists Statement. Supplementary Information of the Hazards of Genetic Engineering Biotechnology. Third World Network, 2000.

INFLUENCE OF SOY WITH THE GENE EPSPS CP4 ON PHYSIOLOGICAL STATE AND REPRODUCTIVE FUNCTIONS OF RATS IN TWO FIRST GENERATIONS

Ermakova I.V.

*Institution of Russian Academy of Sciences Institute of Higher Nervous Activity
And Neurophysiology RAS,
Russia*

Influence of the diet containing genetically modified (GM) soy with the gene EPSPS CP4 (RR, line 40.3.2) on a physiological state and reproductive functions of Wistar rats was studied. In different groups rat females as additionally to the chow received GM-soy, or protein isolate of GM soy, or traditional soy Arcon SJ 91-330, or added nothing (group "Control"). In the group GM-soy the high level of pup mortality in the first generation, underdevelopment of a part of them and absence of the second generation in comparison with the other groups has been revealed. The conclusion has been drawn that diet with the GM soy (line 40.3.2) can influence on rats and their posterity negatively.

Key words: transgene, modification, GMO, offspring, diet.