

УДК:619:579:559:324.4

УЛЬТРАСТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ТРЕТЬОГО ПОКОЛІННЯ ЗА ВПЛИВУ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНОЇ ТА ТРАДИЦІЙНОЇ СОЇ

I. М. Самсонюк, Г. І. Коцюмбас
inga.veklisch@gmail.com

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, Львів, 79010, Україна

У статті описано результати електронно-мікроскопічних досліджень печінки щурів III покоління, яким згодовували генетично модифіковану та традиційну сою. Об'єктом дослідження стали 42 щурі лінії Вістар масою 160–180 г, віком 3,5–4 місяці. Було сформовано 3 групи тварин, по 14 щурів у кожній (8 самок і 6 самців). I група — контрольна, тварини одержували стандартний корм віварію. II група — щурам згодовували корм з додаванням 20 % традиційної сої, сорту «Аннушка». III група — тварини отримували корм з додаванням 20 % генномодифікованої сої (сорт «Roundar Ready» лінії 40-3-2, яка містить трансгени *sr4epsps* та регуляторні елементи — промотор *E35S* і термінатор *NOS*). Отримали три покоління. У процесі експерименту з кожного покоління на 165 добу їхнього життя, по 5 щурів виводили з експерименту шляхом ефірного наркозу, проводили розтин та відбирали шматочки органів для гістологічного, гістохімічного дослідження.

Гістологічно у печінці щурів першого покоління, яким згодовували генетично модифіковану сою виявили дисконкомплексацию пластинчастої будови, а також зернисту дистрофію гепатоцитів. У другому і третьому поколіннях на фоні збереженої структури гепатоцитів відзначали розширення перисинусоїдальних просторів, кровонаповнення судин і розширення жовчних проток.

Для поглибленого дослідження структури печінки щурів третього покоління нами проводилось електронно-мікроскопічне дослідження. За ультраструктурного дослідження печінки щурів III покоління, яким згодовували генетично модифіковану сою, виявлено в цитоплазмі гепатоцитів помірне набубнявіння мітохондрій і зменшення в них кількості крист, значне зростання кількості пероксисом на тлі зниження вмісту хроматину в ядрах, а в перисинусоїдальному просвіті — виражене розширення жовчних капілярів. Всі ці субмікроскопічні зміни вказують на енергетичне навантаження та інтенсифікацію дезінтоксикаційних процесів цими клітинами.

Ключові слова: ЩУРИ, ГМО, ПЕЧІНКА, ГЕПАТОЦИТ, ЦИТОПЛАЗМА, МІТОХОНДРІЇ, ЯДРО, ПЕРОКСИСОМИ, ЖОВЧНІ КАПІЛЯРИ

ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTIC OF RATS LIVER OF THE THIRD GENERATION WITH THE INFLUENCE OF GENETICALLY MODIFIED AND TRADITIONAL SOYBEAN

I. M. Samsonuyk, G. I. Kotcumbas
inga.veklisch@gmail.com

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytskyj, Pekarska st., 50, Lviv, 79010, Ukraine

Summary the article discusses the results of electronic microscopic researches of the rats' liver of the third generation which were fed with the genetically modified and traditional soybean.

Object of the research were 42 rats of the Wistar line, weight of 160–180 g, age of 3.5–4 months. Three groups were formed, 14 rats in each group. The first group was the control, the second group— forage with the 20 % of traditional soya bean and the third group — forage with the 20 % of gm soybean. Three generation were obtained.

Histologically, the liver of rats of the first generations that were fed genetically modified soy found contravention lamellar structure and granular degeneration of hepatocytes. In the second and third generations against the backdrop of the stored patterns observed hepatocyte enlargement

perysinusoidal spaces, blood supply vessels and expansion of the bile ducts. For in-depth study conducted electron microscopic examination of the liver

Ultrastructurally were discovered in the rats liver, fed with gm soybean, the nucleus with the reduced content of chromatin, the rise of peroxisome medium swelling of mitochondrion and the lowering of cristae level and expressed broadening of bilious capillary among cells. All that submicroscopic changes point on the energetic load and activation of disintoxicant processes of these cells that probably are caused by continuous toxic influence of certain elements that were received with the forage.

Keywords: RATS, GMO, LIVER, HEPATOCYT, CYTOPLASM, MITOCHONDRIA, NUCLEUS, PEROXISOMES, BILE CAPILLARIES

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ КРЫС ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГМО И ТРАДИЦИОННОЙ СОИ

И. М. Самсонюк, Г. И. Коцюмбас
inga.veklich@gmail.com

Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий им. С. З. Гжицкого, ул. Пекарская, 50, Львов, 79010, Украина

*В статье описаны результаты электронно-микроскопических исследований печени крыс III поколения, которым скармливали генетически модифицированную и традиционную сою. Объектом исследования стали 42 крысы линии Вистар весом 160–180 г, в возрасте 3,5–4 месяца. Было сформировано 3 группы животных, по 14 крыс в каждой (8 самок и 6 самцов). I группа — контрольная, животные получали стандартный корм вивария, II группа — крысам скармливали корм с добавлением 20 % традиционной сои, сорта «Аннушка». III — животные, получавшие корм с добавлением 20 % генномодифицированной сои (сорт «Roundar Ready» линии 40-3-2, содержащую трансгены *sr4epsps* и регуляторные элементы: промотор *E35S* и терминатор *NOS*). Получены три поколения. В процессе эксперимента с каждого поколения на 165 сутки их жизни, по 5 крыс выводили из эксперимента путем эфирного наркоза, проводили вскрытие и отбирали кусочки органов для гистологического, гистохимического исследования.*

Гистологически в печени крыс первого поколения, которым скармливали генетически модифицированную сою обнаружили дисконформацию пластинчатого строения, а также зернистую дистрофию гепатоцитов. Во втором и третьем поколениях на фоне сохраненной структуры гепатоцитов отмечали расширение перисинусоидальных пространств, кровенаполнения сосудов и расширение желчных протоков.

Для углубленного исследования провели электронно-микроскопическое исследование печени третьего поколения. При ультраструктурном исследовании в печени крыс III поколения, которым скармливали генетически модифицированную сою, ультраструктурно обнаружено в цитоплазме гепатоцитов, умеренное набухание митохондрий и уменьшение в них количества крист, значительный рост количества пероксисом на фоне снижения содержания хроматина в ядрах, а в перисинусоидальных пространствах, выраженное расширение желчных капилляров. Все эти субмикроскопические изменения указывают на энергетическую нагрузку, и интенсификацию дезинтоксикационных процессов данным клетками.

Ключевые слова: КРЫСЫ, ГМО, ПЕЧЕНЬ, ГЕПАТОЦИТ, ЦИТОПЛАЗМА, МИТОХОНДРИИ, ЯДРО, ПЕРОКСИСОМА, ЖЕЛЧНЫЕ КАПИЛЯРЫ

За даними щорічного огляду [1], присвяченого культивуванню генетично модифікованих сільськогосподарських культур, що опублікований спеціалізованим агробіотехнологічним агентством ISAAA, на початок 2013 року сумарні площі посівів під трансгенними культурами склали 170,0 млн га, що

становить більше 11 % всіх сільськогосподарських угідь у світі (1,5 млрд га), збільшившись за останні 17 років більше ніж у 100 разів (з 1,66 млн га у 1996 р.) та зокрема за минулий рік на 10 млн га. Біля 60 % населення світу проживають у 28 країнах, що у 2012 році споживали ГМР (генетично модифіковані

рослини). І з кожним роком цей показник інтенсивно зростає.

Найпопулярнішою сільськогосподарською культурою, яка широко використовується в харчовій промисловості, а також і як кормова добавка при відгодівлі тварин є соя. Білки сої містять незамінні амінокислоти. Стійкість до гербіцидів означає що останні або не включаються до метаболізму рослини, або дуже швидко виводяться, не встигаючи заподіяти шкоди. Виникає питання, чи не залишаються гербіциди в неактивній формі в тканинах рослини, і як вони себе поведуть в харчових ланцюгах? Таку версію висунула група вчених, які вважають, що причиною негативного впливу на тварин могло бути накопичення токсичного гербіциду «Roundup» у рослинах [2–7].

Оскільки основними органами, які впершу чергу реагують на токсичні продукти різного походження є печінка та шлунково-кишковий тракт, метою наших досліджень було виявити структурно функціональні зміни цих органів, при згодовуванні кормів з 20 % вмістом традиційної і ГМ сої. У першому поколінні ми виявили порушення пластинчастої будови печінкових часточок, на тлі зернистої дистрофії гепатоцитів. У другому і третьому поколінні, поряд із збереженою структурою печінки, відзначали розширення перисинусоїдальних просторів, кровонаповнення судин і розширення жовчних проток. Тому для поглибленого вивчення можливих віддалених наслідків впливу ГМ сої нами проводилось електронно-мікроскопічне дослідження печінки шурів третього покоління.

Матеріали і методи

Зразки сої обох сортів перевірялись на наявність генетичної модифікації, що підтверджено протоколом №2709/1-Л/03. У зразку №1 виявлені цільові послідовності промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), та термінатора NOS (T-NOS) Т1плазміді *Agrobacterium tumefaciens*. Соеві боби перед додаванням в

корми подрібнювались і термічно оброблялись при 140° протягом 1 год, для знешкодження антипоживних речовин та зниження уреазної активності. Комбікорми для дослідних тварин були збалансовані і пройшли випробування у лабораторії контролю кормових добавок і преміксів ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок (Протокол № 2709/3 від 28.10.11р.).

Досліди на 42 щурах лінії Вістар, виконувались у віварії ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, відповідно до вимог «Загально етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджується з Положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985р.), що підтверджено Висновком Біоетичної комісії від 20.12.2013.

Для поглибленого вивчення структури печінки застосовували електронно-мікроскопічні дослідження. Для цього відбирали шматочки печінки, фіксували у розчині глутаровому альдегіді в 0,2 молярному кокадилатному буфері (рН — 7,2) — 2 години. Зразки промивали у двох порціях буфера і дофіксували в 1,5 % розчині тетроксиду осмію (OsO₄). Після відмивання, дегідратації в зростаючих концентраціях етилового спирту, зразки заключали в епоксидну смолу — Епон-812. Ультратонкі зрізи контрастували ураніл ацетатом і цитратом свинцю. Зразки переглядали і фотографували в електронному мікроскопі ПЕМ-100 [8].

Результати й обговорення

Дослідження мікроструктури печінки шурів III покоління усіх дослідних груп відзначали добре виражену часточкову та пластинчасту будову органу, де переважно гепатоцити були з базофільною цитоплазмою. У шурів III групи виразніше виступали розширені внутрішньо часточкові синусоїдальні капіляри. При цьому простежувалось

значно розширенні жовчні протоки в ділянці триад, навколо яких виявляли помірну лімфоїдну інфільтрацію. Для поглибленого вивчення структури печінки проводилось електронно-мікроскопічне дослідження.

За ультраструктурного дослідження печінки щурів контрольної групи, виявлено: ядра гепатоцитів розташовані переважно в центрі гепатоцитів, великі за розміром, в більшості округлої форми, містять дрібнозернистий матрикс з рівномірно розпроділеними гранулами хроматину. Паралельно розташовані мембрани ендоплазматичної сітки тісно контактували з мітохондріями. Мембрани гранулярної ендоплазматичної сітки містили численні рибосоми (рис. 1).

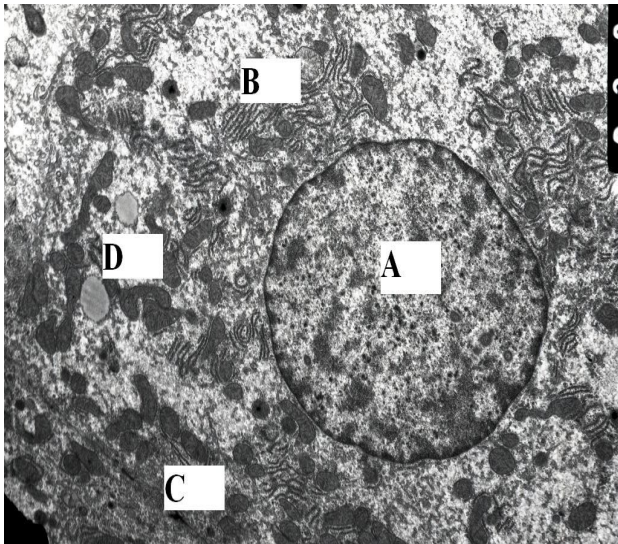


Рис. 1. Електроннограма гепатоцита контрольної групи щура. Зб. 4000 (А — ядро, насичене хроматином; С — гантелеподібної форми мітохондрії; В — паралельні мембрани ендоплазматичного ретикулуму; D — ліпідні краплі цитоплазми)

Вся поверхня гепатоцитів була покрита глікокаліксом. Гепатоцити між собою контактували за допомогою демосом. Жовчні капіляри, які ізольовували їх від синусоїдів були з ледь помітними, невеликими просвітами з невеликою кількістю мікро ворсинок (рис. 3).

Просвіти синусоїдів від пиресинусоїдальних просторів відокремлювали ендотеліоцити. Видовженої форми клітини

Мітохондрії осміофільні, різні за величиною, переважно сферичної або овальної форми, з досить великою кількістю крист, які, як і зовнішня мембрана, мали чіткі контури і контактували між собою та ядерною мембраною (рис. 2). У цитоплазмі поодинокі виявляли невеличкі ліпідні краплі, які переважно локалізувались біля цитоплазматичної мембрани, яка межувала з капілярами та в перинуклеарній ділянці. Цистерни комплексу Гольджі розташовані в різних відділах клітин (рис. 1). У гепатоцитах виявляли гранули глікогену, які подекуди утворювали агрегати у вигляді розеток, тоді як ліпідні гранули мали варіабельну електронну щільність і не були оточені мембранами.

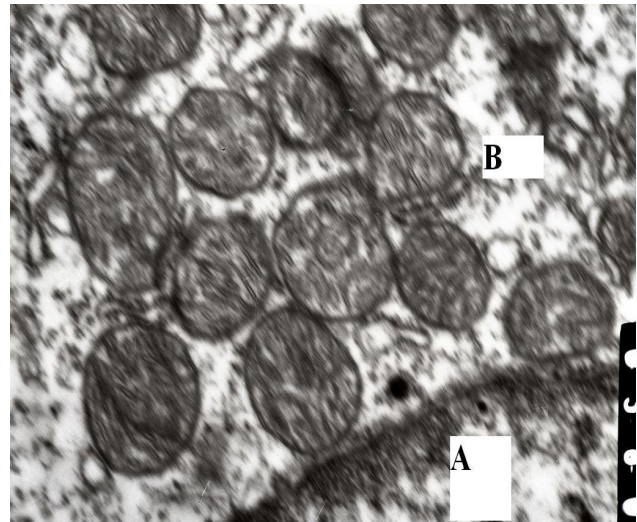


Рис. 2. Електроннограма мітохондрій гепатоцита щура контрольної групи. Зб. 18000 (А — мітохондрії; В — ядро)

містили великі, багаті хроматином ядра. Навколо полюсів ядра виявлялась компактна зона органел, в якій розташовані цистерни комплексу Гольджі, каналці агранулярної та гранулярної ендоплазматичної сітки й численні мітохондрії. У місці контактів, ендотеліоцити мали безліч відростків, завдяки яким утворювались ситоподібні зони в стінці синусоїди (рис. 4). Базальна

мембрана навколо ендотеліальних клітин не утворювала суцільного шару. Здебільшого її фрагменти виявлялись навколо периферійної зони ендотеліоцитів. У периферійній частині ендотеліоцитів були розташовані фенестри, не зтягнуті діафрагмами (пори). Найбільшу

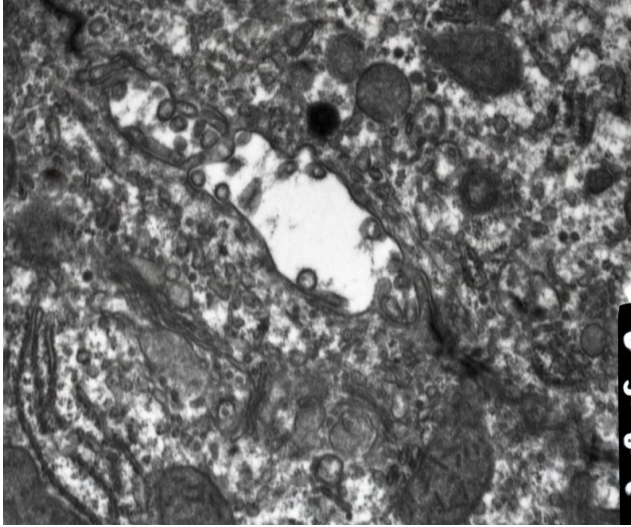


Рис. 3. Фрагмент гепатоцитів щура контрольної групи. Помірно розширений жовчний капіляр. Зб. 14000

У просвітах синусоїдів та між ендотеліоцитами були розташовані зірчасті макрофагоцити. Вони мали численні псевдоподії та складки мембрани, ядра яких були бобоподібною форми. Поблизу ввігнутої поверхні ядра містяться цистерни комплексу Гольджі та безліч лізосом.

У щурів, які споживали з кормом традиційну сою, істотної динаміки змін в ультраструктурній організації не відзначали. Ядра гепатоцитів круглої форми, з дрібнозернистим матриксом та інвагінаціями каріолеми. Перинуклеарний просвіт не розширений і має приблизно однакову ширину по всьому периметру ядерної мембрани (рис. 5).

У цитоплазмі гепатоцитів розміщувалась велика кількість

протяжність мала периферійна зона, в якій знаходились нечисленні органели, вона була витончена й мала безліч плазмолемних везикул, серед яких розрізняли плазмолемні, що були зв'язані з базальною та адлюменальною поверхнями й вільні.

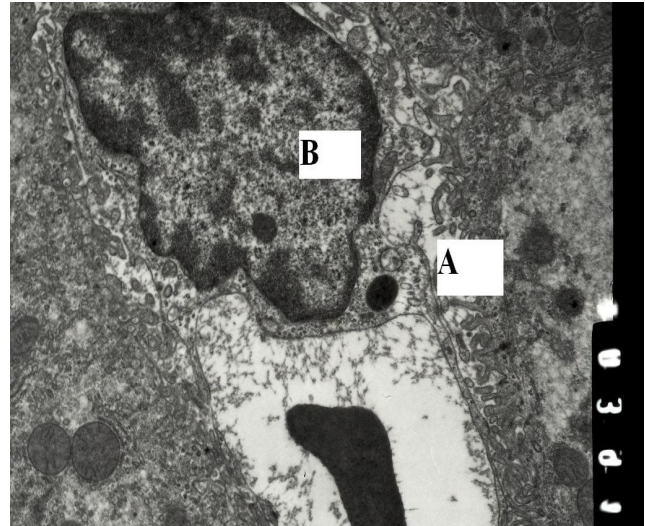


Рис. 4. Ендотеліоцит печінки щура контр. групи. Зб. 6000(А- проствіт Діссе; В- Клітини Купфера)

мітохондрій із збереженою структурою. Виділяли серед них помірно набубнявілі мітохондрії, з широко розставленими кристами, дещо світлішим матриксом (рис. 6).

Паралельно розміщені мембрани ендоплазматичного ретикулуму були всіяні рибосомами. Чітко проглядались поодинокі розташовані в цитоплазмі округлої форми дрібні осміюфільні пероксисоми. По периферії цитоплазми спостерігалось скупчення ліпідних крапель. Жовчні капіляри були помірно розширені, що ймовірно зумовлено, що вказує на інтенсивне навантаження секреторної діяльності гепатоцитів. (рис. 7)

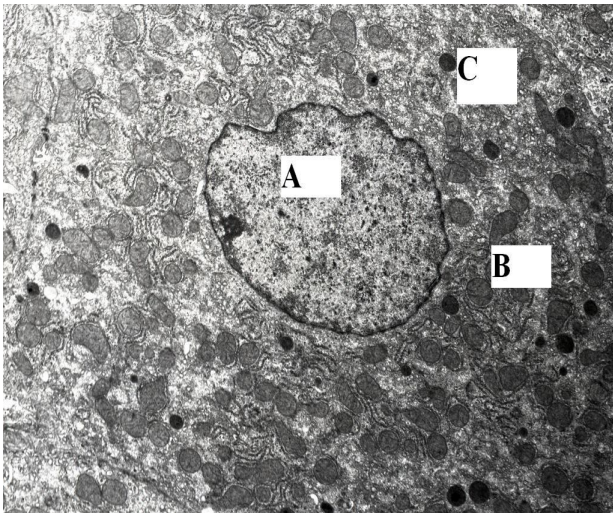


Рис. 5. Електроннограма гепатоцита щура другої дослідної групи. Зб. 4000 (А — ядро, з ядерцем; В — мітохондрії; С — пероксисоми)

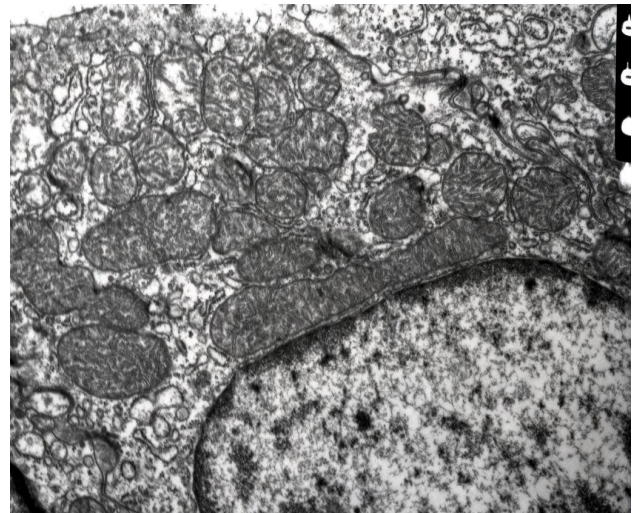


Рис. 6. Мітохондрії, розміщені навколо ядра, з вираженими кристами. Фрагмент гепатоцита щура II дослідної групи Зб. 14000

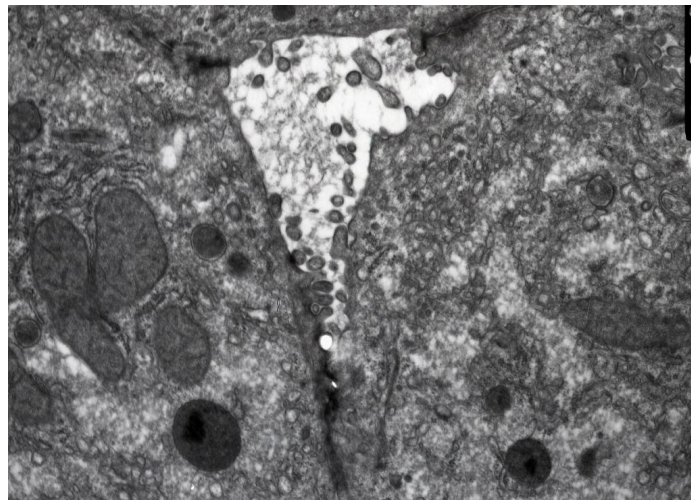


Рис. 7. Помірно розширений жовчний капіляр печінки щура другої дослідної групи. Зб. 10000

У третій дослідній групі щурів, які отримували з кормом 20 % ГМ-сої, в більшості гепатоцитів чітко простежувались ультраструктурні відмінності. Ядра округлої форми, з наявною інвагінацією ядерної мембрани, що сприяло збільшенню протяжності каріолеми. У ядерній мембрані були помітні відкриті пори, навколо яких відзначалась відсутність хроматину, що вказувало на їх активний вихід у цитоплазму, а це сприяло посиленню передачі інформації між ядром і

цитоплазмою, і забезпечення інтенсифікації процесів метаболізму. У деяких гепатоцитів ядра дещо деформовані із зменшеним вмістом хроматину, з вогнищевим розширенням перинуклеарного простору (рис. 9). Мітохондрії більшості гепатоцитів були набубнявілі, кристи широко розставлені, деякі зруйновані. До деяких пошкоджених мітохондрій наближаються первинні лізосоми. У перинуклеарній зоні істотно збільшилась кількість мітохондрій і первинних лізосом (рис. 8).

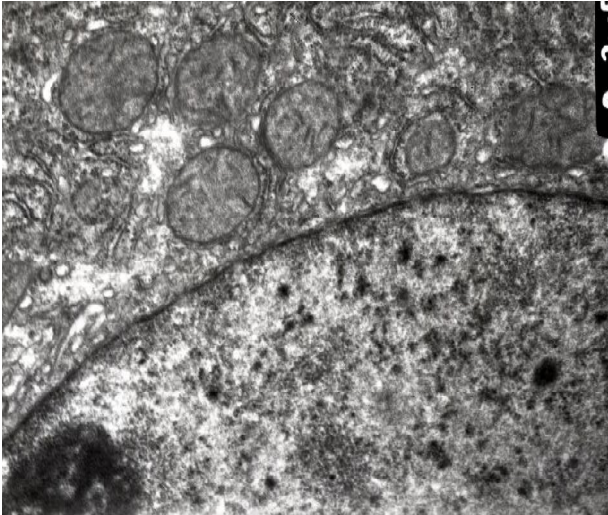


Рис. 8. Ядерна мембрана з численними ядерними порами гепатоцита щурів III групи. Зб. 14000

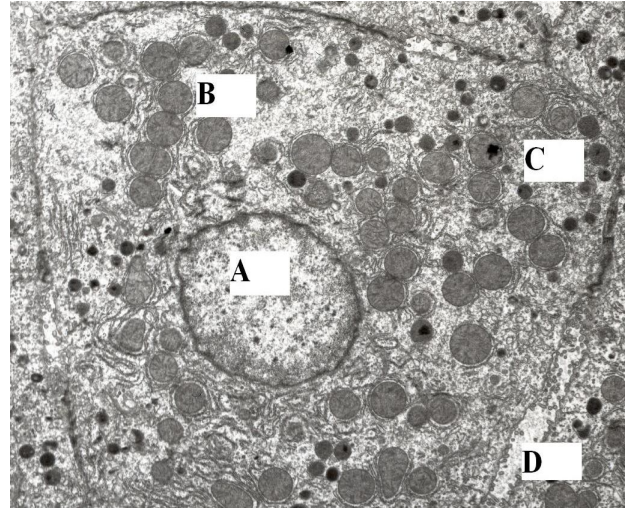


Рис. 9. Електроннограма гепатоцита щурів III дослідної групи. Зб. 4000 (А — ядро з інвагінацією каріолеми; В — набубнявілі мітохондрії; С — пероксисоми; D — розширені жовчні капіляри)

Разом з тим відзначалось розширення просвіту між мембранами ендоплазматичного ретикулуму і зменшенням кількості рибосом. Стосовно контролю, кількість вільних рибосом і полісом дещо знизилась. Гладкі мембрани пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі місцями розпушилися. Навколо мембран комплексу Гольджі локалізувались електронно-прозорі вакуолі, форма і розміри яких варіювали у широких межах. Збільшувався вміст ліпідних включень (рис. 11).

Виявлені субмікроскопічні зміни вказують на значне навантаження енергетичного і протеїнового синтезу клітини. Також спостерігалось значне зростання в цитоплазмі гепатоцитів пероксисом. Ці органели тісно пов'язані із метаболізмом ліпідів, розщепленням перекису водню до кисню і води тощо (рис. 8). Тому утворення і збільшення в клітині кількості пероксисом є однією із субклітинних адаптативних процесів на дію тих чи інших не властивих для організму продуктів [9].

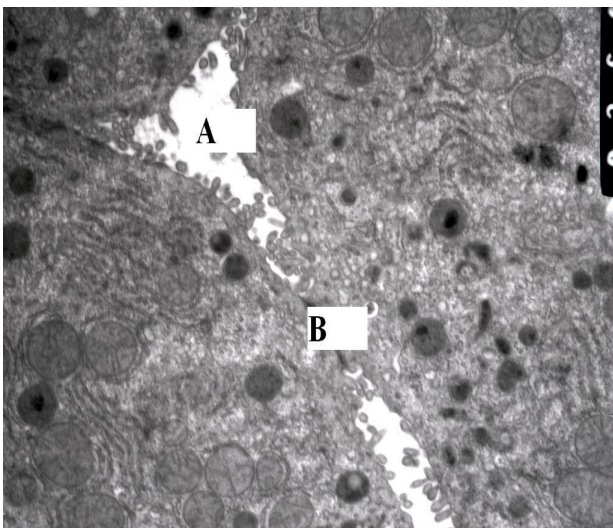


Рис. 10. А — розширення жовчних капілярів між гепатоцитами третьої дослідної групи щурів; В — дисмосомальний контакт між гепатоцитами. Зб. 8000

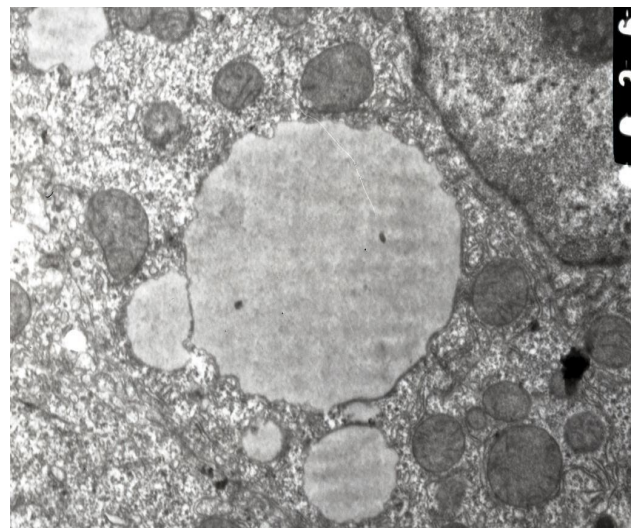


Рис. 11. Ліпідні краплі цитоплазми гепатоцита щурів III групи. Зб. 8000

Слід зазначити, що порівняно з контрольною групою простежувалось значне розширення жовчних капілярів і зростання в них кількості мікрроворсинок. Розширювались і просвіти Діссе (рис.10). Зірчасті макрофаги знаходились у активному стані, їх цитоплазма містила добре розвинуті органели й автофагосоми. Ендотеліоцити синусоїдних капілярів з просвітленою гіалоплазмою. У цитоплазмі відростків ендотеліоцитів наявні в невеликій кількості піноцитозні міхурці. У просвіті капілярів виявлялись клітинні елементи крові і велика кількість безструктурної речовини, ймовірно ліпопротеїдної природи.

Висновки

У печінці щурів III покоління, яким згодовували генетично модифіковану сою, ультраструктурно виявлено в цитоплазмі гепатоцитів помірне набубнявіння мітохондрій і зменшення в них кількості крист, значне зростання кількості пероксисом на тлі зниження вмісту хроматину в ядрах, а в перисинусоїдальному просвіті виражене значне розширення жовчних капілярів. Всі ці субмікроскопічні зміни вказують на енергетичне навантаження, та інтенсифікацію дезінтоксикаційних процесів даними клітинами.

Перспективи подальших досліджень. Наступним етапом наших досліджень буде проведення експериментального дослідження на кролях, яким аналогічно будуть задаватись корми з 20 % вмістом ГМ та традиційної сої. Оскільки дана проблема стосується не тільки ветеринарії, а й людства в цілому, тому вона вимагає ретельного, довготривалого і комплексного дослідження науковцями, як ветеринарної, так і людської медицини.

1. James C. Global status of commercialized biotech GM crops: ISAAA Brief, *Ithaha* 2013, 244, pp. 24–28.

2. Malatesta M., Perdoni F., Santin G. and other Hepatoma tissue culture (HTC) cells as a model for investigating the effects of low concentrations of herbicide on cell structure and function, *Toxicol in vitro*. 2008; 22, (1853), pp. 58–60.

3. Blum J. B., Negretskui V. A., Jemets A. I. Ohlyad stanu vprovadzhennya ta doslidzhennya biotekhnolohiyi ta biobezpeky v Ukraini ta krayinakh subrehionu. [Review of the implementation and study of biotechnology and biosafety in Ukraine and the countries of the subregion] — Proekt UNEP-GEF : «Rozrobka natsional'noyi ramkovoyi struktury biobezpeky dlya Ukrainy», Kyiv, 2003. P. 82–86 (in Ukrainian).

4. Brake D. G., Evenson D. P. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development, *Chemical Toxicology*, 2004, 23, p. 45–46.

5. Tekhver U. T. Gistologiya pishchevaritelnykh organov domashnikh zhivotnykh. Tartu, Rotalprint ECHA, 1974, 1, p. 191–211 (in Russian).

6. Dolajchuk O., Fedoruk R. Gistologichna struktura i masovetruchni koeficienty vnutrischnich organiv shchuriv za zgodovuvannya soi naturalnuch ta genetichno modufikovanykh sortiv. *Vestnik Lvivskogo natsionalnogo uniersutety — Bulletin of the Lviv National University*, 2012, no. 59, pp. 235–241 (in Ukrainian).

7. Smoljar V. Henetychno modyfikovani orhanizmy i kharchuvannya naseleण्या. [GMOs and nutrition]. *Problemy kharchuvannya — Problems of food*, 2009, no. 1–2. pp. 35–41 (in Ukrainian).

8. Kuja D. *Tekhnika elektronnoyi mikroskopiyyi* [Electronic microscopy]. Moskva, 1965. P. 286–288 (In Russian).

9. Pustai A., Bardocz G., Alonso R. et al. Expressin of insectial bean alpha-amylase inhibitor transgene has minimal detrimenae effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30%of the diet. *Journal Nutrittion*, 1999, vol. 129, no 8, pp. 1597–1603.