

На правах рукописи

ТЫШКО НАДЕЖДА ВАЛЕРЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА, РАЗВИТИЕ И ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ СИСТЕМЫ ОЦЕНКИ
БЕЗОПАСНОСТИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ
ОРГАНИЗМОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

14.02.01 – гигиена

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор, академик РАН,
научный руководитель Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Федеральный
исследовательский центр питания, биотехнологии и
безопасности пищи
Тутельян Виктор Александрович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор, академик РАН,
научный руководитель Федерального бюджетного
учреждения науки "Федеральный научный центр медико-
профилактических технологий управления рисками
здоровью населения" Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Зайцева Нина Владимировна

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН,
директор Федерального бюджетного учреждения науки
"Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана"
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
Ракитский Валерий Николаевич

доктор биологических наук, профессор, академик РАН,
научный руководитель Федерального государственного
бюджетного научного учреждения "Всероссийский научно-
исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии"
Харченко Петр Николаевич

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Центр стратегического планирования и
управления медико-биологическими рисками здоровью" Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Защита состоится " ____ " _____ 2019 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета
Д 001.002.01 при ФГБУН "ФИЦ питания и биотехнологии" по адресу: 109240, Москва,
Устьинский проезд, 2/14

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН "ФИЦ питания и биотехнологии",
а также на сайте www.ion.ru

Автореферат разослан " ____ " _____ 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Шилина Наталия Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В соответствии с положениями "Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации", утвержденной указом Президента Российской Федерации от 30 января 2010 г. № 120, обеспечение продовольственной независимости страны является одной из приоритетных задач государства, в решении которой первое место занимает устойчивое развитие сельскохозяйственного производства. Ключевым элементом формирования современного агропромышленного комплекса является использование инновационных биотехнологий, позволяющих значительно повысить производительность в условиях снижения зависимости от природных ресурсов, использовать наиболее экологически и экономически выгодные способы ведения хозяйства (Тутельян В.А. Ред. Генетически модифицированные источники пищи: оценка безопасности и контроль. М.: Издательство РАМН, 2007. 444 с.; Tutelyan V.A. Ed. Genetically Modified Food Sources. Safety Assessment and Control. Elsevier Inc. Academic Press, 2013. 338 p.).

Научные достижения конца XX века в области геномики, молекулярной биологии и генетической инженерии позволили многократно ускорить селекционную работу, обеспечивая возможность создания растений с заданными признаками в кратчайшие сроки. Началом промышленного использования генно-инженерно-модифицированных (ГМ) сельскохозяйственных культур принято считать 1994 год, когда томат марки FLAVR SAVR поступил на продовольственный рынок США. К настоящему времени мировые площади посевов ГМ культур составляют более 12% земель, используемых в агропромышленном производстве, количество ГМ линий превышает 500, при этом новые растения являются представителями уже третьей генерации ГМ организмов (ГМО) (ISAAA, 2019. URL: <https://www.isaaa.org/>).

Поскольку ГМО относятся к пищевой продукции нового вида, ранее не употреблявшейся человеком в пищу, обеспечение безопасности такой продукции регулируется на государственном уровне и является важнейшим условием ее использования. В соответствии с ТР ТС 021/2011 "О безопасности пищевой продукции", безопасность пищевой продукции определяется как "...состояние пищевой продукции, свидетельствующее об отсутствии недопустимого риска, связанного с вредным воздействием на человека и будущие поколения...", поэтому поиск путей совершенствования методов оценки безопасности ГМО должен быть сконцентрирован на подходах, позволяющих исследовать влияние на будущие поколения.

Степень разработанности темы исследования

Формирование российской системы оценки безопасности ГМО было начато в 1995-1996 гг. Данная система была разработана на основании отечественного опыта в области медико-биологических исследований белковых продуктов микробиологического синтеза (Покровский А.А. Отв. ред. Медико-биологические исследования углеводородных дрожжей (1964-1970 гг.). М.: Наука, 1972. 468 с.), а также с учетом существующих международных подходов (Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology, concepts and principles. Paris: OECD, 1993. 79 p.), и представляла собой комбинированный алгоритм, включающий, помимо вышеперечисленных исследований свойств ГМО, обязательный блок токсикологических, аллергологических и генотоксикологических исследований *in vivo* (МУ 2.3.2.970-00). Начиная с момента оценки безопасности первых ГМ линий, проходивших процедуру государственной регистрации, данная система получила международное признание и была квалифицирована как самая строгая из существующих. Вместе с тем, дальнейшее развитие генно-инженерных технологий и наметившаяся устойчивая тенденция к расширению перечня ГМ линий и видов растений, имеющих ГМ аналоги, определили необходимость совершенствования системы оценки их безопасности.

Цель работы: поиск новых методических подходов для выявления возможных неблагоприятных эффектов ГМО и доказательства их безопасности для нынешнего и последующих поколений; формирование системы оценки безопасности ГМО, являющихся продуктами новейших генно-инженерных технологий, доказательство эффективности этой системы и ее использование в рамках процедуры государственной регистрации новых ГМ линий на территории Евразийского экономического союза (ЕАЭС).

Основные задачи:

- проведение поисковых исследований для выбора показателей, моделей и "нагрузочных" проб с целью формирования комплекса токсиколого-гигиенических исследований, необходимых для доказательства безопасности ГМО;
- формирование базы данных физиологических значений показателей, изучаемых в рамках токсикологических и репротоксикологических экспериментов на крысах *in vivo*;
- разработка нового стандартизованного синтетического рациона для лабораторных животных с учетом современных данных о физиологических потребностях в макро- и микронутриентах, а также о биодоступности витаминов и минеральных веществ;
- разработка модели повышения чувствительности крыс к токсической нагрузке посредством модификации состава рациона, вызывающей снижение адаптационного потенциала организма, подтверждение эффективности этой "нагрузочной" пробы в токсикологических и репротоксикологических исследованиях с низкими дозами токсикантов;
- разработка новой расширенной системы оценки ГМО, гарантирующей их безопасность не только для настоящего, но и последующих поколений, использование этой системы для оценки безопасности новых линий ГМ сои и кукурузы. Формирование порядка оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками.

Научная новизна

Впервые разработана и экспериментально обоснована новая система оценки безопасности ГМО растительного происхождения, включающая расширенный комплекс токсиколого-гигиенических исследований, центральным звеном которого является изучение репродуктивной функции и развития потомства.

Установлены диапазоны значений для более 100 показателей, характеризующих физиологическое состояние различных органов и систем у здоровых крыс на разных стадиях онтогенеза, этапах пре- и постнатального развития потомства, что позволяет обеспечить объективный анализ и интерпретацию результатов исследований в рамках оценки безопасности ГМО.

Впервые выявлено влияние солей лития на снижение фертильности крыс. Оптимизирован состав синтетического рациона для взрослых и растущих лабораторных животных, а также состав специализированного рациона для экспериментов по изучению репродуктивной функции.

Разработана модель повышения чувствительности крыс к токсической нагрузке за счет снижения их адаптационного потенциала. Впервые определены пороговые значения (19% для самцов и 18% для самок – от базового уровня в рационе) витаминов В1, В2, В3, В6, а также минеральных веществ – Fe³⁺ и Mg²⁺, приводящие к достоверному снижению адаптационного потенциала у лабораторных животных. Эффективность данной модели подтверждена в токсикологических и репротоксикологических экспериментах.

Впервые получены доказательства эффективности использования апоптоза в качестве чувствительного биомаркера при токсикологических исследованиях. Установлены периоды онтогенеза, характеризующиеся минимальным (110-120-й дни жизни) и максимальным (20-й день внутриутробного развития) уровнями апоптоза. Охарактеризовано влияние составов рационов на интенсивность апоптоза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость заключается в совершенствовании методологии токсикологических экспериментов *in vivo*, направленных на выявление и оценку воздействий малой интенсивности, к которым, по современным представлениям, относятся ГМО.

Практическая значимость определена интеграцией новой системы оценки безопасности в практику работы Роспотребнадзора и акцептированием для государственной регистрации ГМО в странах ЕАЭС, с 2011 года являющейся базовой при выполнении многоуровневых токсиколого-гигиенических исследований. Эта система использована при оценке 4 линий сои (MON87701, SYHT0H2, FG72, MON87708) и 5 линий кукурузы (5307, MON89034, 1507, MZHGOJG, DAS-40278-9).

Разработан порядок оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками, использованный при исследованиях ГМ сои линии MON87701×MON89788.

На основании результатов проведенных исследований **10** новых ГМО прошли государственную регистрацию, внесены в Реестр свидетельств о государственной регистрации и разрешены для производства, реализации и использования в пищевой промышленности на территории ЕАЭС.

Требования к выполнению исследований обобщены в **8** методических документах, утвержденных на федеральном уровне и действующих на территории Российской Федерации.

Методология и методы исследований

Наряду с традиционными токсикологическими методами и методами изучения репродуктивной токсичности *in vivo*, в работе использованы впервые разработанные нами "нагрузочные" модели, повышавшие чувствительность крыс к токсическим воздействиям посредством модификации витаминно-минерального состава рационов. Для анализа полученного биологического материала были использованы биохимические, морфологические, генотоксикологические, иммунологические, аллергологические методы, адекватные поставленным экспериментальным задачам.

Личный вклад автора

В исследованиях, вошедших в диссертацию, автору принадлежит постановка целей и задач в рамках поисковых исследований и выбора показателей, моделей и "нагрузочных" проб, впоследствии вошедших в комплекс токсиколого-гигиенических исследований безопасности ГМО; формирование базы данных физиологических значений показателей, изучение которых производится в рамках токсиколого-гигиенических и репротоксикологических экспериментов; разработка дизайнов экспериментов, формулировка целей и задач экспериментальных исследований, анализ и интерпретация их результатов. Более 70% представленных экспериментальных данных получены лично автором. Разработка нового подхода к оценке безопасности ГМО и интеграция этого подхода в российскую систему оценки ГМО выполнены лично автором или при непосредственном участии автора.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы **107** работ, в том числе **33** статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, **46** публикаций в журналах, индексируемых в базах данных "Web of science" или "Scopus", **5** монографий (Издательство РАМН, 2007, рус., 444 с., автор 2 глав, соавтор 3 глав; Издательство Elsevier Academic Press, 2013, англ., 338 с., научный редактор 5 глав, автор 2 глав, соавтор 3 глав; Издательство "Медицина для всех", 2007, рус., 128 с., в составе авторского коллектива; Издательство "Приложение к журналу "Здоровье", 2004 рус., 63 с. и Издательство "КВЦ" 2006, рус., 40 с., в составе авторского коллектива) и **1** глава в книге "Химия пищевых продуктов" (ИД "Профессия", 2012, пер. с англ., 1040 с. – С. 970-1023).

Степень достоверности результатов

Экспериментальные исследования выполнены с использованием современных, стандартизованных, апробированных методов на большом объеме экспериментального материала. Условия содержания и работы соответствовали российским и международным рекомендациям и принципам гуманного обращения с животными. Результаты всех экспериментов статистически обработаны с использованием актуальных методов вариационной статистики и сопоставлены с установленными в результате предварительно проведенных исследований интервалами вариабельности биологической нормы изучаемых показателей. Выводы соответствуют цели и задачам и согласуются с результатами исследований.

Апробация результатов

Материалы диссертационной работы доложены на **33** международных и всероссийских научных мероприятиях, в том числе на X, XIII, XIV, XV, XVI, XVII Всероссийских Конгрессах диетологов и нутрициологов с международным участием "Питание и здоровье", Москва, 2008, 2011, 2012, 2014, 2016, 2018 гг.; Международной научно-практической конференции "Питание и здоровье" – Алматы, Казахстан, 4 мая 2009 г.; V, VIII, IX, Московских международных конгрессах "Биотехнология: состояние и перспективы развития", Москва, 2009, 2015, 2017 гг.; Международном форуме "Биотехнология: состояние и перспективы развития" – Москва, 23-25 мая 2018 г.; IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов "Окружающая среда и здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире" – Москва, 27-28 сентября 2012 г.; 2-й Международной научно-практической конференции "Технологии производства пищевых продуктов питания и экспертиза товаров" – Курск, 10-11 апреля 2016 г.; IX научно-практической конференции с международным участием "Молекулярная диагностика 2017" – Москва, 18-20 апреля 2017 г.; 43-м и 44-м Конгрессах Федерации Европейских биохимических обществ (FEBS), Прага, 2018 г., Краков, 2019 г.; Международных конференциях "The 54th and 55th Congress of the European Societies of Toxicology" (EUROTOX 2018, EUROTOX 2019), Брюссель, 2018 г., Хельсинки, 2019 г.

Основные положения, выносимые на защиту

- Экспериментальное обоснование выбора новых методических подходов для использования в комплексных токсиколого-гигиенических исследованиях ГМО растительного происхождения и доказательство их эффективности в условиях воздействия низких доз антропогенных контаминантов (Cd²⁺, CCl₄, глифосат) и на моделях снижения адаптационного потенциала крыс, обусловленного дефицитом эссенциальных пищевых веществ (витаминов группы B, железа и магния).
- Формирование новой расширенной системы оценки безопасности ГМО, включающей эксперименты на двух поколениях крыс, характеристику репродуктивной функции, пре- и постнатального развития потомства, токсикологические и аллергологические исследования, гарантирующие отсутствие риска ГМ пищевой продукции для здоровья нынешнего и будущих поколений. Практическая реализация этой системы в виде методической базы для регистрационных испытаний ГМО в Российской Федерации.
- Результаты применения новой системы комплексных токсиколого-гигиенических исследований, доказывающие безопасность пяти линий ГМ сои (MON87701, SYHT0H2, FG72, MON87708, MON87701×MON89788) и пяти линий ГМ кукурузы (5307, MON89034, 1507, MZHGOJG, DAS-40278-9) и являющиеся основанием для их государственной регистрации на территории Российской Федерации и Евразийского экономического союза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные животные

Исследования выполнены на крысах линии Вистар, исходные колонии были получены из питомника лабораторных животных Филиал "Столбовая" ФГБНУ "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства". Всего в работе было использовано 5085 взрослых животных (2649 самок и 2436 самцов), 10598 крысят 1-го месяца жизни и 5428 плодов (20-й день пренатального развития). Крысы содержались в пластиковых клетках с древесной подстилкой, в отопляемом (температурный режим +21-23°C) и вентилируемом помещении с естественным освещением, доступ к корму и воде – *ad libitum*. Работу с животными проводили в соответствии с Приказом Минздрава Российской Федерации № 267 от 19.06.2003 г. "Об утверждении правил лабораторной практики", Приказом Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 "Об утверждении правил лабораторной практики" и Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 193н от 01.04.2016 г. "Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики", а также Руководством американской ветеринарно-медицинской ассоциации (AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. URL: <https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/Euthanasia-Guidelines.aspx>).

Генотоксикологические исследования выполнены на мышах самцах линии C57Bl/6, характеризующейся высоким уровнем спонтанного мутагенеза (всего 300 мышей). Животные получены из питомника "Столбовая", исходная масса тела 16-20 г.

Экспериментальные рационы

В экспериментах использован полусинтетический казеиновый рацион (ПКР) и общевиварный рацион, состав которых представлен в МУ 2.3.2.2306-07; рацион AIN-93, разработанный Американским институтом питания (American Institute of Nutrition, AIN), состав которого представлен в публикации (Reeves P.G. et al. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. J. Nutr. 1993. Vol. 123(11). P. 1939-1951); а также новый оптимизированный ПКР, состав которого представлен в МУ 2.3.2.3388-16.

При включении в состав полусинтетических рационов исследуемых ГМО и их традиционных аналогов замену ингредиентов рациона производили с учетом содержания белков, жиров, углеводов и пищевых волокон во вводимом продукте при соблюдении принципа изокалорийности и идентичности химического состава; сою включали в виде обезжиренной муки, кукурузу – в виде нативной муки.

Постановка экспериментов

В течение экспериментов велись ежедневные наблюдения за внешним видом, поведением, общим состоянием животных и поедаемостью корма. Измерение массы тела крыс 30-200 дней жизни проводили еженедельно, массу тела и краниокаудальный размер (рост) крысят первого месяца жизни определяли на 2-й, 5-й, 10-й, 15-й, 20-й и 25-й дни жизни. Краткое описание дизайнов экспериментов представлено в соответствующих разделах главы "Результаты исследований и их обсуждение".

Общая продолжительность экспериментов составила 3535 дней (9,6 лет) из них поисковые эксперименты – 1658 дней (4,5 лет), оценка безопасности ГМО – 1877 дней (5,1 лет).

Оценка репродуктивной функции и развития потомства

В рамках оценки репродуктивной функции крыс изучали генеративную и эндокринную функцию гонад родительских животных, пре- и постнатальное развитие потомства. Генеративную функцию гонад исследовали у половозрелых самок и самцов (возраст 100-110 дней) по эффективности спаривания самок и самцов, выраженную в процентном соотношении забеременевших самок/оплодотворивших самцов к общему количеству ссаженных самок/самцов. Самок ссаживали с самцами в соотношении 2:1 на 7 дней, беременность обеих или одной самки подтверждала фертильность самца, в случае, если ни одна из самок не забеременела, самец считался не фертильным, а обе самки – потенциально фертильными. Для характеристики

эндокринной функции яичников определяли содержание эстрадиола, прогестерона и тестостерона в сыворотке самок на 20-й день беременности.

Для оценки пренатального развития по 10-15 беременных самок F₀ из каждой группы подвергали эвтаназии на 20-й день беременности, подсчитывали количество желтых тел, мест резорбции и мест имплантации, определяли число живых и мертвых плодов, вычисляли предимплантационную гибель (по разности между количеством желтых тел в яичниках и мест имплантации в матке) и постимплантационную гибель (по разности между количеством мест имплантации и живых плодов). Плоды извлекали, проводили макроскопический осмотр, определяли массу и краниокаудальный размер (Хабриев Р.У. Ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. 832 с.). После осмотра, измерения и взвешивания плоды каждого помета делили на три группы: у одной группы (не менее 5 плодов) выделяли и взвешивали внутренние органы (печень, почки, сердце, легкие), плоды второй группы фиксировали в жидкости Буэна и использовали для изучения внутренних органов по методу Wilson (Там же; Wilson J.G. Embryological Considerations In Teratology. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1965. Vol. 123. P. 219-227), плоды третьей группы фиксировали в 96° этаноле и использовали для изучения состояния скелета по методу Dawson (Там же; Dawson A.B. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain Technol. 1926. Vol. 1. P. 123-124).

Постнатальное развитие оценивали в течение первого месяца жизни по числу живых и мертвых крысят, динамике зоометрических показателей (массы тела и краниокаудального размера), общему физическому развитию (срокам отлипания ушных раковин, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов, открытия глаз, опускания семенников, открытия влагалища). Также определяли среднюю величину помета, соотношение самцов и самок, вычисляли выживаемость с 1 по 5-й дни жизни (отношение числа крысят, доживших до 5-го дня, к числу родившихся живыми) и с 6-го по 25-й дни жизни (отношение числа крысят, доживших до 25-го дня, к числу доживших до 6-го дня).

Гематологические, биохимические и морфологические методы исследования

Гематологические исследования* включали определение концентрации гемоглобина (Hb), общего количества эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, гематокритной величины, тромбокритной величины, среднего содержания гемоглобина в одном эритроците (MCH), средней концентрации гемоглобина в одном эритроците (MCHC), среднего объема одного эритроцита (MCV), среднего объема одного тромбоцита (MPV), дифференциальный подсчет лейкоцитарной формулы. Исследования выполнены с использованием гематологического анализатора "Coulter Ac•T™ 5 diff OV" и реактивов фирмы "Beckman Coulter", США.

Биохимические исследования* сыворотки крови включали определение содержания общего белка, альбумина, глобулина, триглицеридов, общего билирубина, прямого билирубина, мочевины, мочевой кислоты, креатинина, глюкозы, холестерина, микроэлементов (кальция, магния, железа, натрия, калия, фосфора, хлора), а также активности лактатдегидрогеназы, альфа-амилазы, креатинфосфокиназы, щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы. Исследования выполняли с использованием автоматического биохимического анализатора "Konelab 20i" и реактивов фирмы "Thermo Fisher Scientific", США.

Активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР) определяли спектрофотометрическими методами по (Mills G.C. The Purification and Properties of Glutathione Peroxidase of Erythrocytes. J. Biol. Chem. 1959. Vol. 234. № 3. P. 502-506; Tillotson J.A., Sauberlich H.E. Effect of riboflavin depletion and repletion on the erythrocyte glutathione reductase in the rat. J. Nutr. 1971. Vol. 101. P. 1459-1466; Nishikimi M. et al. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972. Vol. 46. P. 849-854; Oshino N., Chance B. The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. Arch. of Biochem. and Biophys. 1973. Vol. 154. № 1. P. 117-131; Мальцев Г.Ю., Васильев А.В. Способ определения активности каталазы и супероксиддисмутазы эритроцитов на анализаторе открытого типа. Вопр. мед. химии. 1994. № 2. С. 56-58; Мальцев Г.Ю., Орлова Л.А. Оптимизация определения активности глутатионредуктазы эритроцитов человека на полуавтоматическом анализаторе. Вопр. мед. химии. 1994. № 2. С. 59-61), содержание малонового диальдегида (МДА)

в крови и печени определяли спектрофотометрическим методом по (Ernster L., Nordenbrandt K. Microsomal lipid peroxidation. in Methods in Enzymology. Oxidation and phosphorylation. Estabrook R.W., Pullman M.E., eds., Ac. Press N.Y., 1967. Vol. 10. P. 574-580; Michara M. et al. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency. Biochem. Med. 1980. Vol. 23. P. 302-311; Костюк В.А., Потапович А.И. Определение продуктов перекисного окисления липидов с помощью тиобарбитуровой кислоты в анаэробных условиях. Вопр. мед. химии. 1987. № 3. С. 115-118).

Морфологические исследования включали макроскопические и обзорные гистологические исследования, проведенные общепринятыми методами.

Методы исследования апоптоза

Гель-электрофорез изолированных клеток (метод "ДНК-комет") был использован для оценки степени фрагментации ДНК и расчета индекса апоптоза (Smith C. C. et al. Recommendations for design of the rat comet assay. Mutagenesis. 2009. Vol. 24(1). P. 95-95; OECD 489, 2016). Микроскопический анализ проводили на микроскопе Zeiss Axio Imager Z1 при увеличении 400х. Полученные изображения ДНК-комет (краситель SYBR Green I) анализировали с использованием программного обеспечения Comet Imager system, "Metasystems GmbH". В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет (% ДНК в хвосте). С каждого микропрепарата анализировали не менее 1000 клеток. В общем числе клеток считали количество апоптотических (апоптотическими считали клетки с содержанием ДНК в хвосте "кометы" более 30%).

Индекс апоптоза (ИА) рассчитывали по формуле:

$$IA = \frac{A+}{1000 \text{ клеток}} \times 100\% \quad \text{где } A+ \text{ – количество апоптотических клеток}$$

Метод проточной цитофлуориметрии*. Клетки окрашивали аннексином V (AnV-FITC), конъюгированным с флуорохромом (FITC), и витальным красителем 7-AAD (набор Annexin V-FITC/7-AAD Kit, производства "IMMUNOTECH", Франция). Флуоресценцию клеток анализировали при длинах волн 525 и 675 нм на проточном цитофлуориметре "Cytomics FC-500" производства "Beckman Coulter", США, с использованием компьютерной программы Cytomics CXP Software. Популяцию клеток выделяли при помощи гейтирования по параметрам малоуглового и бокового светорассеяния. Результаты представляли в виде процентного соотношения живых клеток и клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза, на 10000 просчитанных объектов в каждом образце.

Методы статистического анализа

Результаты приведены в виде $M \pm m$ и min-max, где M – выборочное среднее измеряемых величин, m – стандартная ошибка, min и max – соответственно минимальное и максимальное значение, а также долях (процентах) или абсолютных числах. При вычислении процента различия показателя у контрольных и опытных животных, за 100% принимали значение соответствующего показателя у крыс контрольной группы. Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 13.0. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Для определения границ физиологической нормы показателей, определяемых в токсикологических и репротоксикологических исследованиях, обобщенные данные от животных, входивших в контрольные группы более чем в 25 отдельных экспериментах, были обработаны с помощью пакета программы IBM SPSS Statistics v.23.0 и представлены в виде таблиц и гистограмм*.

*Автор признателен к.м.н. Э.Н. Трушиной, к.м.н. О.К. Мустафиной, к.м.н. С.Х. Сото, к.м.н. Э.Э. Кешабянц за помощь при выполнении этой работы

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1 Формирование базы данных физиологических значений показателей

Для определения диапазона физиологических колебаний более 100 показателей, характеризующих физиологическое состояние различных органов и систем у здоровых крыс на разных стадиях онтогенеза, этапах пре- и постнатального развития потомства крыс линии Вистар, были обобщены данные, полученные от использованных в различных экспериментах контрольных животных (всего использовано 7184 крысы разного возраста и пола).

Цифровые показатели пренатального развития в норме варьируют в диапазоне значений, представленных в таблице 1 и на рисунках 1-3. Зоометрические параметры на 20-й день пренатального развития, включающие массу тела, краниокаудальный размер, массу печени, почек, сердца и легких, были обобщены более чем от 1200 плодов. Обобщенные от 5000 крысят показатели постнатального развития в норме варьируют в диапазоне значений, представленных в таблице 2.

Таблица 1 – Пренатальное развитие потомства (данные от 259 беременных самок)

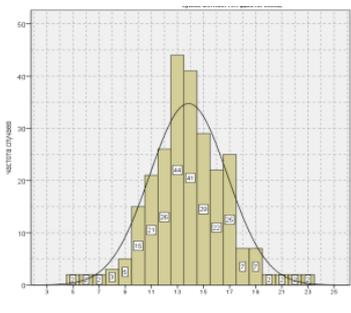
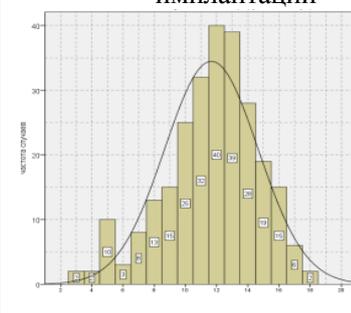
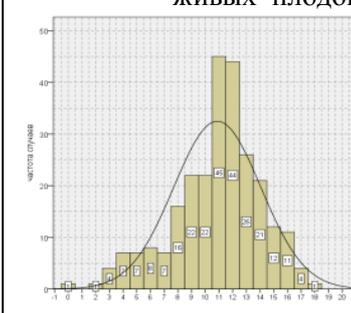
	Показатель			
	Количество желтых тел	Количество мест имплантации	Количество живых плодов	
M±m	13,85±0,19	11,66±0,19	10,92±0,19	
Min-Max	5-23	3-18	2-18	
Распределение признака	Рисунок 1 – Количество желтых тел 	Рисунок 2 – Количество мест имплантации 	Рисунок 3 – Количество живых плодов 	
		Предимплантационная гибель		Постимплантационная гибель
	Абс.	%	Абс.	%
M±m	2,19±0,17	14,69±1,08	0,79±0,08	7,07±0,77
Min-Max	0-13	0-80	0-10	0-100

Таблица 2 – Динамика массы тела и роста крысят в первый месяц жизни, N=5000

Показатель		Дни жизни					
		2	5	10	15	20	25
Масса тела, г	M±m	6,66±0,01	11,17±0,03	20,08±0,05	29,58±0,07	42,26±0,11	64,25±0,16
	Min-Max	2,6-10,0	3,2-19,8	5,5-34,5	8,6-48,9	10,7-73,5	24,4-109,5
Рост, см	M±m	5,35±0,01	6,57±0,01	8,10±0,01	9,72±0,01	11,34±0,01	13,20±0,01
	Min-Max	3,0-7,5	4,5-9,7	4,6-10,5	5,5-12,0	7,0-14,2	9,0-16,2

Диапазон колебаний показателей антиоксидантного статуса крыс представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание МДА в крови и печени крыс 20-210-го дней жизни

Показатель	День жизни					
	20-й N=103	60-й N=102	100-й N=149	150-й N=112	210-й N=116	
ГР, мкмоль/мин·г Нв	M±m	39,12±0,97	42,49±0,80	41,19±0,75	33,69±0,50	37,70±0,68
	Min-Max	21,6-63,6	25,7-61,5	18,1-73,7	18,7-45,3	17,8-61,0
ГП, мкмоль/мин·г Нв	M±m	70,32±1,30	64,62±0,93	66,56±0,81	53,77±0,55	62,16±0,86
	Min-Max	51,3-108,0	43,4-87,7	46,5-94,6	40,9-72,2	46,7-88,4
СОД, ЕД/мин·г Нв	M±m	2672±31	1957±21	1815±17	1747±14	1925±20
	Min-Max	2076-3443	1587-2893	1262-2407	1443-2678	1571-2578
КАТ, ммоль/мин·г Нв	M±m	613,0±12,0	521,3±10,7	541,8±7,5	520,5±8,3	529,3±8,7
	Min-Max	394-942	279-816	310-814	330-725	250-751
МДА в эритроцитах, нмоль/мл	M±m	38,16±1,38	4,715±0,140	4,850±0,141	5,264±0,108	4,866±0,129
	Min-Max	12,81-72,70	2,712-9,492	2,020-8,597	2,712-8,886	2,020-9,463
МДА в сыворотке, нмоль/мл	M±m	6,414±0,078	6,402±0,100	5,614±0,118	6,708±0,108	6,288±0,128
	Min-Max	3,08-9,81	4,62-9,62	2,12-9,81	4,33-10,96	2,50-9,33
МДА в печени, нмоль/г	M±m	545,7±15,2	404,6±11,8	409,6±9,8	415,5±7,8	400,3±9,8
	Min-Max	292-999	214-731	230-855	277-795	228-691

Определены диапазоны колебаний массы внутренних органов у самцов 20-го, 60-го, 100-го, 150-го и 210-го дней жизни, у беременных самок (на 20-й день беременности), а также диапазоны колебаний биохимических показателей сыворотки крови у самцов 60-го, 100-го, 150-го и 210-го дней жизни, характеризующих белковый, углеводный и липидный обмены, активность ферментов, содержание макро- и микроэлементов на разных этапах онтогенеза.

Таким образом, установлены интервалы нормальных значений (физиологических колебаний) для каждого из изученных показателей и сформирована база данных, использованная в качестве "интегрированного контроля" при анализе результатов более поздних исследований. Полученные результаты согласуются с данными литературы, уточняя диапазоны вариабельности этих показателей у крыс.

2 Оптимизация состава экспериментальных рационов для крыс

Проведены два эксперимента, в первом из которых было проанализировано влияние рационов ПКР и АIN-93 на рост и развитие крыс. Эксперимент проводили на самцах с исходной массой тела 90-110 г. Крысы были произвольно разделены на 2 группы (по 30 особей в каждой): животные 1-й группы получали рацион ПКР – "ПКР-группа", 2-й группы – рацион АIN-93, "АIN-группа". Отбор материала для исследований проводили на 90-й день эксперимента (Тышко Н.В. и др. Сравнительная характеристика влияния экспериментальных рационов на рост и развитие крыс. Вопр. пит. 2011. Т. 80. № 5. С. 30-38).

После изучения динамики массы тела, массы внутренних органов, массы белого жира в брыжеечном, забрюшинном, подкожнопаховом, эпидидимальном жировых депо, у животных, получавших АIN-93, отмечена устойчивая тенденция к повышенному отложению жира, суммарная масса которого у крыс этой группы была на 23% ($p < 0,05$) выше, чем у крыс, получавших ПКР. Значения гематологических и биохимических показателей варьировали в пределах нормы.

На основании результатов сравнительной оценки рационов ПКР и АIN-93 был сделан вывод об отсутствии биологически значимых систематических изменений изученных показателей, следовательно, в условиях длительных экспериментов и потребления корма *ad libitum* допустимо использование каждого из этих рационов. В то же время, принимая во внимание необходимость совершенствования методологии экспериментальных исследований, а также новые систематизированные сведения о биодоступности, физико-химических и технологических свойствах витаминных и солевых смесей, была пересмотрена формула ПКР,

используемого в ФГБУН "ФИЦ питания и биотехнологии", и предложена оптимизированная формула рациона, включающая элементы ПКР и AIN-93, который был рекомендован для использования в исследованиях *in vivo* как наиболее современный, гармонизированный с международными подходами и соответствующий физиологическим потребностям крыс.

Последующий опыт использования оптимизированного ПКР показал, что все крысы, получавшие этот рацион, также сохраняли тенденцию к повышенному отложению жира, кроме того, исследования репродуктивной функции выявили снижение эффективности спаривания у животных с 75-85% до 55-65%. На основании проведенного сравнительного анализа витаминно-минеральной смесей, используемых в ПКР и оптимизированном ПКР, состав витаминно-минерального комплекса которого аналогичен AIN-93, было сделано предположение о ведущей роли солей лития в формировании выявленных изменений.

Для уточнения этого положения был проведен второй эксперимент длительностью 120 дней, в котором изучали рост, развитие и фертильность крыс, получавших рационы, содержащие или не содержащие в составе соли лития. Исходная масса тела крыс составляла 90-110 г, животные были произвольно разделены на 2 группы (по 20 самцов и 20 самок в каждой группе): крысы контрольной группы (К-группа) получали оптимизированный ПКР, крысы опытной группы получали аналогичный рацион, не содержащий хлорид лития (Tyshko N.V. Mineral mix diet composition for reprotoxicological experiments *in vivo*: Lithium salt. Toxicol. Lett. 2018. Vol. 295, Suppl. 1. P. 164).

На протяжении эксперимента общее состояние животных было удовлетворительным, по внешнему виду и динамике массы тела животные контрольной и опытной групп не имели различий. Средняя относительная масса селезенки и забрюшинного жира у крыс опытной группы, получавших рацион без лития, была ниже, чем у крыс контрольной группы: масса селезенки – на 68%, масса забрюшинного жира – на 17%, соответственно (таблица 4).

Таблица 4 – Масса внутренних органов крыс

Масса внутренних органов	Контрольная группа рацион содержит литий	Опытная группа рацион не содержит литий
Селезенка	Абс. ¹	2,646±0,126
	Отн. ²	0,554±0,033
Забрюшинный жир	Абс.	14,59±0,24
	Отн.	3,042±0,003

Здесь и в таблице 5: ¹ Абсолютная масса внутренних органов, М±m, г

² Относительная масса внутренних органов, М±m, г /100 г массы тела

* отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$

Концентрация гемоглобина, среднее содержание эритроцитов и гематокрит, а также среднее содержание тромбоцитов и тромбоциты у крыс опытной группы были выше, чем у контрольных животных на 13%, 18%, 12%, 27% и 19%, соответственно. Средний объем эритроцитов и среднее содержание гемоглобина в эритроците, средний объем тромбоцитов, а также среднее содержание лейкоцитов в крови крыс опытной группы были, соответственно, на 5% и 4%; 6%; 33% ниже, чем у животных контрольной группы.

Анализ выявленных различий позволяет с высокой степенью достоверности связать их с определенными физиолого-биохимическими процессами: так, следствием увеличения концентрации эритроцитов в крови крыс опытной группы, а также увеличения гематокрита, может являться более высокое потребление кислорода на единицу массы тела при условии одинаковой O_2 -связывающей способности эритроцитов и O_2 -усвояющей способности тканей (Scott A.F. et al. The molecular basis of hemoglobin. Hum. Genet. 1981. Vol. 33. P. 129-133). Уменьшение относительной массы забрюшинного жира у крыс опытной группы по сравнению с животными контрольной группы свидетельствует об относительном снижении анаболических процессов у животных опытной группы, главным образом липогенеза в адипоцитах, а также снижением самого адипогенеза (Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of

lipogenesis. EMBO Reports. 2001. Vol. 2. P.282-286; Жминченко В.М. Гаппаров М.М.Г. Современные тенденции исследований в нутрициологии и гигиене питания. Вопр.пит. 2015. Т. 84. №1. С. 4-15).

Исследования фертильности самок контрольной и опытной групп продемонстрировало отсутствие достоверных различий: из 20 ссаженных с самцами самок каждой группы, беременность и роды зарегистрированы у 9 самок контрольной группы и у 11 самок опытной группы. В рамках данного эксперимента не было подтверждено влияние соли лития в составе рациона на фертильность самок, однако в дальнейшем было проведено сравнение фертильности крыс контрольных групп, использованных в восьми различных экспериментах: в четырех экспериментах животные получали рационы с включением солей лития, в других четырех экспериментах была использована безлитиевая солевая смесь. Показано, что при получении рационов с литием из 264 ссаженных самок забеременели 194, то есть фертильность составляла 74%, а показатель потенциальной фертильности, учитывающий самок, ссаженных с бесплодным самцом, составлял 83%; тогда как в условиях безлитиевых рационов из 256 ссаженных самок забеременели 221, фертильность составляла 86%, а потенциальная фертильность – 90%. Полученные данные свидетельствуют о стабильной тенденции к повышению фертильности крыс в условиях безлитиевых рационов.

Таким образом, изменение содержания лития в составе рационов может рассматриваться в качестве алиментарного регулятора интенсивности метаболических процессов, и, следовательно, необходимость его использования следует дифференцировать в зависимости от задач эксперимента. Так, добавление лития в рацион обоснованно в модельных экспериментах для изучения ожирения, метаболического синдрома, дислипидемии, и нецелесообразно – в токсикологических исследованиях, при изучении репродуктивной функции и оценке влияния алиментарных факторов.

3 Изучение репродуктивной функции и развития потомства крыс

3.1 Изучение влияния фактора сезонности на репродуктивную функцию крыс, пренатальное и постнатальное развитие потомства

Для отработки модели изучения репродуктивной токсичности были проведены предварительные исследования репродуктивной функции крыс в осенне-зимний, весенний и летний периоды. Изучение влияния фактора сезонности проведено в три этапа: в период с ноября по январь – "1-я группа", с марта по май – "2-я группа", с июня по июль – "3-я группа". Всего в работе было использовано 280 взрослых животных (200 самок и 80 самцов), 890 крысят и 342 плода (Утембаева Н.Т. и др. Разработка методических подходов к изучению влияния фактора сезонности на репродуктивную функцию крыс в экспериментальных исследованиях при алиментарных воздействиях. Вопр. пит. 2009. Т.78. №1. С. 43-48).

Беременность у крыс всех групп протекала без особенностей, прирост массы тела за период беременности во всех группах составлял 28-29% от исходной массы тела. Содержание половых гормонов в сыворотке крови на 20-й день беременности у самок всех групп находилось в пределах нормы. Изучение пренатального развития потомства не выявило значимых различий между группами, все показатели находились в пределах физиологических колебаний, характерных для крыс. Общее количество живых плодов в 1-й, 2-й и 3-й группах составляло 109, 120 и 113, среднее количество живых плодов в помете – $10,9 \pm 0,7$, $12,0 \pm 0,5$ и $10,3 \pm 0,8$, соответственно. При исследовании зоометрических параметров отмечено, что масса тела и краниокаудальный размер плодов 1-й группы были несколько ниже, чем у 2-й и 3-й групп – на 20 и 9%, 11 и 6%, соответственно (таблица 5). При этом масса и краниокаудальный размер плодов 3-й группы были ниже, чем у 2-й группы – на 9 и 4%, соответственно. Масса внутренних органов у плодов 1-й и 3-й групп была ниже, чем у плодов 2-й группы, однако все значения находились в пределах нормы согласно данным собственных исследований.

Таблица 5 – Сезонные характеристики зоометрических показателей и массы внутренних органов плодов на 20-й день пренатального развития

Показатели, М±m	1-я группа (осень-зима) N=49	2-я группа (весна) N=50	3-я группа (лето) N=55	Интегрированный контроль*	
Масса тела, г	4,210±0,069	5,040±0,083 ¹	4,604±0,063 ^{1,2}	1,51-6,12	
Краниокаудальный размер, см	4,059±0,055	4,490±0,043 ¹	4,300±0,033 ^{1,2}	2,4-5,1	
Масса печени	абс., г	0,244±0,006	0,275±0,013 ¹	0,256±0,007	0,058-0,648
	отн., г/100г	5,877±0,175	5,377±0,203	5,589±0,138	2,08-13,68
Масса почек	абс., г	0,018±0,001	0,037±0,002 ¹	0,027±0,001 ^{1,2}	0,006-0,098
	отн., г/100г	0,431±0,026	0,729±0,042 ¹	0,587±0,029 ^{1,2}	0,227-2,538
Масса сердца	абс., г	0,023±0,003	0,029±0,001	0,027±0,001	0,005-0,050
	отн., г/100г	0,547±0,071	0,569±0,023	0,591±0,020	0,184-1,598
Масса легких	абс., г	0,118±0,003	0,132±0,005 ¹	0,113±0,003 ²	0,020-0,213
	отн., г/100г	2,831±0,077	2,607±0,079	2,486±0,061 ¹	0,761-5,789

* По данным собственных исследований

Здесь и в таблице 7: ¹ отличия от группы-1 достоверны; ² отличия от группы-2 достоверны

При изучении постнатального развития отмечено снижение выживаемости потомства крыс 1-й группы по сравнению со 2-й и 3-й группами в период с 6-го по 25-й дни жизни, при этом выживаемость потомства с 1 по 5-й дни жизни не имела значимых различий между группами (таблица 6) и не выходила за пределы физиологических колебаний, характерных для крыс (Schneiderei M. Study of fetal organ growth in Wistar rats from day 17 to 21. Lab. Anim. 1985. Vol. 19. P. 240-244; Ema M. et al. Embryo lethality and teratogenicity of butyl benzyl phthalate in rats. J. Appl. Toxicol. 1992. Vol. 12(3). P. 179-183; Noda T. Maternal and fetal toxicity of dimethyltin in rats. J. of Health Science. 2001. Vol. 47(6). P. 544-551; Ohi M. et al. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. Toxicol. Lett. 2004. Vol. 146. P. 121-127; Ganiger S. et al. A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats. Food and Chem. Toxicol. 2007. Vol. 45. P. 64-69; Marty M.S. et al. Inter-laboratory control data for reproductive endpoints required in the OPPTS 870.3800/OECD 416 reproduction and fertility test. Brit. Defects Res. (Part B). 2009. Vol. 86. P. 470-489). Анализ физического развития потомства – сроков отлипания ушных раковин, появления волосяного покрова, прорезывания резцов и др., а также динамики зоометрических параметров не выявил каких-либо отклонений от нормы во всех изученных группах.

Таблица 6 – Сезонные характеристики постнатального развития крысят

Характеристика пометов	1-я группа (осень-зима)	2-я группа (весна)	3-я группа (лето)
Общее количество пометов	22	26	26
Общее количество крысят	237	300	244
Из них мертворожденных	1	0	2
Средняя величина помета (M±m)	10,77±0,60	11,54±0,60	9,76±0,78
Выживаемость с 0 по 5-й дни жизни, %	96	98	98
количество живых (исх.)/количество умерших	236/10	300/7	242/4
Выживаемость с 6-го по 25-й дни жизни, %	81	96	98
количество живых (исх.)/количество умерших	226/44	293/12	238/4

Гематологические показатели периферической крови у 20-дневных крысят-самцов всех групп находились в пределах физиологической нормы (таблица 7), различия между группами не превышали 10-13% (исключение составляло снижение числа лейкоцитов у крыс 3-й группы – на 47 и 27% по сравнению с 1-й и 2-й группами).

Таблица 7– Сезонные характеристики гематологических показателей крысят (возраст 20 дней)

Показатели	1-я группа (осень-зима) N=10	2-я группа (весна) N=10	3-я группа (лето) N=10	Диапазон нормы по*
Общее количество эритроцитов, $10^{12}/л$	4,580±0,125	4,754±0,135	4,220±0,041 ^{1,2}	4,4-9,94
Концентрация Нб, г/л	88,57±2,19	100,71±1,95 ¹	91,29±0,71 ²	86-177
Гематокрит, %	25,21±0,41	25,43±0,51	22,89±0,25 ^{1,2}	31-52
MCV, мкм ³	55,36±1,38	53,70±0,96	54,31±0,44	46-94
MCH, пг	19,31±0,74	21,19±0,39 ¹	19,23±0,21 ²	13-26
MCHC, г/л	350,0±6,6	395,1±2,3 ¹	354,6±2,2 ²	247-375
Лейкоциты, $10^9/л$	11,43±2,09	8,20±0,82	6,01±0,26 ^{1,2}	1,4-34,3
Тромбоциты, $10^9/л$	743,7±26,7	651,0±40,0	723,7±17,3	409-1250

*(Мустафина О.К. и др. Гематологические показатели у крыс Вистар разного возраста, содержащихся на полусинтетическом полноценном виварном рационе. Вопр. пит. 2013. Т. 82. № 2. С. 10-16; Lewi P.J., Marsboom R.P. Toxicology reference data – Wistar rat. Elsevier/North-Holland biochemical Press, 1981. 358 p.; Suckow M.A. et al. The Laboratory Rat. Burlington: Elsevier Academic Press. 2006. 912 p.)

Таким образом, при изучении репродуктивной функции и развития потомства крыс не выявлено корреляции с сезонными факторами. Значения всех изученных показателей не выходили за пределы физиологической нормы, и не формировали явно прослеживаемых тенденций. Потомство, рожденное в осенне-зимний период, характеризовалось некоторым снижением выживаемости с 6-го по 25-й дни жизни, однако анализ результатов динамического наблюдения за развитием потомства в первый месяц жизни не выявил значимых различий между группами.

3.2 Выявление наиболее чувствительных показателей репродуктивной функции крыс в условиях токсического воздействия

Эксперимент длительностью 148 дней проводили на крысах линии Вистар. Всего в работе было использовано 280 взрослых животных (200 самок и 80 самцов с исходной массой ~240 г), 942 крысенок и 486 плодов. Животные были произвольно разделены на 4 группы – 1 контрольную и 3 опытных, по 50 самок и 20 самцов в каждой. На протяжении всего срока эксперимента (за исключением периода ссаживания и беременности) крысы всех групп получали ПКР. Животные опытных групп в период ссаживания и беременности подвергались отдельному и сочетанному воздействию алиментарного и токсического факторов: крысы 1-й опытной группы получали рацион с дефицитом пантотената кальция, 2-й – получали с питьевой водой $CdSO_4 \times 8/3H_2O$ (из расчета 10 мг Cd^{2+} на 1 кг массы тела), 3-й – 10 мг/кг Cd^{2+} на фоне рациона с дефицитом пантотената кальция. Репродуктивную функцию оценивали по фертильности родительских животных (F_0), пре- и постнатальному развитию потомства (F_1) (Тышко Н.В. и др. Оценка репродуктивной функции крыс при отдельном и сочетанном воздействии алиментарного и токсического факторов. Вопр. пит. 2012. Т. 81. № 1. С. 33-43).

Общее состояние животных F_0 было удовлетворительным, эффективность спаривания во всех группах соответствовала оптимальному уровню при данных условиях эксперимента: у самок этот показатель составлял 80-83%; у самцов контрольной, 1-й и 3-й опытной групп – 100%, 2-й опытной группы – 93%. Пренатальное развитие потомства в контрольной и опытных группах не имело достоверных различий: количество желтых тел и мест имплантации,

количество резорбций, находились в пределах нормы. Среднее количество живых плодов в пометах контрольной, 1-й, 2-й и 3-й опытных групп составляло $10,6 \pm 0,6$, $11,3 \pm 1,2$, $11,9 \pm 0,6$ и $11,3 \pm 0,8$; предимплантационная гибель – $14,7 \pm 5,2\%$, $18,0 \pm 6,1\%$, $12,3 \pm 3,9\%$ и $14,6 \pm 3,2\%$; постимплантационная гибель – $5,9 \pm 2,4\%$, $5,50 \pm 2,4\%$, $5,2 \pm 2,0\%$ и $9,4 \pm 2,8\%$, соответственно. При обследовании плодов по методу Wilson и Dawson аномалий развития внутренних органов и скелета не выявлено.

Постнатальное развитие потомства характеризовалось высокой выживаемостью во всех группах: в период с 0 по 5-й дни жизни выживаемость составляла 94-99%, в период с 6-го по 25-й дни жизни – 98-99%. При расчете выживаемости не учитывали пометы, уничтоженные материнскими животными 1-й и 3-й опытных групп, всего было уничтожено 3 (13%) и 7 (32%) пометов, соответственно (таблица 8). Высокий уровень каннибализма в этих группах, по-видимому, обусловлен физиологической необходимостью восполнения дефицита пантотената кальция, достигшей критического уровня в конце беременности. Несмотря на то, что у крыс каннибализм является существенным популяционным механизмом саморегуляции (Арутюнян Л.С., Дулицкий А.И. Каннибализм и генеративная активность – ключевые популяционные адаптации серой крысы (*Rattus Norvegicus Berk*) по использованию пищевого ресурса во время сезонных пессимумов. Ученые записки ТНУ. 2004. Т.17. № 56. С. 192-197), в данном случае не было оснований полагать, что самки целенаправленно элиминировали нездоровое потомство: отсутствие аномалий развития и показатели выживаемости во всех группах свидетельствовали о высоком жизненном потенциале крысят.

Средняя величина пометов у крыс опытных групп соответствовала нижней границе нормы для данного показателя у крыс линии Вистар, однако была несколько ниже, чем у крыс контрольной группы: 1-й и 3-й опытных групп – на 17% ($p < 0,05$), 2-й опытной группы – на 10% ($p > 0,05$). Поскольку расчет средней величины помета производился без учета мертворожденных крысят, полученные результаты обусловлены не сниженной плодовитостью самок F_0 , а высоким количеством мертворожденных в опытных группах.

Таблица 8 – Постнатальное развитие потомства

Показатели	Группа				
	Контрольная	1-я Опытная	2-я Опытная	3-я Опытная	
Общее количество забеременевших самок	25	25	24	24	
Общее количество родивших самок	25	24	24	22	
Смертность, связанная с родами (количество умерших самок)	1 ^{а)}	1 ^{а)}	0	2 ^{а)}	
Общее количество пометов, уничтоженных материнским животным в 1-й день жизни	0	1 ^{б)}	0	4 ^{б)}	
Общее количество пометов, уничтоженных материнским животным во 2-10-й дни жизни / количество крысят	0	2 помета / 10 крысят	0	3 помета / 22 крысенка	
Общее количество крысят	279	236	244	183	
Из них мертворожденных	0	23	3	8	
Средняя величина помета	M±m	$11,16 \pm 0,34$	$9,26 \pm 0,61^*$	$10,04 \pm 0,59$	$9,21 \pm 0,70^*$
	Min-Max	8-14	4-13	2-13	1-14

* отличие от контроля достоверны при $p < 0,05$

а) гибель самок связана с эклампсией (контрольная группа), недостаточностью родовой деятельности (1-я и 3-я опытные группы), воспаления матки (3-я опытная группа). Пометы от этих самок не учитывали при расчете выживаемости.

б) самки уничтожили потомство в течение первых суток после родов, количество крысят неизвестно, эти пометы не учитывали при подсчете общего количества крысят и выживаемости

Комплексная оценка потомства F_1 в течение первого месяца жизни выявила значительное отставание развития крысят опытных групп от контрольных животных по всем морфо-функциональным показателям (таблица 9). В период 2-10 дней жизни масса тела потомства в 1-й и 3-й опытных группах была более чем на 20% ($p<0,05$) ниже, чем в контрольной группе, в период 15-25 дней жизни – более чем на 13% ($p<0,05$), краниокаудальный размер – на 10 и 6% ($p<0,05$), соответственно. Во 2-й опытной группе отличия от контроля были менее выражены: отставание массы тела за весь период наблюдения не превышало 5-9% ($p<0,05$), краниокаудального размера – 2-4% ($p<0,05$). Задержка физического развития (сроков отлипания ушных раковин, прорезывания резцов, открытия глаз и др.) у крысят 1-й и 3-й опытных групп в среднем составляла 1,5-2 дня, 2-й опытной группы – 1 день ($p<0,05$).

Таблица 9 – Динамика массы тела и роста крысят

Показатель		Дни жизни					
		2	5	10	15	20	25
Масса тела, г	Контрольная	6,58±0,05	10,65±0,10	19,55±0,15	29,04±0,19	42,15±0,29	61,67±0,42
	1-я опытная	4,81±0,06*	7,63±0,13*	15,29±0,24*	24,69±0,28*	35,91±0,43*	53,61±0,59*
	2-я опытная	6,23±0,05*	9,87±0,10*	18,18±0,16*	26,54±0,21*	38,94±0,33*	58,05±0,46*
	3-я опытная	4,81±0,06*	7,39±0,14*	15,06±0,30*	24,23±0,37*	35,67±0,60*	53,62±0,75*
Рост, см	Контрольная	5,21±0,02	6,27±0,02	7,88±0,03	9,26±0,03	10,76±0,03	12,24±0,03
	1-я опытная	4,66±0,02*	5,61±0,03*	7,10±0,04*	8,77±0,04*	10,24±0,04*	11,73±0,04*
	2-я опытная	5,12±0,02*	6,12±0,03*	7,58±0,03*	9,06±0,03*	10,52±0,04*	11,98±0,03*
	3-я опытная	4,71±0,02*	5,53±0,04*	7,03±0,05*	8,67±0,05*	10,04±0,06*	11,69±0,06*

Представлены средние данные $M\pm m$; N = все крысята

* отличия от контроля достоверны при $p<0,05$

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что раздельное и сочетанное действие алиментарного и токсического факторов в период ссаживания и беременности не оказывало влияния на фертильность и плодовитость крыс, пред- и постимплантационную гибель, выживаемость потомства, а также не вызывало развития аномалий скелета и внутренних органов. Вместе с тем, в пренатальном периоде онтогенеза действие этих факторов проявлялось снижением массы тела и роста плодов, в постнатальном – отставанием развития крысят, а также увеличением числа мертворожденных в потомстве. Выявленные изменения были наиболее выражены у животных 3-й опытной группы, в меньшей степени – у животных 1-й и 2-й опытных групп.

Таким образом, использованная экспериментальная модель позволила выявить наиболее чувствительные показатели, свидетельствующие о репродуктивной токсичности исследуемого объекта: это морфо-функциональные критерии постнатального онтогенеза потомства (динамика зоометрических показателей, физическое развитие), применяемые при оценке репродуктивной функции, а также повышенная готовность материнских животных уничтожать новорожденное потомство (до 30% от всех пометов).

3.3 Изучение репродуктивной функции и развития потомства в поколениях

Исследования выполнены на трех поколениях крыс: родительском (F_0), первом (F_1) и втором (F_2). Всего в работе было использовано 695 взрослых животных, 2237 крысят, 975 плодов. Эксперимент проведен на четырех группах животных, получавших с рационом традиционные сорта кукурузы: три российских сорта – "РОСС 144 МВ", "РОСС 197 МВ", "Докучаевская 250 МВ" и американский сорт "HE/89" – 1-я, 2-я, 3-я и 4-я группы, соответственно. Исследования с использованием традиционных сортов выполнены для определения референсных значений показателей функции репродуктивной системы у крыс,

получавших с рационом агравируемые количества кукурузы, в условиях вивария ФГБУН "ФИЦ питания и биотехнологии" (Тышко Н.В. и др. Оценка влияния ГМО растительного происхождения на развитие потомства крыс в трех поколениях. Вопр.пит. 2011. Т. 80. № 1. С. 14-28).

Эффективность спаривания у самок всех групп поколения F0 составляла 79-97%, поколения F1 – 83-87%, у самцов – 89-100% и 93-100%, соответственно, и не выходила за границы ожидаемых значений (Mandl A.M. The Phases of the oestrous cycle in the adult white rat. J. Experim. Biol. 1951. Vol. 28. P. 576-584; Marty M.S. et al. Inter-laboratory control data for reproductive endpoints required in the OPPTS 870.3800/OECD 416 reproduction and fertility test. Brit. Defects Res. (Part B). 2009. Vol. 86. P. 470-489). При сравнении пренатального развития потомства F1-F2 в 1-4-й группах (таблица 10) не было выявлено значимых различий, все изученные показатели находились в пределах физиологических колебаний, характерных для крыс, и имели достаточно широкий диапазон значений.

Таблица 10 – Пренатальное развитие потомства F1, F2

Показатели		Группа				
		1-я	2-я	3-я	4-я	
F1	Количество беременных самок F0	9	11	16	10	
	Количество желтых тел	Всего	122	147	211	127
		M±m	13,56±0,50	13,36±0,69	13,19±0,85	12,70±0,54
	Количество мест имплантации	Всего	102	132	189	120
		M±m	11,33±0,69	12,00±0,49	11,81±0,77	12,00±0,54
	Количество живых плодов F1	Всего	100	122	174	120
		M±m	11,11±0,72	11,09±0,60	10,88±0,69	12,00±0,54
	Количество резорбций	Всего	2	10	11	0
		M±m	0,22±0,15	0,91±0,21	0,69±0,25	-
Предимплантационная гибель, %		15,9±4,9	9,3±2,5	8,9±3,7	5,5±1,3	
Постимплантационная гибель, %		2,3±1,7	7,9±1,9	7,3±2,1	0	
F2	Количество беременных самок F1	11	12	12	11	
	Количество желтых тел	Всего	142	149	126	124
		M±m	12,91±1,01	12,42±0,75	10,50±0,98	11,18±0,55
	Количество мест имплантации	Всего	125	146	106	114
		M±m	11,36±1,25	12,17±0,77	8,83±0,98	10,27±0,81
	Количество живых плодов F2	Всего	116	134	96	113
		M±m	10,55±1,26	11,17±0,81	8,00±0,94	10,27±0,81
	Количество резорбций	Всего	9	12	10	1
		M±m	0,82±0,38	1,00±0,33	0,83±0,24	0,09±0,09
Предимплантационная гибель, %		12,7±5,7	2,2±1,2	14,4±5,5	8,7±4,7	
Постимплантационная гибель, %		8,5±4,1	8,3±2,5	9,9±3,7	0,8±0,8	

Постнатальное развитие потомства во всех группах характеризовалось высокой выживаемостью в поколениях F1 и F2: в период с 1 по 5-й дни жизни выживаемость потомства F1 составляла 98-99%, в период с 6-го по 25-й дни жизни – 96-100%, в поколении F2 – 98-99 и 95-98%, соответственно. Согласно данным (Там же), линия Вистар в целом характеризуется относительной вариабельностью ряда показателей репродуктивной функции, в том числе – выживаемость потомства в первый месяц жизни может составлять не более 68%, поэтому 95-99 %-ная выживаемость потомства соответствовала оптимальному уровню для крыс данной линии. Средняя величина пометов находилась в пределах физиологических значений, достоверных различий между группами не выявлено (таблица 11). Соотношение самцов и самок в группах несколько различалось в каждом поколении, однако отмеченные колебания не имели определенной тенденции и не выходили за пределы значений, характерных для данной

линии крыс. Анализ физического развития потомства F1-F2 – сроков отлипания ушных раковин, появления волосяного покрова, прорезывания резцов и др., а также динамики массы тела (таблица 12) и роста крысят, не выявил каких-либо отклонений от нормы.

Таблица 11 – Постнатальное развитие потомства F1, F2

Показатели		Группа			
		1-я	2-я	3-я	4-я
F1	Общее количество крысят	328	265	267	300
	Из них мертворожденных	4	3	0	0
	Средняя величина помета (M±m)	11,17±0,70	10,08±0,50	11,13±0,75	11,54±0,60
	Соотношение ♂/♀ в помете, %	46/54	50/50	48/52	52/48
F2	Общее количество крысят	281	286	278	244
	Из них мертворожденных	1	1	1	2
	Средняя величина помета (M±m)	12,17±0,61	11,40±0,69	11,54±0,76	9,68±0,77
	Соотношение ♂/♀ в помете, %	52/48	53/47	50/50	51/49

Таблица 12 – Динамика массы тела и роста крысят поколений F1-F2

Показатель Группа		Дни жизни						
		2	5	10	15	20	25	
Масса тела, г	1-я	F1	6,52±0,05	12,01±0,15	21,43±0,21	30,48±0,38	43,59±0,60	66,33±0,97
		F2	6,48±0,05	11,59±0,10	20,97±0,21	30,10±0,32	43,78±0,51	64,67±0,73
	2-я	F1	6,59±0,05	12,07±0,11	21,94±0,18	32,46±0,24	46,58±0,38	71,69±0,55
		F2	6,87±0,05	12,17±0,12	22,30±0,22	30,91±0,32	44,33±0,47	66,95±0,67
	3-я	F1	6,28±0,05	10,95±0,11	19,66±0,21	29,01±0,29	41,95±0,46	63,69±0,71
		F2	6,80±0,05	11,71±0,14	21,27±0,22	29,35±0,34	42,88±0,54	64,58±0,75
	4-я	F1	6,77±0,05	11,41±0,10	19,24±0,20	27,40±0,26	38,14±0,43	60,28±0,64
		F2	6,62±0,05	12,25±0,12	21,96±0,23	31,99±0,49	46,67±0,49	71,11±0,74

Представлены средние данные M±m; N = все крысята

Таким образом, сравнительный анализ данных от двух поколений животных, не выявил существенных различий между группами, что свидетельствует об отсутствии влияния на крыс каждого из референсных сортов кукурузы. Поскольку целью данного эксперимента было определение вариабельности показателей репродуктивной функции, его результаты были приняты в качестве референсного контроля и использованы при изучении репродуктивной токсичности ГМ кукурузы Либерти Линк® на трех поколениях крыс.

4 Разработка моделей снижения адаптационного потенциала с использованием токсических и алиментарных факторов

4.1 Разработка модифицированного состава рационов для снижения адаптационного потенциала крыс

Одним из наиболее простых и эффективных способов снижения адаптационного потенциала является модификация состава рациона по содержанию витаминов и минеральных веществ (Голиков С.Н. и др. Общие механизмы токсического действия. М.: Медицина, 1986. 280 с.; Сидорова Ю.С. и др. Влияние витаминной обеспеченности на протекание общего адаптационного синдрома у растущих крыс. Вопр. пит. 2014. Т. 83. № 5. С. 20-25; Коденцова В.М. и др. Микроэлементный и антиоксидантный статус крыс при полигиповитаминозе. Вопр. биол., мед. и фарм. химии. 2013. Т. 11. № 2. С. 64-68).

Для целей данного исследования была выбрана модель дефицита витаминов группы В – тиамин (В1), рибофлавин (В2), никотиновой кислоты (В3), пиридоксин (В6), и минеральных

веществ – железа (Fe^{3+}) и магния (Mg^{2+}), биологическая роль которых детерминирует состояние адаптационного потенциала (Human vitamin and mineral requirements / Report of a joint FAO/WHO expert consultation, 2004; Коденцова В.М. Витамины. М.: МИА, 2015. 408 с.).

Определение маргинальных уровней этих эссенциальных веществ в рационе, обеспечивающих, с одной стороны, физиологические потребности экспериментальных животных, с другой стороны, снижающих адаптационный потенциал, и, как следствие, повышающих чувствительность к токсическому воздействию, являлось целью данного исследования (Тышко Н.В. и др. Модификация витаминно-минерального состава рационов как модель снижения адаптационного потенциала крыс для токсикологических исследований. *Вопр. пит.* 2016. Т. 85. № 6. С. 64-71).

Были проведены две серии экспериментов продолжительностью 70 дней каждая на самках и самцах крыс (исходный возраст ~30 дней). В 1-й серии, направленной на определение интервалов максимального, среднего и минимально возможного содержания эссенциальных веществ в рационе, были использованы пять групп животных, получавших рационы с 100%, 75%, 50%, 25% и 0% содержанием витаминов В1, В2, В3, В6, а также Fe^{3+} и Mg^{2+} (1-5-я группы); во 2-й серии, предназначенной для выявления диапазона минимально возможного содержания этих веществ, обеспечивающего наименьший уровень адаптационного потенциала и не вызывающего развития патологии, – четыре группы животных, получавших рационы с 21,37%, 9,94%, 4,62%, 2,15% содержанием этих компонентов (6-9-я группы), соответственно. Экспериментальные рационы (оптимизированный ПКР) с модифицированным витаминно-минеральным составом крысы получали на протяжении всего срока исследований. Всего в экспериментах было использовано 220 самок и 220 самцов (100♂+100♀ в 1-й серии, 120♂+120♀ во 2-й серии).

В течение первых трех недель эксперимента динамика массы тела самцов 1-4-й групп не имела статистически значимых различий, начиная с 28-го дня масса тела самцов 1-2-й групп была достоверно выше (на 6-8%), чем у крыс 3-4-й групп. Масса тела самок 1-4-й групп не имела значимых различий на протяжении всего эксперимента. Общее состояние крыс 5-й группы было неудовлетворительным, отмечены ухудшение качества шерстного покрова (облысения), склонность к кровотечениям (слизистые оболочки носа и глаз). Начиная с 35-го дня эксперимента зафиксированы случаи гибели животных 5-й группы (к 56-му дню эксперимента смертность самцов составляла 25%, самок – 30%). При проведении постмортальной некропсии зафиксированы патологические изменения, характерные для кахексии: истощение висцеральной и подкожной жировой ткани, атрофия всех групп скелетных мышц, уменьшение размеров внутренних органов и др. Масса тела самцов и самок 5-й группы была значительно ниже, чем, масса тела крыс 1-4-й групп (на 14-й день исследований на 9-14%, на 56-й день – на 62-69%, соответственно, $p < 0,05$).

При изучении массы внутренних органов, гематологических, биохимических показателей, а также показателей системы антиоксидантной защиты был отмечен ряд незначительных различий между группами, не выходящий за пределы физиологических колебаний, характерных для крыс. Не выявлено явных закономерностей изменения оцениваемых параметров в зависимости от уровней содержания витаминов и минералов в рационе, однако 4-я группа характеризовалась значительными колебаниями изученных показателей и большей нестабильностью центральной тенденции, причем у самцов она была более выражена, чем у самок.

На основании анализа данных, полученных в 1-й серии исследований следует, что уменьшение дозы соответствующих эссенциальных веществ до 25% существенно не сказывалось на значениях изученных показателей, а полное исключение этих веществ влекло за собой массовую гибель животных. Полученные данные легли в основу дизайна эксперимента 2-й серии, предназначенного для выявления диапазона минимально возможного (от 0% до 25%) содержания в рационе витаминов и минеральных веществ, не приводящего к развитию патологии и обеспечивающего наименьший уровень адаптационного потенциала.

Во 2-й серии исследований общее состояние крыс 6-й и 7-й групп было удовлетворительным, в течение первых пяти недель эксперимента динамика массы тела самцов и самок 6-й и 7-й групп не имела статистически значимых различий, начиная с 35-го дня масса

тела крыс 6-й группы была достоверно выше (самцов – на 10%, самок – на 8%), чем у крыс 7-й группы. Общее состояние крыс 8-й и 9-й групп было неудовлетворительным, отмечены ухудшение качества шерстного покрова, склонность к кровотечениям. Начиная с 45 дня эксперимента зафиксированы случаи гибели животных 8-й группы (к 56-му дню эксперимента смертность самцов составляла 30%, самок – 37%) и 9-й группы (56% и 53%, соответственно). Масса тела крыс 8-й и 9-й групп была значительно ниже, чем у животных 6-й и 7-й групп (на 21-й день исследований более чем на 5%, на 56-й день – более чем на 40%, $p < 0,05$).

Значения большинства изученных показателей не выходили за пределы физиологических колебаний, характерных для крыс, отмеченные между группами различия массы внутренних органов, гематологических, биохимических показателей были разнонаправленны и не формировали четко прослеживаемых тенденций. Активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание продуктов перекисного окисления липидов демонстрировали линейные изменения (повышения активности и концентрации) в ряду понижения содержания эссенциальных веществ в рационах, что можно расценивать как доказательство влияния состава рационов на антиоксидантный статус крыс.

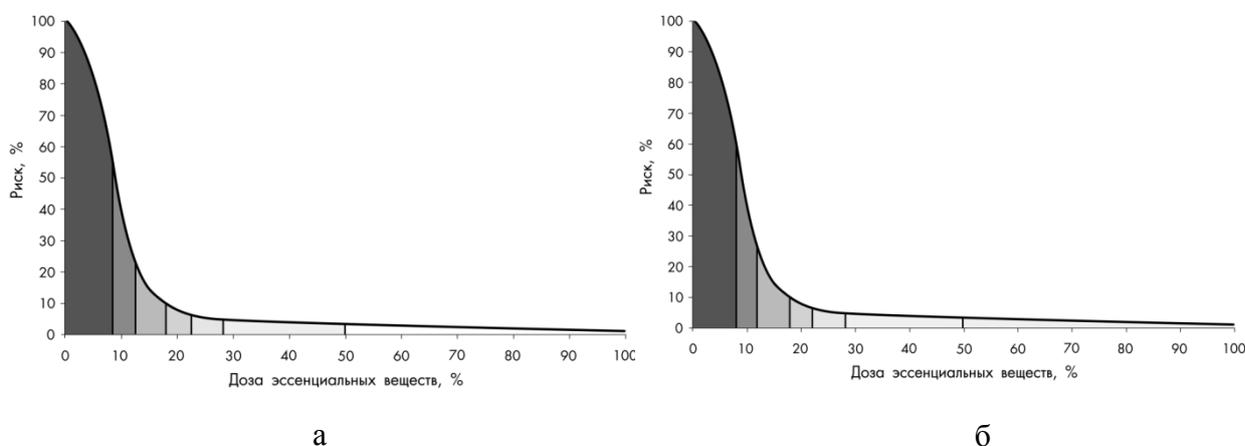


Рисунок 4 – График оценочной модели "доза-риск" для самцов (а) и самок (б)

На основании полученных результатов была сформирована графическая оценочная шкала "доза-риск" (рисунок 4), которая была использована для определения пороговых значений витаминов и минеральных веществ, обеспечивающих необходимое снижение уровня адаптационного потенциала у самцов и самок. При построении графика были заданы следующие ключевые условия: уровень риска развития патологии выше 50% принимался в случае выявления достоверных различий выживаемости животных в группах (по критерию χ^2) для данной дозы эссенциальных веществ, уровень риска от 50% до 25% – в случае выявления системных различий по ряду показателей, уровень риска менее 5% – в случае отсутствия системных различий. Анализ графиков позволил определить пороговые значения содержания в рационе витаминов группы В, железа и магния: их содержание в количестве менее 9% соответствовало уровню риска выше 50%, в количестве 9-12% – уровню риска от 50% до 25%, в количестве 13-24% – уровню риска выше 5%, в количестве выше 25% – уровню риска менее 5%. С учетом степени риска развития патологии были установлены три дозировки эссенциальных веществ, с определенной степенью условности обозначенные как "оптимальная", "маргинальная" и "субмаргинальная", обеспечивающие последовательное снижение адаптационного потенциала у лабораторных животных: 75, 30 и 19% для самцов, и 75, 28 и 18% для самок, соответственно.

Таким образом, предложенная модификация витаминно-минерального состава рационов может быть использована в качестве модели снижения адаптационного потенциала крыс в токсикологических исследованиях при изучении объектов с неизвестной токсичностью, в частности, новых видов пищевой продукции. Результаты апробации данной модели в экспериментах с заведомо действующими дозами токсикантов приведены ниже.

4.2 Апробация модели снижения адаптационного потенциала крыс в условиях интоксикации кадмием

В эксперименте длительностью 65 дней крысы (исходный возраст ~30 дней) были разделены на шесть групп – три контрольных и три опытных по 30 самцов и самок в каждой. Животные 1-й контрольной группы получали рацион с "оптимальной" (75%) дозировкой витаминов группы В, железа и магния, животные 2-й и 3-й контрольных групп – рационы с "маргинальной" (30% для самцов и 28% для самок) и "субмаргинальной" (19% для самцов и 18% для самок) дозировками этих веществ. Животные 1-3-й опытных групп получали с кормом Cd^{2+} (в виде $CdCl_2$) на фоне "оптимальной", "маргинальной" и "субмаргинальной" обеспеченности эссенциальными веществами, соответственно. На основании данных о характере проявления токсического действия в зависимости от дозы и времени экспозиции (El-Mansy A.A. et al. *Histological and immunohistochemical effects of Curcuma longa on activation of rat hepatic stellate cells after cadmium induced hepatotoxicity*. *Biotech. Histochem.* 2016. Vol. 91 (3). P. 170-181), была использована заведомо действующая доза кадмия, не вызывающая острого токсического ответа, и соответствующая 1-2 мг/кг массы тела в зависимости от возраста крыс (в пересчете на Cd^{2+}). Были изучены гематологические и биохимические показатели, антиоксидантный статус, проведены морфологические исследования внутренних органов, и др. (Тышко Н.В. и др. Изучение влияния интоксикации кадмием на модели витаминно-минеральной недостаточности у крыс. *Вопр. пит.* 2018. Т. 87. № 1. С. 63-71).

Общее состояние крыс контрольных и опытных групп было удовлетворительным, по внешнему виду, поведению и качеству шерстного покрова различий между группами не выявлено. При анализе динамики массы тела экспериментальных животных отмечено, что масса тела самцов и самок 1-3-й опытных групп была во всех случаях ниже, чем у 1-3-й контрольных групп (в диапазоне от 3 до 12% у самцов и от 1 до 9% у самок). Различия массы тела животных в контрольных группах были более выражены у самцов и составляли от 5 до 18% и менее выражены у самок и составляли от 9 до 11%.

Было отмечено, что уровень содержания железа в сыворотке крови самцов 2-й и 3-й опытных групп был ниже нормы в 2,2 и 2,5 раза соответственно и составлял $7,98 \pm 0,50$ и $6,96 \pm 0,58$ мкмоль/л, соответственно. По сравнению с аналогичными показателями 2-й ($19,33 \pm 0,96$ мкмоль/л) и 3-й ($18,75 \pm 1,13$ мкмоль/л) контрольных групп уровень железа был на 59 и 63% ($p < 0,05$) ниже. У крыс 1-й опытной группы содержание железа не выходило за пределы нормы и было недостоверно ниже контрольных значений на 13% ($22,35 \pm 2,18$ и $25,65 \pm 0,95$ мкмоль/л, соответственно). Значения данного показателя у самок 2-й и 3-й опытных групп был ниже нормы в 1,1 и 1,4 раза ($15,55 \pm 1,76$ и $12,53 \pm 1,27$ мкмоль/л). По сравнению с аналогичными показателями 2-й ($42,53 \pm 2,39$ мкмоль/л) и 3-й ($38,40 \pm 2,65$ мкмоль/л) контрольных групп уровень железа был, достоверно (на 63% и 67%) ниже. У крыс 1-й опытной группы содержание железа не выходило за пределы нормы и было достоверно ниже контрольных значений на 28% ($35,75 \pm 3,00$ и $49,33 \pm 2,29$ мкмоль/л, соответственно).

Оценка результатов гематологических исследований (таблица 13) животных 1-3-й опытных групп позволила выявить определенные закономерности изменений показателей эритроцитарного профиля, которые были на 11-44% ниже, чем соответствующие показатели животных 1-3-й контрольных групп. Общее количество эритроцитов во 2-й и 3-й группе было ниже контрольных значений на 23 и 25% у самцов и на 10 и 16% у самок, соответственно, при этом в 1-й опытной группе значение данного показателя было на ~10% выше, чем у самцов и самок контрольных групп. Средняя концентрация гемоглобина в эритроците 2-3-й опытных групп была выше на 5-6% у самцов и 1-6% у самок, а 1-й опытной группы – на 3 и 3% ниже таковой у самцов и самок соответствующих контрольных групп. Значения показателей тромбоцитарного профиля у крыс опытных групп были значительно выше, чем у крыс контрольных групп: общее количество тромбоцитов и тромбоцит – на 40-156%, средний объем тромбоцита – на 8-26%.

Таблица 13 – Гематологические показатели самцов и самок

Показатель		Группа					
		контрольная			опытная		
		1-я (75 %)	2-я (28/30 %)	3-я (18/19%)	1-я (75 %)	2-я (28/30 %)	3-я (18/19%)
Общее количество эритроцитов, $10^{12}/л$	♂	8,22±0,09	8,90±0,08	9,12±0,12	9,01±0,14*	6,88±0,19*	6,87 ±0,23*
	♀	8,20±0,10	8,61±0,12	9,01±0,12	9,06±0,13*	7,75±0,19*	7,53±0,21*
Концентрация Нб, г/л	♂	148±2	135±2	136±2	122±3*	83±2*	81 ±3*
	♀	155±2	143±1	139±2	133±3*	98±3*	95±3*
Гематокрит, %	♂	44,2±0,4	41,5±0,5	42,1±0,5	37,6±1,1*	24,3±0,8*	23,5 ±0,9*
	♀	44,9±0,5	42,1±0,4	41,4±0,7	39,7±0,8*	28,9±1,0*	26,7±1,0*
MCV, $мкм^3$	♂	53,8±0,3	46,8±0,7	45,6±0,9	41,0±0,9*	35,5±0,3*	34,5± 0,3*
	♀	54,8±0,4	48,9±0,6	45,3±0,7	43,1±0,9*	36,9±0,7*	35,2±0,3*
МСН, пг	♂	18,1±0,1	15,2±0,3	14,7±0,4	13,3±0,3*	12,1±0,1*	11,8 ±0,1*
	♀	18,9±0,1	16,4±0,4	15,3±0,3	14,5±0,4*	12,6±0,2*	12,6±0,1*
МСНС, г/л	♂	335±1	325±1	323±2	324±1*	340±4*	341 ±4*
	♀	345±1	339±1	338±1	335±2*	343±3	358±5*
Тромбоциты, $10^9/л$	♂	558±16	626±17	633±23	895±45*	1198±53*	1280±55*
	♀	574±13	614±27	668±24	805±34*	1087±60*	1115±74*
MPV, $мкм^3$	♂	6,83±0,08	7,00±0,08	6,85±0,06	7,76±0,17*	8,54±0,13*	8,66± 0,25*
	♀	6,70±0,08	6,73±0,09	6,90±0,07	7,26±0,15*	8,07±0,25*	8,65±0,23*
Тромбокрит, %	♂	0,38±0,01	0,44±0,01	0,44±0,02	0,71±0,05*	1,03±0,06*	1,12±0,08*
	♀	0,38±0,01	0,42±0,03	0,46±0,02	0,60±0,04*	0,90±0,07*	0,98±0,08*

* отличия опытной группы от соответствующей контрольной группы достоверны при $p < 0,05$

Показатели системы антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов у крыс 1-3-й опытных групп в целом проявляли линейные изменения (повышения концентрации) в ряду понижения содержания эссенциальных веществ в рационах (таблица 14). Так, у самцов 1-3-й опытных групп активность глутатионпероксидазы возрастала на 38, 71 и 100%, каталазы – на 27, 62 и 117%, супероксиддисмутазы – на 25, 68 и 82%, у самок – на 19, 63 и 69%; 9, 62 и 81%; 19, 55 и 60%, соответственно. Активность глутатионредуктазы в эритроцитах самцов и самок 1-й и 2-й опытных групп демонстрировала сходную тенденцию и была выше аналогичных показателей у крыс 1-2-й контрольных групп на 26 и 64% (у самцов) и 18 и 52% (у самок). Вопреки сложившемуся тренду, у самцов 3-й опытной группы активность глутатионредуктазы была лишь на 18% выше, чем у самцов 3-й контрольной группы, у самок разница составляла 6%.

Содержание МДА в печени крыс опытных групп также повышалось от 1-й к 3-й группе: у самцов отличия от соответствующих показателей 1-3-й контрольных групп составляли 14, 21 и 35%, у самок – 6, 11 и 25%. Содержание МДА в эритроцитах самцов 1-3-й опытных групп было выше, чем у контрольных животных на 4, 4 и 24%, у самок – на 7, 16 и 35%, соответственно. Концентрация МДА в сыворотке крови самцов и самок 1-2-й опытных групп не имели значимых отличий от контроля, животные 3-й опытной группы демонстрировали некоторое повышение этого показателя, самцы – на 16%, самки – на 14%.

Таким образом, достигнуты основные цели данного эксперимента, а именно, подтверждено снижение адаптационного потенциала и формирование у крыс гипо-, нормо- и гиперчувствительности к воздействию токсических факторов (на примере воздействия солей кадмия), также сформирован проект перечня физиолого-биохимических параметров (биомаркеров), реагирующих на токсическое воздействие, включающий показатели эритроцитарного и тромбоцитарного профиля крови, показатели системы антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов крови и печени. В последующих модельных исследованиях, которые были проведены по аналогичной схеме с четыреххлористым углеродом

в качестве токсиканта, был подтвержден перечень биомаркеров, подлежащих обязательному изучению при использовании данной модели.

Таблица 14 – Активность ферментов системы антиоксидантной защиты и содержание продуктов перекисного окисления липидов

Показатель		Группа					
		контрольная			опытная		
		1-я (75 %)	2-я (28/30 %)	3-я (18/19%)	1-я (75 %)	2-я (28/30 %)	3-я (18/19%)
ГР, мкмоль/мин·г Нб	♂	37,2±0,8	42,3±0,7	41,3±1,1	47,03±1,42*	69,2±2,3*	48,8±1,9*
	♀	32,1±0,5	34,9±0,5	35,4±1,0	37,91±1,06*	52,9±1,5*	37,6±1,3
ГП, мкмоль/мин·г Нб	♂	52,6±1,2	59,9±1,0	63,5±1,7	72,39±2,59*	102,7±3,2*	126,8±4,5*
	♀	52,2±1,0	57,4±1,1	59,1±1,5	62,34±1,88*	93,2±3,2*	99,8±2,5*
КАТ, ммоль/мин·г Нб	♂	551±13	608±15	620±15	699±20*	986±33*	1343±57*
	♀	523±13	592±13	604±11	571±17*	961±33*	1096±34*
СОД, ЕД/мин·г Нб	♂	1771±21	1976±30	2042±35	2222±60*	3320±87*	3721±150*
	♀	1807±22	1941±31	2013±39	2144±52*	3008±100*	3226±86*
МДА эритроцитов, нмоль/мл	♂	5,33±0,06	5,52±0,07	5,38±0,08	5,57±0,11	5,77±0,10*	6,66±0,10*
	♀	5,11±0,09	5,12±0,08	5,12±0,08	5,48±0,11*	5,95±0,08*	6,90±0,09*
МДА сыворотки, нмоль/мл	♂	7,71±0,11	8,14±0,12	8,47±0,16	7,74±0,11	8,09±0,09	9,86±0,14*
	♀	7,77±0,20	7,73±0,16	8,20±0,13	7,61±0,12	7,90±0,17	9,34±0,13*
МДА печени, нмоль/г	♂	324±5	324±3	327±5	370±5*	394±5*	441±5*
	♀	318±5	327±4	318±5	337±7*	363±9*	398±5*

* отличия опытной группы от соответствующей контрольной группы достоверны при $p < 0,05$

4.3 Апробация модели снижения адаптационного потенциала крыс при изучении репродуктивной токсичности в условиях интоксикации глифосатом

Исследования продолжительностью 155 дней проведены на крысах поколений F0 (176 самок и 64 самца) и F1 (684 крысенка, 265 плодов). Животные родительского поколения F0 были разделены на четыре группы: две контрольные и две опытные, по 16 самцов и 44 самки в каждой. Крысы контрольных групп получали рационы (оптимизированный ПКР) с различным содержанием витаминов В1, В2, В3, В6, солей железа и магния: 18% для самок и 19% для самцов – группа "К-18", 75% для самок и 75% для самцов – группа "К-75". Животные опытных групп ("О-18" и "О-75") на фоне аналогичных рационов получали глифосат (per os, 2,5 мг/кг массы тела ежедневно на протяжении всего периода эксперимента), для эксперимента была использована заведомо действующая доза глифосата (International Programme on Chemical Safety. Environmental health criteria 159. Glyphosate. Geneva: World Health Organization, 1994; Gill J.P.K. et al. Glyphosate toxicity for animals. Environmental Chem. Lett. 2018. Vol. 16 (2), p. 401-426). Репродуктивную функцию оценивали по фертильности, пре- и постнатальному развитию потомства.

Общее состояние животных всех групп было удовлетворительным. К 100-му дню жизни (возраст физиологической зрелости, оптимален для спаривания) отмечались статистически значимые различия массы тела крыс, получавших рационы с разной обеспеченностью витаминами и минеральными веществами: у животных контрольных групп масса тела возрастала в ряду К-19<К-75 и составляла 252,1±3,1 г и 280,1±4,8 г у самок и 333,3±6,9 г и 412,8±9,9 г у самцов; у крыс опытных групп отмечалась сходная тенденция (О-19<О-75), однако масса тела была несколько ниже, чем у соответствующих им контрольных групп и составляла 221,0±2,5 г и 259,3±2,8 г у самок и 278,4±5,5 г и 362,4±5,5 г у самцов. Различия массы тела крыс контрольной и опытной групп с оптимальной обеспеченностью эссенциальными веществами составляли у самок 7% ($p < 0,05$), у самцов 12% ($p < 0,05$), у самок и самцов с субмаргинальной обеспеченностью – 12% и 17% ($p < 0,05$), соответственно.

Эффективность спаривания самок контрольных групп составляла 81% (К-18) и 88% (К-75), самцов – 92% (К-19) и 100% (К-75); самок опытных групп – 23% (О-18) и 93% (О-75), самцов – 46% (К-19) и 100% (К-75). Анализ результатов оценки генеративной функции крыс F_0 позволил выявить определенную корреляцию эффекта от действия глифосата с обеспеченностью эссенциальными веществами: у крыс групп К-75 и О-75 не было выявлено различий между группами (эффективность спаривания соответствовала средним значениям, характерным для крыс), тогда как у крыс К-18 и О-18 отмечены значимые различия эффективности спаривания как самок, так и самцов (в опытной группе этот показатель был ниже на 35 и 36%, соответственно).

Общее состояние самок F_0 во время беременности было удовлетворительным, по внешнему виду и поведению самки контрольных и опытных групп не различались между собой, относительный прирост массы тела самок группы О-75 был несколько ниже, чем у самок К-75, относительный прирост массы тела самок, получавших рационы с субмаргинальной обеспеченностью эссенциальными веществами, был значительно ниже, чем у самок с оптимальной обеспеченностью, при этом различия между группами К-18 и О-18 были менее выражены.

Масса внутренних органов беременных самок в группе О-18 имела ряд достоверных отличий от группы К-18 (относительная масса селезенки, легких и тимуса была выше на 75, 16 и 56%, тогда как масса яичников и надпочечников – ниже на 19 и 11%, соответственно). У самок группы О-75 обнаружено достоверное повышение относительной массы надпочечников на 13% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Все значения находились в пределах физиологических колебаний, характерных для крыс линии Вистар. Обзорные макроскопические исследования внутренних органов не выявили каких-либо патологических изменений у самок всех групп.

Анализ пренатального развития потомства F_1 выявил, что по количеству желтых тел и мест имплантации самки контрольных и опытных групп не имели достоверных различий, значения этих показателей находились в пределах физиологических колебаний, характерных для крыс (таблица 15). Количество живых плодов у крыс группы О-75 было на 17% ($p > 0,05$) ниже, чем у группы К-75, но не выходило за пределы нормы, тогда как различия между группами О-18 и К-18 составляли 72% ($p < 0,05$). Снижение количества живых плодов в группе К-18 по сравнению с группой К-75 составляло 32% ($p > 0,05$). Предымплантационная гибель в обеих опытных группах была выше нормы и находилась на одном уровне, в контрольных группах отмечались некоторые различия: в группе К-18 тот показатель был несколько выше нормы и на 56% ($p > 0,05$) выше, чем в группе К-75. Постымплантационная гибель в группах К-75 и О-75 находилась на верхней границе нормы и не имела достоверных различий, средние значения этого показателя у крыс группы К-18 были на 151% ($p > 0,05$) выше, чем у группы К-75, у крыс группы О-18 – на 155% ($p < 0,05$) выше, чем в группе К-18.

Зоометрические показатели и масса внутренних органов плодов варьировали в пределах физиологической нормы, плоды группы О-75 не имели достоверных отличий от группы К-75. Плоды группы О-18 в целом не отличались от группы К-18, однако были отмечены некоторые различия кранио-каудального размера, абсолютной и относительной массы почек: значения этих показателей у плодов группы О-18 были ниже, чем у группы К-18 – на 5% ($p < 0,05$), 24% и 20% ($p < 0,05$), соответственно.

Постнатальное развитие потомства F_1 характеризовалось высокой выживаемостью в группах с 75%-ной обеспеченностью эссенциальными веществами: в период с 1-го по 5-й дни жизни выживаемость в группе К-75 составляла 98%, в группе О-75 – 99%, в период с 6-го по 25-й дни жизни – 99 и 100%, соответственно (таблица 16). Средняя величина пометов и общее количество крысят в этих группах не имели значимых различий. В группе К-18 выживаемость потомства с 1-го по 5-й дни жизни составляла 52%, в период с 6-го по 25-й дни жизни – 75%, что в целом было несколько ниже значений, характерных для крыс данной линии. Общее количество крысят, средняя величина помета в группе О-18 были на 95% и 35% ниже, чем в группе К-18. Выживаемость потомства в группе О-18 составляла 100%, все оставшиеся в живых 9 крысят выжили.

Таблица 15 – Пренатальное развитие потомства F₁

Регистрируемые показатели		Группа				Интегрированный контроль ¹
		Контроль		Опыт		
		К-18	К-75	О-18	О-75	
Количество беременных самок		8	7	5	9	-
Количество желтых тел	Всего	119	112	65	132	5-23
	M±m	14,88±0,67	16,00±0,82	13,00±1,95	14,67±0,82	
Количество мест имплантации	Всего	100	101	53	101	3-18
	M±m	12,50±0,73	14,43±0,81	10,60±2,52	11,22±1,75	
Количество живых плодов	Всего	69	89	12	95	2-18
	M±m	8,63±1,36	12,71±0,97	2,4±1,69*	10,56±1,72	
Количество резорбций	Всего	30	12	41	4	0-10
	M±m	3,75±1,36	1,71±0,61	8,20±2,85	0,44±0,34	
Количество мертвых плодов		2	0	1	0	-
Предимплантационная гибель						
%	M±m	15,23±5,39	9,74±2,72	24,77±11,74	24,11±11,21	0-80
Абс.	Всего	19	11	12	31	0-13
	M±m	2,38±0,91	1,57±0,48	2,40±0,81	3,44±1,68	
Постимплантационная гибель						
%	M±m	30,64±10,41	12,21±4,87	78,22±17,20	9,37±5,65	0-100
Абс.	Всего	32	12	41	6	0-10
	M±m	4,00±1,46	1,71±0,61	8,20±2,85	0,67±0,37	

¹ По данным собственных исследований

* выявлены достоверные различия между соответствующими контрольной и опытной группами при $p < 0,05$

Анализ физического развития потомства F₁ – сроков отлипания ушных раковин, появления волосяного покрова и др., не выявил каких-либо отклонений от нормы, достоверные различия между группами отсутствовали. Масса тела и рост крысят групп К-75 и О-75 не имели значимых различий и варьировали в диапазоне 2-4% (масса) и 2-4% (рост). Масса тела и рост крысят группы О-18 были выше, чем у крысят группы К-18 на 10-24% и 3-11%, соответственно: очевидно, малочисленность крысят в группе О-18 снизила их конкуренцию за корм, что способствовало более интенсивному росту.

Таблица 16 – Постнатальное развитие потомства F₁

Регистрируемые показатели		Группа			
		К-18	К-75	О-18	О-75
Общее количество забеременевших самок		21	23	6	24
Общее количество родивших самок		21	23	6	24
Общее количество крысят		168	252	9	255
Из них мертворожденных		17	3	0	7
Средняя величина помета	M±m	6,88±1,64	10,83±0,87	4,50±2,50	10,78±0,63
	Min-Max	2-14	3-19	2-7	3-16
Соотношение ♂/♀ в помете, %		69/31	51/49	44/46	47/53

Не выявлены достоверные различия между соответствующими контрольными и опытными группами при $p < 0,05$

Таким образом, введение глифосата на фоне сниженной обеспеченности витаминами группы В, железом и магнием приводило к значительным изменениям показателей репродуктивной функции, тогда как на фоне нормальной обеспеченности эссенциальными веществами токсическое действие глифосата не отмечалось. Полученные результаты позволяют рекомендовать данную модель модификации состава рациона для изучения репродуктивной токсичности, в частности, при оценке безопасности ГМО.

5 Изучение активности апоптоза в токсиколого-гигиенических исследованиях

5.1 Изучение активности апоптоза в онтогенезе

Целью данного исследования являлось определение активности апоптоза на 20-й, 22-й, 35-й, 50-й, 80-й, 110-й и 140-й дни онтогенеза в печени, почках и тимусе 169 самцов и 169 самок крыс методом ДНК-комет и в тимусе – методом проточной цитофлуориметрии. Рассмотренные стадии жизненного цикла характеризуются существенными физиологическими особенностями и типом питания: 20-й день онтогенеза относится к периоду завершения внутриутробного развития (20-й день беременности) и плацентарным питанием; 22-й день (2-й день постнатального развития) – к периоду новорожденности, это период грудного вскармливания, 35-й день – время перехода на смешанное кормление (вместе с грудным молоком матери крысята начинают потреблять и обычный рацион), 50-й день – время отъема крысят от материнских животных и переход на общевиварный рацион, 80-й день – период полового созревания, 110-й день – завершение полового созревания, 140-й день – полностью сформировавшийся взрослый организм (Tyshko N.V. et al. Analysis of the intensity of apoptosis in rat organs at various stages of ontogeny. Bull. of Experim.l Biol. and Med. 2018. Vol. 166 (9). P. 409-412; Трушина Э.Н. и др. Оценка активности апоптоза тимоцитов крыс линии Вистар методом проточной цитофлуориметрии на разных этапах онтогенетического развития. Вопр. пит. 2018. № 5. С. 46).

Результаты изучения активности процессов программируемой гибели в клетках тимуса методами проточной цитофлуориметрии и ДНК-комет продемонстрировали изменение индекса апоптоза и количества апоптоз-положительных клеток у крыс обоего пола в зависимости от возраста: максимальные значения показателей отмечены на 20-й день онтогенеза с последующим постепенным снижением индекса апоптоза до минимальных величин на 35-50-й день (на ~40% от максимальных значений у самцов и ~45% у самок) и апоптоз-положительных клеток – на 50-й день (на ~80% у самцов и 86% у самок), относительно плавным увеличением до умеренно высоких значений на 110-й день и значительным снижением к 140-му дню онтогенеза (рисунок 5).

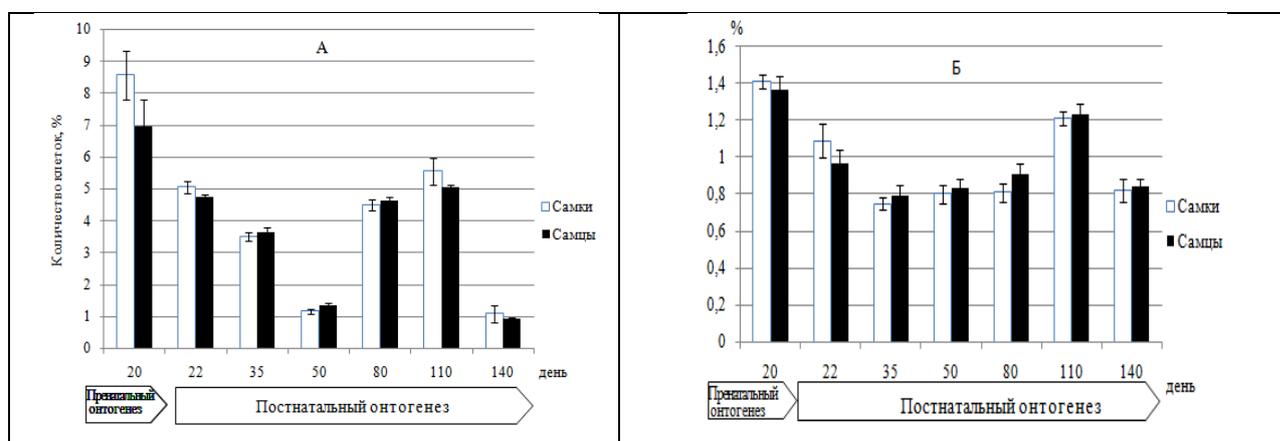


Рисунок 5 – Уровень апоптоз-положительных клеток (А), индекс апоптоза в тимусе крыс в процессе онтогенетического развития (Б)

Сравнение данных, полученных двумя разными методами, позволяет отметить более высокую прецизионность метода проточной цитофлуориметрии по сравнению с методом ДНК-комет, так как диапазон колебаний количества апоптоз-положительных клеток был значительно уже, чем диапазон колебаний индекса апоптоза. Метод проточной цитофлуориметрии позволил определить периоды онтогенеза крыс с самыми низкими уровнями апоптоза: на основании последовательного сравнения показателей, полученных от животных 20-140-го дней онтогенеза, статистически достоверные различия были выявлены при попарном сравнении каждого предыдущего и последующего показателя (20 и 22-го дня, 22 и 35 и т.д.). Результаты, полученные методом ДНК-комет, демонстрировали схожую картину колебаний активности апоптоза, самые высокие уровни также отмечены на 20-й и 110-й дни онтогенеза (рисунок 5).

Изменения активности апоптоза в печени и почках крыс обоего пола в зависимости от стадии онтогенетического развития в целом соответствовали картине, наблюдавшейся в тимусе: высокий уровень на 20-й день, снижение на 35-80-й дни, повышение к 110 дню и снижение к 140-му дню онтогенеза.

Исходя из предпосылки, что наиболее предпочтительными периодами онтогенеза для оценки уровня апоптоза в качестве биомаркера являются те стадии развития организма, на которых фоновые величины активности апоптоза достигают минимальных и максимальных значений, поскольку любые колебания показателей на этих сроках будут наиболее заметны, сроки отбора материала для исследований на 20-й и 130-140-й дни (соответствующие самой высокой и низкой активности апоптоза) были признаны оптимальными.

5.2 Изучение активности апоптоза в печени крыс в условиях интоксикации кадмием и четыреххлористым углеродом

Активность апоптоза в печени была изучена в трех сериях аналогичных по дизайну экспериментов продолжительностью ~63-65 дней на модели снижения адаптационного потенциала крыс в условиях направленного токсического воздействия четыреххлористого углерода и разных доз Cd^{2+} (в виде $CdCl_2$). Возраст крыс в начале экспериментов составлял ~30 дней.

Дизайн 1-й серии с интоксикацией кадмием описан в разделе 3.1.4.2. Активность апоптоза в печени определяли методом ДНК-комет, в каждой группе было обследовано по 10 крыс. Во 2-й серии животные были разделены на четыре группы – две контрольных и две опытных по 20 самцов в каждой. Животные контрольных групп получали рационы с "оптимальной" (75%) и "субмаргинальной" (19%) дозировками витаминов группы В, железа и магния, животные опытных групп на фоне разных уровней обеспеченности эссенциальными веществами получали с кормом Cd^{2+} . Доза кадмия составляла 10 мг/кг массы тела, что соответствовало 11% от LD50. Активность апоптоза в печени определяли методом проточной цитофлуориметрии, из каждой группы было обследовано по 6 крыс.

Дизайн третьей серии аналогичен описанному в разделе 3.1.4.2, только в качестве токсического фактора был использован четыреххлористый углерод. Самцам опытных групп (О-75, О-30 и О-19) внутрибрюшинно вводили раствор CCl_4 в оливковом масле один раз в неделю на протяжении всего эксперимента (8 инъекций), суммарно каждое животное получило CCl_4 в количестве 6,5 г/кг массы тела. Животным контрольных групп (К-75, К-30 и К-19) внутрибрюшинно вводили эквивалентные объемы оливкового масла. Поскольку внутрибрюшинная инъекция является стрессорным фактором, который может оказывать влияние на активность апоптоза, анализ результатов исследований проводили с учетом фонового уровня апоптоза (объединенных данных от контрольных животных, не получавших инъекции, использованных в аналогичных по дизайну экспериментах, группы Ф-75, Ф-30, Ф-19). Активность апоптоза в печени определяли методом ДНК-комет, в каждой группе было обследовано по 10 крыс.

В 1-й серии исследований сравнительный анализ индекса апоптоза у крыс контрольных и опытных групп не выявил статистически значимых различий между группами: интоксикация кадмием в дозировке 1,06-2,13% от LD50 не влияла на апоптоз, средние значения показателей соответствовали фоновому уровню апоптоза, характерному для крыс данного возраста. Активность апоптоза у крыс контрольных групп также не имела достоверных различий, что

свидетельствует об отсутствии влияния обеспеченности витаминами (В₁, В₂, В₃, В₆), и минеральными веществами (Fe³⁺ и Mg²⁺) на интенсивность процессов апоптоза в печени.

Во 2-й серии исследований с увеличенной в 10 раз дозой кадмия при оценке методом проточной цитофлуориметрии было отмечено повышение активности апоптоза в печени крыс опытных групп: при субмаргинальном уровне обеспеченности эссенциальными веществами сумма клеток в апоптозе у крыс опытной группы была на 43% выше ($p < 0,05$), чем у контрольных животных ($8,17 \pm 0,80\%$ и $5,70 \pm 0,45\%$); при оптимальном уровне обеспеченности – на 88% выше ($p < 0,05$), чем у контрольных крыс ($9,50 \pm 0,90\%$ и $5,07 \pm 0,39\%$), соответственно. Таким образом, интоксикация солями кадмия на фоне оптимального содержания витаминов и минеральных веществ в рационе вызывала более значительное повышение активности апоптоза, чем на фоне субмаргинального.

Полученные данные согласуются с результатами 3-й серии экспериментов, в которой было отмечено выраженное повышение активности апоптоза в ряду снижения обеспеченности эссенциальными веществами (таблица 17): у крыс группы К-75 индекс апоптоза был на 11% и 193% ниже, чем у групп К-30 и К-19; у крыс группы О-75 и О-30 значения данного показателя находились примерно на одном уровне, в группе О-19 индекс апоптоза был на 57% выше, чем в группе О-75. Статистически значимые различия между фоновыми группами отсутствовали, однако прослеживалась противоположная тенденция снижения уровня апоптоза в ряду Ф-75→Ф-30→Ф-19, у крыс группы Ф-75 индекс апоптоза был на 17% и 21% выше, чем у групп Ф-30 и Ф-19 (Tyshko N.V., Shestakova S.I. Model of vitamin and mineral deficiency for toxicological research: Apoptosis activity under conditions of CCL4 intoxication. Toxicology Reports. 2019. Vol. 6. P. 151-154).

Таблица 17 – Индекс апоптоза клеток печени на фоне интоксикации CCl₄

Индекс апоптоза, % Обеспеченность витаминами и минеральными веществами	Группы		
	Фоновые значения N*=3000	Контроль N=1500	Опыт N=1500
Субмаргинальная (19)	1,58±0,42	5,97±1,01 ¹	7,36±0,51
Маргинальная (30)	1,67±0,52	2,26±0,93	4,48±0,40 ²
Оптимальная (75)	2,01±0,32	2,04±0,97	4,68±0,65 ²

¹ отличия от соответствующих фоновых значений достоверны при $p < 0,05$

² отличия от соответствующих контрольных значений достоверны при $p < 0,05$

N*- количество исследованных клеток

Анализ данных выявил повышение активности апоптоза во всех контрольных группах по сравнению с фоновыми значениями: различия между группами К-75 и Ф-75, К-30 и Ф-30, К-19 и Ф-19 составляли 2%, 35% и 277%, соответственно. При сравнении опытных групп с соответствующими контрольными группами было отмечено, что в группе О-75 активность апоптоза была на 129% выше, чем в группе К-75, в группах О-30 и О-19 – на 98% и 23% выше, чем в группах К-30 и К-19, соответственно.

Как видно из представленных данных, в условиях отсутствия стрессорной и токсической нагрузки активность апоптоза у крыс, получавших рационы с понижающимся содержанием витаминов и минеральных веществ, была снижена. Вероятно, это обусловлено гиперэкспрессией генов антиапоптозных белков семейства Bcl-2, которую инициирует дефицит витаминов (Ishaque A., Al-Rubeai M. Role of vitamins in determining apoptosis and extent of suppression by bcl-2 during hybridoma cell culture. Apoptosis. 2002. Vol. 7(3). P. 231-239). Результаты сравнения контрольных групп с фоновыми значениями активности апоптоза, различавшихся только наличием/отсутствием внутривенных инъекций, позволяют предположить, что причиной активации апоптоза у животных всех контрольных групп являлся стресс (Berridge M.J. et al. Calcium - a life and death signal. Nature. 1998. Vol. 395(6703). P. 645-648; Хныченко Л.К., Сапронов Н.С. Стресс и его роль в развитии патологических процессов. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2003. Т. 2. № 3. С. 2-15).

На основании анализа результатов исследования были сделаны следующие выводы: во-первых, показатели активности апоптоза целесообразно использовать в токсикологических

экспериментах с оптимальной обеспеченностью животных витаминами и минеральными веществами. Во-вторых, стресс, вызванный регулярными внутрибрюшинными инъекциями, усиливал апоптоз в печени, более выраженный у крыс с алиментарным дефицитом эссенциальных веществ.

6 Разработка новой системы оценки безопасности ГМО растительного происхождения

6.1 ГМО 1-го и 2-го поколения

Основной целью проведенных исследований являлся поиск методических подходов, экспериментальных моделей и биомаркеров для расширения возможностей выявления потенциальных неблагоприятных эффектов ГМО и гарантирующих безопасность такой продукции как для нынешнего, так и для последующих поколений.

Создание новой расширенной системы оценки безопасности в первую очередь потребовало проведения ряда "технических" по форме, но необходимых исследований, касающихся стандартизации составов экспериментальных рационов и определения диапазонов физиологических значений показателей, изучаемых в токсикологических экспериментах. В рамках решения этих задач были разработаны оптимизированные полусинтетические рационы, рекомендованные для использования в исследованиях *in vivo* как наиболее современные, гармонизированные с международными подходами и соответствующие физиологическим потребностям крыс. Дальнейшая работа с новым рационом позволила скорректировать состав солевой смеси в части содержания солей лития, влиявших на фертильность животных, и предложить новую формулу, наиболее подходящую для экспериментов по изучению репродуктивной функции.

Также представлялось важным определение диапазонов физиологических значений параметров, изучение которых производится в рамках токсикологических и репротоксикологических экспериментов *in vivo*. Были проанализированы значения 101 показателя (биохимия сыворотки крови, активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови и печени, массы внутренних органов самцов и беременных самок, пренатальное развитие потомства, зоометрические показатели плодов на 20-й день пренатального развития, динамика массы тела и роста крысят 1-го месяца жизни). После статистической обработки, систематизации и анализа всего массива значений, полученных более чем от 7100 крыс разного возраста и пола, были проведены расчеты частоты встречаемости каждого из значений рассматриваемых признаков, визуализированные с помощью гистограмм, и сформирована база данных, результаты которой использованы в дальнейшей работе, позволяя повысить объективность анализа и интерпретации результатов исследований в рамках токсиколого-гигиенической оценки безопасности ГМО.

Следующим этапом работы являлось формирование нового расширенного перечня показателей, определяемых в рамках токсикологических исследований. Как представлено на рисунке 6, для характеристики клинического состояния животных предложены параметры, традиционно применяющиеся в токсикологических экспериментах, а именно:

- гематологические, отражающие структуру и соотношение форменных элементов эритроцитарного, тромбоцитарного и лейкоцитарного звеньев, гематокрит и тромбоциты, содержание гемоглобина, эритроцитарные индексы, характеризующие состояние циркулирующей крови и кроветворной системы;
- биохимические исследования крови и мочи, характеризующие обменную, защитную, эндокринную и синтетическую функцию печени, экскреторную и регуляторную функцию почек, а также белковый, жировой и углеводный обмены, электролитный баланс;
- морфологические (расширен список внутренних органов, изучаемых и измеряемых как во время некропсии, так и позднее при выполнении гистологических исследований).

Особое внимание было уделено выбору так называемых системных биомаркеров, характеризующих функциональное состояние адаптационных и защитных систем организма: были уточнены списки ферментов 1 и 2 фазы биотрансформации ксенобиотиков, а также системы антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов. Одним из важных преимуществ использования расширенного перечня показателей является возможность комплексной оценки

данных, что повышает диагностическую ценность исследований и позволяет нивелировать случайные единичные колебания, связанные с неоднородностью выборки.



Рисунок 6 – Характеристика блока токсикологических исследований

Перспектива изучения активности апоптоза в качестве биомаркера токсической нагрузки на организм изучалась нами на протяжении нескольких лет (Тышко Н.В. и др. Определение активности апоптоза в органах крыс на модели токсического воздействия СС14. Фундаментальные исследования. 2014. № 10 (ч. 5). С. 993-998) и была подтверждена результатами экспериментов, проведенных в условиях моделированных токсических воздействий *in vivo*. На основании полученных данных об активности процессов апоптоза в разные периоды онтогенетического развития крыс, а также о влиянии на апоптоз токсических факторов (солей кадмия, четыреххлористого углерода) в условиях снижающейся обеспеченности рационов витаминами группы В, солями железа и магния, были определены оптимальные сроки и условия для оценки активности апоптоза. Показатели, характеризующие активность апоптоза, были включены в перечень системных биомаркеров, изучаемых в рамках токсикологических исследований ГМО (рисунок 6).

В оценке безопасности ГМО, безусловно, центральное место должны занимать исследования, доказывающие отсутствие отдаленных негативных последствий, которые могут проявиться только в следующем поколении. Именно поэтому характеристика репродуктивной функции и развития потомства представляется критически значимой.

В нескольких сериях экспериментов было проведено детальное изучение репродуктивной функции в поколениях, что позволило определить наиболее чувствительные показатели, реагирующие на токсические воздействия, оценить влияние фактора сезонности на репродуктивную функцию крыс, пре- и постнатальное развитие потомства. Были рассмотрены стадии онтогенеза, характеризующиеся существенными физиологическими особенностями и типом питания: 20-й день пренатального развития относится к периоду завершения

внутриутробного развития и плацентарным питанием; 2-15 дни жизни – к периоду новорожденности и грудного вскармливания, 20-25-й дни жизни – переход на смешанное кормление, после 25-го дня – переход на общевиварный рацион. Следует отметить, все этапы развития потомства сопровождалось контактом с ГМО через плацентарное питание, молоко матери или корм. Результаты комплексного анализа накопленных данных послужили обоснованием необходимости изучения репродуктивной функции и развития потомства при оценке безопасности ГМО, выбраны наиболее значимые и репрезентативные показатели (рисунки 7-8).



Рисунок 7 – Характеристика репродуктивной функции

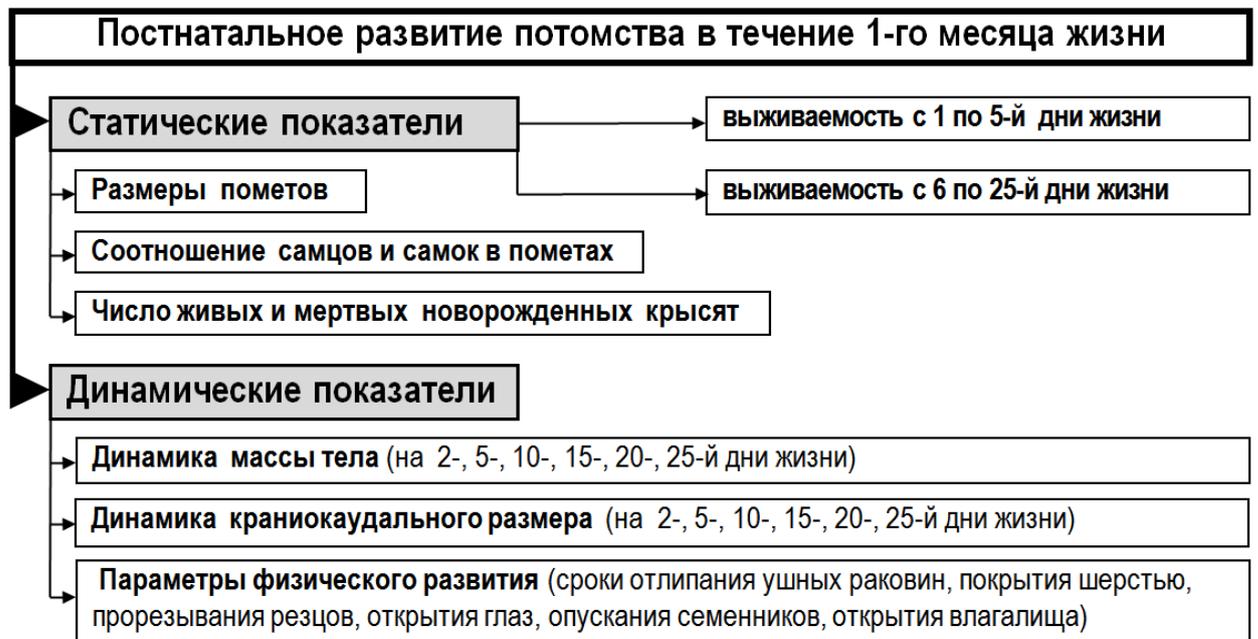


Рисунок 8 – Характеристика постнатального развития потомства

По результатам проведенных поисковых исследований сформирован протокол комплексного токсиколого-гигиенического эксперимента на двух поколениях крыс,

объединяющего изучение репродуктивной функции крыс поколения F_0 , пренатальное и постнатальное развитие потомства поколения F_1 , а также расширенные токсикологические исследования на крысах поколения F_0 и аллергологические исследования на крысах поколения F_1 (рисунок 9). Новый подход предусматривает изучение влияния ГМО на два поколения животных обоего пола, при этом суммарная продолжительность эксперимента с учетом проведения подготовительной стадии, необходимой для получения стандартизованных животных, и аллергологических исследований на крысах поколения F_1 , в соответствии с предложенным нами протоколом пролонгируется до ~ 330-360 дней. Общий перечень изучаемых показателей расширился с 63 до 152, что значительно повышает информативность и комплексность проводимых исследований, обеспечивая гарантии безопасности новых ГМО.

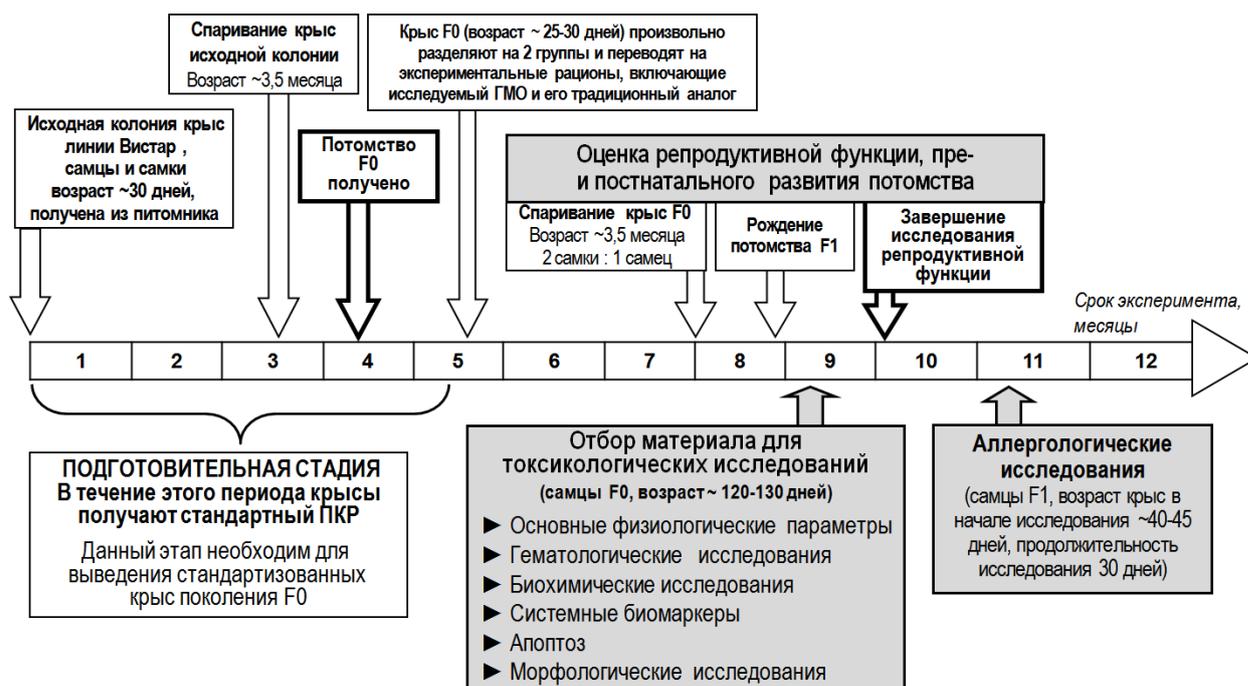


Рисунок 9 – Объединенные токсиколого-гигиенические исследования ГМО, включающие изучение репродуктивной токсичности, токсичности и аллергенности в эксперименте на двух поколениях крыс

Отдельный блок исследований был направлен на разработку так называемых "нагрузочных" проб, позволяющих отличить физиологическую адаптацию от компенсированного скрытого патологического процесса и выявить влияние малотоксичных объектов. Моделирование дополнительной нагрузки, снижающей адаптационный потенциал, и, соответственно, исключающей возможность псевдоадаптации, является перспективным инструментом повышения диагностической достоверности результатов эксперимента. Поскольку одним из наиболее простых и эффективных способов снижения адаптационного потенциала организма лабораторных животных является модификация состава рациона, было проведено несколько серий исследований, результатом которых явилось создание и доказательство эффективности модели, повышающей восприимчивость организма к действию токсических факторов за счет снижения обеспеченности витаминами группы В (В1, В2, В3, В6) и минеральных веществ (Fe^{3+} и Mg^{2+}). С учетом степени риска развития патологии были установлены три дозировки эссенциальных веществ, с определенной степенью условности обозначенные как "оптимальная", "маргинальная" и "субмаргинальная", обеспечивающие последовательное снижение адаптационного потенциала у лабораторных животных: 75, 30 и 19% для самцов, и 75, 28 и 18% для самок, соответственно. Предложенная модификация витаминно-минерального состава рационов была рекомендована для использования в качестве модели повышения чувствительности крыс к токсическим факторам при изучении малотоксичных объектов, в частности, новых видов пищевой продукции.

Разработанный подход к оценке безопасности ГМО был оформлен в виде методических указаний, утвержденных в установленном порядке (МУ 2.3.2.2306-07) и использован при медико-биологической оценке новых видов ГМ пищевой продукции, проходящих государственную регистрацию в странах ЕАЭС.

6.2 ГМО с комбинированными признаками

Значительно более сложной задачей представлялось формирование порядка оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками. Растения, геном которых был изменен посредством "трансформационного" метода, основанного на включении нового гена (генов) в геном уже существующего и зарегистрированного ранее ГМО с помощью генной инженерии; а также растения, геном которых был изменен посредством "молекулярного" метода, основанного на использовании в процессе трансформации генома растения-донора вектора (векторов), несущих несколько целевых генов, во всех юрисдикциях рассматриваются как новые ГМО и подлежат регистрационным испытаниям в полном объеме. Растения, полученные посредством "гибридизационного" метода, основанного на получении гибрида двух (и более) уже существующих ГМО с помощью традиционной селекции, в разных юрисдикциях рассматриваются по-разному в диапазоне от "продукта обычной селекции", не требующего дополнительных исследований при регистрации, до "продукта генной инженерии", требующего проведения полномасштабных испытаний.

В рамках работы по данному направлению был проведен анализ мирового опыта и подтверждена необходимость дифференцирования набора исследований в зависимости от метода получения ГМО. Как представлено на рисунке 10 в случае, если ГМО получен трансформационным или молекулярным методами, оценка его безопасности должна включать полный комплекс исследований.



Рисунок 10 – Порядок исследований ГМО с комбинированными признаками

Если ГМО получен гибридизационным методом, и исходные ГМ-линии имеют свидетельства о государственной регистрации на территории ЕАЭС, то оценка безопасности

должна включать этап экспертного анализа данных, представленных заявителем, или представленных на этапе регистрации исходных ГМ-линий. Такие данные содержат информацию о сравнении химического состава исходных ГМ-линий с химическим составом их традиционных аналогов, результаты токсикологических, алергологических и других исследований, результаты пострегистрационного мониторинга, осуществляемого в странах, где ГМО был зарегистрирован ранее, в случае, если в процессе мониторинга были получены данные о незадаанных эффектах генетической модификации; экспертная оценка методов обнаружения, идентификации и количественного определения ГМО; подтверждение соответствия показателей качества и безопасности ГМО (содержание токсичных элементов, микотоксинов, радионуклидов, пестицидов и др.) требованиям Технических регламентов Таможенного Союза (ТР ТС 021/2011 и др.). В случае если одна или несколько исходных ГМ-линий не имеют свидетельства о государственной регистрации на территории ЕАЭС, оценка безопасности такого ГМО должна быть проведена в полном объеме.

Предложенный порядок к оценке безопасности ГМО с комбинированными признаками был утвержден в установленном порядке (МУ 2.3.2.3388-16) и использован при проведении исследований в рамках государственной регистрации ГМ сои линии MON87701×MON89788.

7 Использование новой системы для оценки безопасности ГМО

Строго в соответствии с разработанной системой была проведена оценка безопасности 10 линий ГМО в рамках процедуры их государственной регистрации: 5 линии сои – MON87701×MON89788, SYHT0H2, FG72, MON87708, MON87701, 5 линий кукурузы – 5307, MON89034, 1507, MZHGOJG, DAS-40278-9.

7.1 Токсиколого-гигиеническая оценка сои линии MON87701×MON89788

ГМ линия сои MON87701×MON89788 является гибридом двух ГМ линий MON87701 и MON89788, полученным методом традиционной селекции, и характеризуется устойчивостью к чешуекрылым насекомым-вредителям (свойство, детерминируемое родительской линией MON87701) и к глифосату (свойство, детерминируемое родительской линией MON89788).

Устойчивость к вредителям обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *cry1Ac*, на основе которого синтезируется белок Cry1Ac, обладающий инсектицидными свойствами. Устойчивость к глифосату обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *cp4 epsps*, на основе которого синтезируется белок 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат-синтаза, не чувствительный к действию данного гербицида.

Токсикологические исследования (дизайн эксперимента представлен на рисунке 9) продолжительностью 182 дня проведены на крысах поколений F₀ (по 60 самок и 25 самцов в контрольной и опытной группах) и F₁ (133 плода и 298 крысят в контрольной группе, 184 плода и 296 крысят в опытной группе).

Общее состояние крыс родительского поколения F₀ было удовлетворительным: по внешнему виду, качеству шерстного покрова, поведению и скорости роста самки и самцы опытной группы не отличались от животных контрольной группы. При изучении генеративной функции гонад самцов и самок, а также эндокринной функции яичников самок поколения F₀, не выявлено различий между животными, получавшими с рационом ГМ сою и ее традиционный аналог. Эффективность спаривания, физиологическое протекание беременности, содержание половых гормонов в крови беременных крыс обеих групп находились в пределах нормы, что свидетельствует о нормальной генеративной и эндокринной функции половых желез экспериментальных животных.

Отбор материала для исследований физиолого-биохимических показателей, характеризующих здоровье самцов F₀, проводили на 182-й день эксперимента. Массы внутренних органов (почек, надпочечников, семенников, легких, печени, тимуса, селезенки, сердца, простаты, мозга) у крыс контрольной и опытной групп не имели статистически значимых различий. При осмотре внутренних органов патологических изменений не выявлено, размеры и форма органов сердечно-сосудистой, пищеварительной, мочеполовой, нервной,

иммунной и эндокринной систем у крыс опытной группы не имели визуальных отличий от аналогичных показателей у крыс контрольной группы.

Таблица 18 – Гематологические показатели самцов F₀

Показатели, M±m	Группа		Диапазон нормы по ¹	Интегрированный контроль ²
	Контроль	Опыт		
Общее количество эритроцитов, 10 ¹² /л	8,76±0,10	8,66±0,10	4,4-8,9	7,51-9,94
Концентрация Hb, г/л	153±1	151±2	86-173	135-177
Гематокрит, %	45,2±0,4	44,9±0,5	31,4-51,9	38,40- 52,00
MCV, мкм ³	51,6±0,5	51,9±0,5	50,6-93,8	46,00-58,00
MCH, пг	17,49±0,16	17,51±0,18	13,4-26,1	16,00-20,20
MCHC, г/л	338±1	337±1	247-368	328-375
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	12,03±0,66	13,08±1,20	1,4-34,3	4,40-19,10
Базофилы, %	0,61±0,08	0,64±0,09	0	0,02-0,80
Эозинофилы, %	4,25±0,21	3,05±0,31*	0,0-5,5	1,00-6,10
Нейтрофилы, %	28,5±1,8	32,7±2,5	0,4-53,8	5,00-46,80
Лимфоциты, %	57,4±2,2	53,5±2,3	42,3-98,0	40,20-88,00
Моноциты, %	9,26±1,03	10,21±0,53	0,0-7,9	1,50-17,55
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	667±26	683±18	409-1250	449-924
MPV, мкм ³	6,73±0,09	6,61±0,08	5,0-8,0	6,00-7,80
Тромбокрит, %	0,45±0,02	0,45±0,02	0,2-0,5	0,29-0,60

¹ (Lewi P.J., Marsboom R.P. Toxicology reference data – Wistar rat. Elsevier/North-Holland biochemical Press, 1981. 358 p.; Suckow M.A. et al. The Laboratory Rat. Burlington: Elsevier Academic Press. 2006. 912 p.)

² По данным собственных исследований (Мустафина О.К. и др. Гематологические показатели у крыс Вистар разного возраста, содержащихся на полусинтетическом полноценном виварном рационе. Вопр. пит. 2013. Т. 82. № 2. С. 10-16)

* выявлены достоверные различия между контрольной и опытной группами при p<0,05

Как видно из таблицы 18, состав периферической крови крыс контрольной и опытной групп находился в пределах нормы. Достоверные различия между группами отсутствовали за исключением некоторого снижения содержания эозинофилов у крыс опытной группы по сравнению с контролем – на 28% (p<0,05). Отмеченные различия не выходили за пределы нормальных значений данных показателей для крыс линии Вистар.

Биохимические показатели сыворотки крови и мочи крыс контрольной и опытной групп не имели значимых различий и находились в пределах нормы.

Таблица 19 – Активность ферментов системы антиоксидантной защиты и содержание малонового диальдегида в крови и печени крыс

Показатели, M±m	Группа		Интегрированный контроль ¹
	Контроль	Опыт	
ГР, мкмоль/мин·г Hb	37,70±0,85	39,85±0,62	17,76-61,04
ГП, мкмоль/мин·г Hb	62,41±1,48	63,26±1,62	46,71-88,43
КАТ, ммоль/мин·г Hb	600,1±22,0	638,2±21,7	250,0-750,9
СОД, ЕД/мин·г Hb	1843±33	1924±33	1571-2578
МДА эритроцитов, нмоль/мл	5,225±0,164	5,171±0,140	2,020-9,463
МДА сыворотки, нмоль/мл	8,059±0,218	7,794±0,215	2,500-9,327
МДА печени, нмоль/г	351,0±6,3	340,6±7,8	228,2-691,0

¹ По данным собственных исследований

Не выявлено достоверных различий между контрольной и опытной группами при p<0,05

Как видно из таблицы 19, активность ферментов системы антиоксидантной защиты эритроцитов, а также содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови и печени

у крыс контрольной и опытной групп не имели статистически значимых различий. Значения изученных показателей находились в пределах физиологических колебаний, характерных для крыс. В этих же экспериментах, в наших совместных исследованиях с Кравченко Л.В., Авреньева Л.И., Гусевой Г.В. (Тутельян В.А. и др. Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированной кукурузы линии MON 88017. Сообщение 1. Токсиколого-гигиенические исследования. Вопр. пит. 2008. Т. 77. № 5. С. 4-12; Тутельян В.А. и др. Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированной кукурузы линии MIR604. Сообщение 1. Токсиколого-гигиенические исследования. Вопросы питания. 2009. Т. 78. № 2. С. 24-32; Тутельян В.А. и др. Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированной сои линии MON 89788. Сообщение 1. Токсиколого-гигиенические исследования. Вопр. пит. 2010. Т. 79. № 3. С. 4-12), при изучении функционального состояния систем, осуществляющих защиту организма от воздействия токсичных соединений экзогенного и эндогенного происхождения также не было выявлено значимых различий между группами. Результаты исследований свидетельствуют о наличии оптимального баланса защитно-адаптационных возможностей организма экспериментальных животных.

Таким образом, длительное употребление с рационом ГМ сои не оказывало влияния на физиолого-биохимические показатели, характеризующих здоровье самцов F₀.

Пренатальное развитие потомства F₁ (таблица 20) в контрольной группе в целом соответствовало физиологической норме, характерной для крыс, тогда как показатели пренатального развития потомства у крыс опытной группы соответствовали оптимальному уровню: количество живых плодов было на 29% (p<0,05) выше, чем у крыс контрольной группы, количество мест имплантации – выше на 21% (p<0,05), количество желтых тел – выше на 8% (p>0,05) соответственно; при этом предимплантационная и постимплантационная гибель у крыс опытной группы была, соответственно, на 52% и 68% (p<0,05) ниже, чем у контрольных животных.

Таблица 20 – Пренатальное развитие потомства F₁

Регистрируемые показатели		Группа		Интегрированный контроль ¹
		Контроль	Опыт	
Количество беременных самок		14	15	-
Количество желтых тел	Всего	185	213	5-23
	M±m	13,21±0,60	14,20±0,71	
Количество мест имплантации	Всего	147	190	3-18
	M±m	10,50±0,72	12,67±0,55*	
Количество живых плодов	Всего	133	184	2-18
	M±m	9,50±0,69	12,27±0,55*	
Количество резорбций	Всего	13	6	0-10
	M±m	0,929±0,245	0,400±0,163	
Количество мертвых плодов		1	0	-
Предимплантационная гибель				
%	M±m	20,7±4,3	10,0±2,5*	0-80
Абс.	Всего	38	23	0-13
	M±m	2,714±0,559	1,533±0,435	
Постимплантационная гибель				
%	M±m	9,2±2,5	3,1±1,3*	0-100
Абс.	Всего	13	6	0-10
	M±m	0,929±0,245	0,400±0,163	

¹ По данным собственных исследований

* выявлены достоверные различия между контрольной и опытной группами при p<0,05

Зоометрические показатели плодов и масса внутренних органов плодов варьировали в пределах физиологической нормы. При обследовании плодов F₁ по методу Wilson и Dawson аномалий развития внутренних органов и скелета выявлено не было, формирование основных анатомических систем протекало без особенностей. Длина участков оссификации в закладках

костей конечностей и черепа плодов F₁ не имела значимых различий между группами.

Постнатальное развитие потомства F₁ характеризовалось высокой выживаемостью в обеих группах: в период с 1-го по 5-й дни жизни выживаемость составляла 99-100%, в период с 6-го по 25-й дни жизни – 99%, в период с 1-го по 30-й дни жизни – 99%. Средняя величина пометов, соотношение самцов и самок в пометах находилась в пределах физиологических колебаний (таблица 21). Динамика массы тела и роста, а также физическое развитие потомства F₁ не имели значимых различий и соответствовали норме.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии токсического действия у ГМ сои линии MON87701×MON89788.

Таблица 21 – Постнатальное развитие потомства F₁

Регистрируемые показатели	Группа	
	Контроль	Опыт
Общее количество забеременевших самок	29	28
Общее количество родивших самок	29	28
Общее количество пометов, уничтоженных материнским животным в 1-й день жизни	1 ^a	1 ^a
Общее количество крысят	298	296
Из них мертворожденных	0	0
Средняя величина помета, M±m	10,64±0,47	10,96±0,42
Соотношение ♂/♀ в помете, %	50/50	47/53

Не выявлено достоверных различий между контрольной и опытной группами при $p < 0,05$

^{a)} самки уничтожили потомство в течение первых суток после родов, количество крысят неизвестно, эти пометы не учитывали при подсчете общего количества крысят и выживаемости

Генотоксикологические исследования длительностью 30 дней проводили в эксперименте на мышах с исходной массой 16-18 г. Исследования включали оценку целостности структуры ДНК методом ДНК-комет, а также выявление мутагенной активности методом учета хромосомных aberrаций в метафазных клетках пролиферирующих тканей.

На протяжении указанного периода не было отмечено гибели мышей, общее состояние животных контрольной и опытной групп было удовлетворительным. Поедаемость корма не различалась между группами, масса тела мышей в конце эксперимента составляла 20-25 г.

Средний уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей контрольной и опытной групп не имел достоверных различий и составлял, соответственно, 2,1±0,4% и 2,0±0,4%, не превышая интенсивности спонтанного мутагенеза, характерной для мышей линии C57Bl/6. При сравнении показателей, характеризующих уровень повреждений структуры ДНК в костном мозге, печени, почках и прямой кишке мышей, не было выявлено различий между группами.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии генотоксического действия у ГМ сои линии MON87701×MON89788.

Аллергологические исследования (проведены совместно с д.м.н. И.В. Гмошинским) продолжительностью 30 дней выполняли в эксперименте на крысах самцах линии Вистар, исходный возраст ~ 45-50 дней. На 1-й день эксперимента масса тела крыс контрольной и опытной групп (исходно – по 30 крыс в каждой) составляла 196,1±2,2 г и 194,6±2,3 г, соответственно. На 1-й, 3-й, 5-й день эксперимента крыс внутрибрюшинно сенсибилизировали овальбумином куриного яйца (ОВА) в дозе 100 мкг. На 22-й день эксперимента для индукции вторичного иммунного ответа вводили 10 мкг ОВА. На 30-й день у крыс отбирали по 0,2 мл крови из хвостовой вены для определения ответа антител, после чего внутривенно вводили разрешающую дозу ОВА 6 мг/кг массы тела. За развитием симптомов активного анафилактического шока наблюдали в течение последующих 24 часов.

На протяжении эксперимента общее состояние крыс обеих групп было

удовлетворительным. По внешнему виду, состоянию шерстного покрова, поведению и скорости роста животные, в рацион которых была включена ГМ соя, не отличались от животных контрольной группы. Тяжесть реакции анафилактического шока и интенсивность гуморального иммунного ответа (уровень специфических IgG антител к овальбумину) у крыс опытной группы не имели статистически достоверных отличий от аналогичных показателей у крыс контрольной группы. Анализ распределений изучаемых показателей в группах, выполненный с использованием критерия ANOVA, указывает на их однородность ($p > 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии аллергенного действия у ГМ сои линии MON87701×MON89788.

Таким образом, с применением разработанной нами новой системы оценки безопасности ГМО были проведены исследования ГМ сои линии MON87701×MON89788, результаты которых свидетельствуют об отсутствии у данной линии сои токсического, генотоксического, и аллергенного действия, что, наряду с данными экспертного анализа материалов, представленных заявителем, послужило основанием для государственной регистрации ГМ сои линии MON87701×MON89788 на территории ЕАЭС.

Предложенный подход был также использован при оценке безопасности 9 новых линий ГМО, исследования которых выполнены по аналогичной схеме, в том числе:

— **ГМ сои MON87701**, устойчивой к чешуекрылым насекомым-вредителям. Устойчивость к вредителям обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *cry1Ac*, на основе которого синтезируется белок Cry1Ac, обладающий инсектицидными свойствами. Общая продолжительность исследований 167 дней, в экспериментах использовано 1392 крысы.

— **ГМ сои SYHT0H2**, устойчивой к глюфосинату аммония и к гербицидам, ингибирующим фермент гидроксифенилпируват диоксигеназу. Устойчивость к глюфосинату аммония обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *pat*, на основе которого синтезируется фермент фосфинотрицин ацетилтрансфераза, ацетилирующий свободную NH₂ группу фосфинотрицина, дезактивируя таким образом действующее вещество данного гербицида. Устойчивость к гербицидам, ингибирующим фермент гидроксифенилпируват диоксигеназу, обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *avhppd-03*, на основе которого синтезируется изофермент *p*-гидроксифенилпируват-диоксигеназа, слабочувствительный к действию пестицидов-ингибиторов. Общая продолжительность исследований 208 дней, в экспериментах использовано 979 крыс.

— **ГМ сои FG72**, устойчивой к гербицидам изоксафлютолу и глифосату. Устойчивость к изоксафлютолу обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *hppdPf W336*, на основе которого синтезируется белок 4-гидроксифенилпируват диоксигеназа W336, обеспечивающий устойчивость сои к изоксафлютолу. Устойчивость к глифосату обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *2mEPSPS*, на основе которого синтезируется белок 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат-синтаза, не чувствительный к действию данного гербицида. Общая продолжительность исследований 209 дней, в экспериментах использовано 940 крыс.

— **ГМ сои MON87708**, устойчивой к гербициду Дикамба (3,6-дихлор-2-метоксибензойная кислота). Устойчивость к Дикамба обусловлена наличием кассеты экспрессии кодирующей последовательности Дикамба-монооксигеназы *CS DMO*, на основе которой синтезируется фермент Дикамба-монооксигеназа (DMO), инактивирующий данный гербицид. Общая продолжительность исследований 121 день, в экспериментах использовано 1147 крыс.

— **ГМ кукурузы 5307**, устойчивой к жесткокрылым насекомым-вредителям рода *Diabrotica*. Устойчивость к вредителям обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *ecry3.1Ab*, на основе которого синтезируется белок eCry3.1Ab (ген δ-эндотоксина (Cry-белка), выделенный из *Bacillus thuringiensis*), обладающий инсектицидными свойствами. Общая продолжительность исследований 180 дней, в экспериментах использовано 1058 крыс.

— **ГМ кукурузы MON89034**, устойчивой к чешуекрылым насекомым-вредителям. Устойчивость к вредителям обусловлена наличием кассеты экспрессии генов *cry1A.105* и *cry2Ab2*, на основе которых синтезируются белки Cry1A.105 и Cry2Ab2 (гены δ-эндотоксинов (Cry-белков), выделенные из *Bacillus thuringiensis*), обладающие инсектицидными свойствами. Общая продолжительность исследований 294 дня, в экспериментах использовано 1310 крыс.

— **ГМ кукурузы 1507**, устойчивой к определенным видам чешуекрылых насекомых-вредителей и глюфосинату аммония. Устойчивость к вредителям обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *cry1F*, на основе которого синтезируется белок Cry1F, обладающий инсектицидными свойствами. Устойчивость к глюфосинату аммония обусловлена наличием кассеты экспрессии синтетического гена *pat*, на основе которого синтезируется фермент фосфинотрицин ацетилтрансфераза, обеспечивающий ускоренный метаболизм гербицида. Общая продолжительность исследований 206 дней, в экспериментах использовано 1059 крыс.

— **ГМ кукурузы MZHG0JG**, устойчивой к глифосату и глюфосинату аммония. Устойчивость к глифосату обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *terpsps-02*, на основе которого синтезируется белок 5-енолпирувиллицимат-3-фосфат-синтаза, не чувствительный к действию данного гербицида. Устойчивость к глюфосинату аммония обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *pat-09*, на основе которого синтезируется белок фосфинотрицин ацетилтрансфераза, обеспечивающий ускоренный метаболизм гербицида. Общая продолжительность исследований 188 дней, в экспериментах использовано 1190 крыс.

— **ГМ кукурузы DAS-40278-9**, устойчивой к гербициду – 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоте (2,4-Д) и определенным арилоксифеноксипропионатам. Устойчивость к гербицидам обусловлена наличием кассеты экспрессии гена *AAD-1*, кодирующего белок арилоксиалканоат диоксигеназу (Aryloxy Alkanoate Dioxygenase, AAD-1), который является α -кетоглутарат-зависимой диоксигеназой. Наличие данного белка обеспечивает ускоренный метаболизм гербицидов в реакции с α -кетоглутаратом за счет разложения гербицидов до неактивных фенолов и глиоксилата, и окисления α -кетоглутарата до CO₂ и сукцината. Общая продолжительность исследований 124 дня, в экспериментах использовано 1245 крыс.

Результаты исследований свидетельствуют об отсутствии у вышеперечисленных ГМ линий сои и кукурузы токсического, генотоксического, и аллергенного действия, что, наряду с данными экспертного анализа материалов, представленных заявителями, послужило основанием для государственной регистрации этих линий на территории ЕАЭС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с положениями "Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации" устойчивое развитие сельскохозяйственного производства является важнейшим условием обеспечения продовольственной независимости страны. Поставленная задача требует использования современных методов селекции для получения растений, характеризующихся повышенной урожайностью, устойчивостью к природным и антропогенным факторам, снижением потерь при хранении и транспортировке и т.п. Поскольку последние десятилетия характеризуются повышенным интересом к маркер-ориентированной и геном-ориентированной селекции, а также к генно-инженерным технологиям, позволяющим получить растения с заданными свойствами в кратчайшие сроки, проблема обеспечения безопасности таких организмов выходит на первый план. Именно необходимость создания системы оценки новой продукции, гарантирующей ее безопасность как для нынешнего, так и для последующих поколений, определило направление исследований по поиску новых методических подходов для выявления возможных неблагоприятных эффектов ГМО.

Основной целью выполнения данной работы являлся поиск методических подходов, экспериментальных моделей и биомаркеров для расширения возможностей обнаружения потенциальных неблагоприятных эффектов ГМО и гарантирующих безопасность такой продукции как для нынешнего, так и для последующих поколений.

Создание новой системы оценки безопасности в первую очередь потребовало проведения исследований, касающихся стандартизации составов экспериментальных рационов и определения диапазонов физиологических значений показателей, изучаемых в токсикологических исследованиях. В рамках решения этих задач были разработаны оптимизированные полусинтетические рационы, рекомендованные для использования в

исследованиях *in vivo*, в том числе рационы, предназначенные для экспериментов по изучению репродуктивной функции. Для определения диапазонов физиологических значений параметров, изучение которых производится в рамках токсикологических и репротоксикологических экспериментов, были проанализированы значения 101 показателя (биохимия сыворотки крови, активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови и печени, массы внутренних органов самцов и беременных самок, пренатальное развитие потомства, зоометрические показатели плодов на 20-й день пренатального развития, динамика массы тела и роста крысят 1-го месяца жизни). После статистической обработки и анализа всего массива значений, полученных более чем от 7100 крыс разного возраста и пола, была сформирована база данных, результаты которой использованы в дальнейшей работе, позволяя повысить объективность анализа и интерпретации результатов исследований в рамках токсиколого-гигиенической оценки безопасности ГМО.

Следующим этапом работы являлось формирование нового расширенного перечня показателей, определяемых в рамках токсикологических исследований. Для характеристики клинического состояния животных предложены наиболее информативные гематологические, биохимические морфологические параметры. Особое внимание было уделено выбору системных биомаркеров, характеризующих функциональное состояние защитных систем организма – активность ферментов 1 и 2 фазы биотрансформации ксенобиотиков, системы антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов.

Перспектива изучения апоптоза в качестве биомаркера токсической нагрузки на организм изучалась нами на протяжении нескольких лет. На основании полученных данных об интенсивности процессов апоптоза в разные периоды онтогенетического развития крыс, а также о влиянии на апоптоз токсических факторов в условиях снижающейся обеспеченности рационов витаминами группы В, солями железа и магния, были определены оптимальные сроки и условия для оценки апоптоза. Показатели, характеризующие апоптоз, были включены в перечень системных биомаркеров, изучаемых в рамках токсикологических исследований ГМО.

В оценке безопасности ГМО, безусловно, центральное место должны занимать исследования, доказывающие отсутствие отдаленных негативных последствий, которые могут проявиться не только в течении жизни подопытных животных, но и в следующем поколении. Именно поэтому характеристика репродуктивной функции и развития потомства представляется критически значимой. В нескольких сериях экспериментов было проведено детальное изучение репродуктивной функции в поколениях, что позволило определить наиболее чувствительные показатели, реагирующие на токсические воздействия, оценить влияние фактора сезонности на репродуктивную функцию крыс, пре- и постнатальное развитие потомства. Анализ полученных данных послужил обоснованием необходимости включения этих исследований в систему оценки безопасности ГМО.

По результатам проведенной работы определен порядок и объем комплексных токсиколого-гигиенических исследований на двух поколениях крыс, объединяющих характеристику репродуктивной функции крыс поколения F0, пре- и постнатальное развитие потомства поколения F1, а также расширенные токсикологические исследования на крысах поколения F0 и аллергологические – на крысах поколения F1 (рисунок 11). Суммарная продолжительность эксперимента с учетом проведения подготовительной стадии, необходимой для получения стандартизованных животных в соответствии с предложенным нами протоколом пролонгируется до ~ 330-360 дней. Общий перечень изучаемых показателей расширился с 63 до 152.

Отдельный блок исследований был направлен на разработку "нагрузочных" проб, снижающих адаптационный потенциал организма лабораторных животных посредством модификации витаминно-минерального состава рациона. Результатом нескольких серий исследований явилось создание и доказательство эффективности модели, повышающей

восприимчивость организма к действию токсических факторов за счет снижения обеспеченности витаминами группы В (В1, В2, В3, В6) и минеральных веществ (Fe^{3+} и Mg^{2+}).

Разработанный подход к оценке безопасности ГМО был оформлен в виде методических указаний, утвержденных в установленном порядке (МУ 2.3.2.2306-07) и использован при медико-биологической оценке новых видов ГМ пищевой продукции.

При формировании порядка оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками, накопленный опыт и анализ литературы позволили обосновать необходимость дифференцирования набора исследований в зависимости от метода получения ГМО. Предложенный порядок к оценке безопасности ГМО с комбинированными признаками был утвержден в установленном порядке (МУ 2.3.2.3388-16).

Разработанная система оценки безопасности ГМО (рисунок 11) была использована при исследованиях 9 линий ГМО в рамках процедуры их государственной регистрации: 3 линии сои – SYHT0H2, FG72, MON87708, 6 линий кукурузы – 5307, MON89034, 1507, MZHGOJG, DAS-40278-9; и 1 линии сои с комбинированными признаками – MON87701×MON89788.

Рекомендации

Поскольку в настоящее время рассмотренная в данной работе система оценки безопасности ГМО действует только в Российской Федерации, представляется целесообразным интегрировать эту систему на всей территории ЕАЭС, обеспечивая тем самым стандартизацию методологии токсиколого-гигиенических исследований и гарантии безопасности вне зависимости от того, в какой из стран-членов ЕАЭС проходила государственная регистрация ГМО.

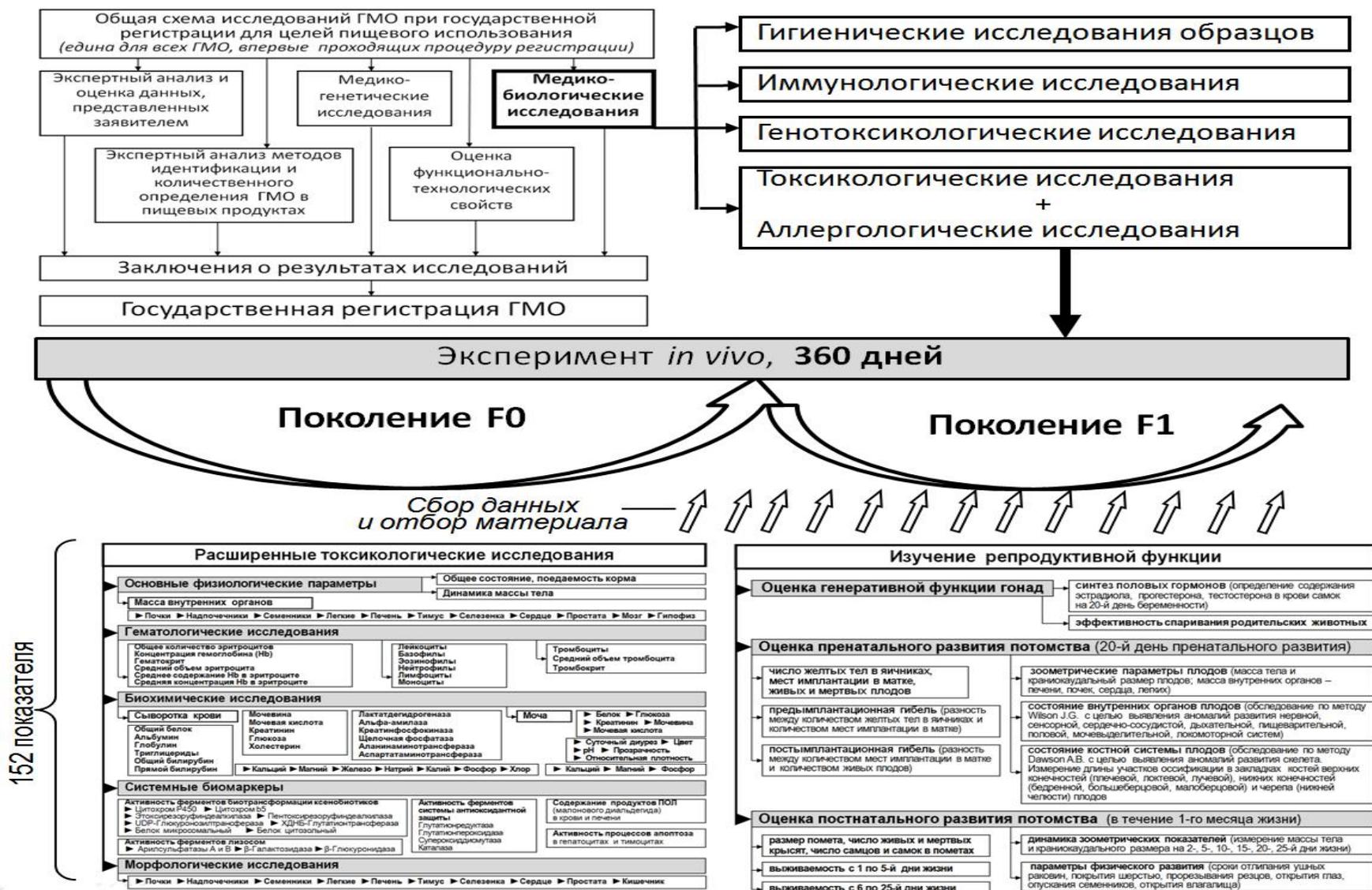
Перспективы дальнейшей разработки темы

Открытые сравнительно недавно технологии редактирования генома имеют все предпосылки для изменения темпов и направлений исследований в области селекции сельскохозяйственных растений. Масштабное использование этих технологий и создание новых хозяйственно-ценных и высококоротельных сортов растений, пород животных, штаммов микроорганизмов предопределяет необходимость дальнейшего совершенствования методологии оценки безопасности, в частности, применения геномных (геном-ориентированных) и постгеномных подходов.

Кроме того, развитие информационных технологий, по всей вероятности, приведет к появлению токсикологических методов *in silico*, которые позволят с высокой степенью достоверности прогнозировать действие изучаемых биологических объектов на организм человека.

Таким образом, дальнейшее развитие биотехнологий требует непрерывного совершенствования подходов к оценке безопасности и поиска современных и информативных показателей, оставаясь актуальной проблемой гигиены.

Российская система оценки безопасности ГМО растительного происхождения **



** МУ 2.3.2.2306-07, МУ 2.3.2.3388-16

Рисунок 11 – Новая система оценки безопасности ГМО

ВЫВОДЫ

1. С целью развития системы оценки ГМО растительного происхождения, гарантирующей их безопасность не только для настоящего, но и последующих поколений, на основании серии поисковых разработок выбраны показатели и модели, позволившие сформировать новый расширенный комплекс токсиколого-гигиенических исследований и доказать их обязательность при регистрационных испытаниях новых видов ГМО.
2. Впервые установлены диапазоны значений для более 100 показателей, характеризующих физиологическое состояние различных органов и систем у здоровых крыс на разных стадиях онтогенеза, этапах пре- и постнатального развития потомства, что позволяет обеспечить объективный анализ и интерпретацию результатов исследований в рамках токсиколого-гигиенической оценки безопасности ГМО.
3. С целью стандартизации условий проведения исследований *in vivo* и обеспечения воспроизводимости результатов измерений, оптимизирован состав синтетического рациона для взрослых и растущих лабораторных животных, а также состав специализированного рациона для экспериментов по изучению репродуктивной функции. Установлено влияние солей лития на снижение фертильности крыс.
Экспериментально определен оптимальный для репротоксикологических исследований перечень показателей репродуктивной функции, свидетельствующих о токсичности исследуемого алиментарного фактора, в частности, выживаемость и морфо-функциональные критерии постнатального онтогенеза потомства.
4. Разработана модель повышения чувствительности крыс к токсической нагрузке за счет снижения их адаптационного потенциала. Определены пороговые значения (19% для самцов и 18% для самок – от базового уровня в рационе) витаминов В1, В2, В3, В6, а также минеральных веществ – Fe³⁺ и Mg²⁺, приводящие к достоверному снижению адаптационного потенциала у лабораторных животных. Эффективность данной модели подтверждена в токсикологических и репротоксикологических экспериментах с кадмием и глифосатом. Сформирован перечень физиолого-биохимических параметров (биомаркеров), реагирующих на минимальное токсическое воздействие, включающий эритроцитарный и тромбоцитарный профили, показатели системы антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов крови и печени.
5. Впервые получены доказательства эффективности использования апоптоза в качестве чувствительного биомаркера при токсикологических исследованиях:
 - установлены периоды онтогенеза, характеризующиеся минимальным (110-120-й дни жизни) и максимальным (20-й день внутриутробного развития) уровнями апоптоза;
 - выявлено влияние составов рационов на интенсивность апоптоза. Показано что снижение обеспеченности животных витаминами и минеральными веществами (до 75, 30 и 19%) вызывает прямо пропорциональное снижение выраженности ответной реакции апоптоза на токсическое воздействие.
6. Разработана и экспериментально обоснована новая система оценки безопасности ГМО растительного происхождения 1-го и 2-го поколений, с возможностью ее дальнейшего использования для изучения ГМО, полученных с помощью новых геном-ориентированных технологий, в частности, геномного редактирования. Основу системы составляют комплексные токсиколого-гигиенические исследования на двух поколениях крыс, включая:
 - изучение репродуктивной функции крыс поколения F0, пре- и постнатального развития потомства F1;
 - расширенные токсикологические исследования на крысах поколения F0, в том числе, характеристику активности апоптоза;
 - аллергологические исследования на крысах поколения F1.
7. Новая система оценки безопасности интегрирована в практику работы Роспотребнадзора и акцептирована для государственной регистрации ГМО в странах ЕАЭС, с 2011 года являясь базовой при проведении многоуровневых токсиколого-гигиенических исследований. Эта

- система использована при оценке 9 линий ГМО (в среднем 190 дней и 940-1300 животных на каждый ГМО) в рамках процедуры их государственной регистрации в странах ЕАЭС:
- сои линий MON87701, SYHT0H2, FG72, MON87708;
 - кукурузы линий 5307, MON89034, 1507, MZHG0JG, DAS-40278-9.

8. Разработан порядок оценки безопасности ГМО с комбинированными признаками, устанавливающий требования, применяемые на этапе государственной регистрации. Определены перечень и объем исследований, дифференцированные в зависимости от метода получения ГМО (трансформационного, молекулярного или гибридизационного) и наличия государственной регистрации исходных ГМ-линий на территории ЕАЭС – для ГМО, полученных гибридизационным методом. Новый порядок использован при исследованиях ГМ сои линии MON87701×MON89788 в рамках процедуры ее государственной регистрации в ЕАЭС.

ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ

1. Методические указания МУ 2.3.2.1917-04: Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически модифицированные аналоги. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 47 с.
2. Методические указания МУ 2.3.2.2306-07: Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения. // Осуществление надзора за производством и оборотом пищевых продуктов, содержащих ГМО: Сборник методических указаний. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. Ч. 2. – С. 9-30.
3. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Дополнения и изменения 5 к СанПиН 2.3.2.1078-01: СанПиН 2.3.2.2227-07. – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 6 с.
4. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Дополнения и изменения 6 к СанПиН 2.3.2.1078-01: СанПиН 2.3.2.2340-08. – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 53 с.
5. Методические указания МУК 4.2.3105-13: Порядок и методы идентификации и количественного определения в пищевых продуктах генно-инженерно-модифицированных организмов, полученных с использованием новых биотехнологий. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека. – 2013. – 27 с.
6. Методические указания МУК 4.2.3309-15: Методы идентификации и количественного определения новых линий ГМО 2-го поколения в пищевых продуктах. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека. – 2015. – 15 с.
7. Методические указания МУ 2.3.2.3388-16: Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения с комбинированными признаками. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека. – 2016. – 27 с.
8. Методические указания МУК 4.2.3389-16: Валидация методов, предназначенных для выявления и идентификации генно-инженерно-модифицированных организмов в пищевых продуктах и продовольственном сырье. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека. – 2016. – 18 с.
9. Методические указания МУК 4.2.3390-16: Детекция и идентификация ГМО растительного происхождения методом полимеразной цепной реакции в матричном формате. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека. – 2016. – 33 с.

10. Методические указания МУК 4.2.-19: Идентификация и количественное определение новых линий ГМ кукурузы (DAS-40278-9, MZIR098, MZHGOJG) и сои (MON87708) в пищевых продуктах. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека. – 2019. – 15 с.
11. Постановление Правительства Российской Федерации N 839 от 23.09.2013 г. "О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы".
12. Федеральный закон N 358-ФЗ от 03.07.2016 г. "О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в части совершенствования государственного регулирования в области генно-инженерной деятельности".
13. Свидетельства о государственной регистрации ГМО:
 - кукурузы линий 5307 (RU.77.99.88.011.E.002894.04.14 от 15.04.2014), MON89034 (RU.77.99.88.011.E.012081.12.14 от 11.12.2014), 1507 (RU.77.99.32.011.E.001395.03.17 от 23.03.2017), MZHGOJG (RU.77.99.88.011.E.001046.03.18 от 14.03.2018), DAS-40278-9 (RU.77.99.88.011.E.000933.03.19 от 13.03.2019);
 - сои линий MON87701 (RU.77.99.88.011.E.003744.05.13 от 20.05.2013), SYHT0H2 (RU.77.99.32.011.E.000032.01.16 от 12.01.2016), FG72 (RU.77.99.32.011.E.010101.11.15 от 12.11.2015), MON87708 (RU.77.99.57.011.E.002302.07.19 от 02.07.2019);
 - сои линии MON87701×MON89788 с комбинированными признаками (RU.77.99.32.011.E.004191.09.16 от 22.09.2016).
14. Результаты диссертации включены в программу дополнительного профессионального образования, проводимого Федеральным бюджетным учреждением здравоохранения "Федеральный центр гигиены и эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека" по теме "Молекулярно-генетические методы исследований продуктов питания и продовольственного сырья (ГМО)".

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России

1. Тышко, Н.В. ГМИ пищи: создание, мировое производство [Текст] / Н.В. Тышко // Пищевая промышленность. – 2003. – №6. – С. 6-13.
2. Тышко, Н.В. Влияние высокосахарозной диеты на антиоксидантный статус крыс [Текст] / Н.В. Тышко, А.Б.Левицкая // Вопросы питания. – 2004. – №1. – С. 32-35.
3. Тутельян, В.А. Технологии рекомбинантных ДНК как путь решения продовольственной проблемы [Текст] / В.А. Тутельян, Н.В. Тышко // Технологии живых систем. – 2004. – №1. – С. 5-12.
4. Кирпичников, М.П. Принципы создания генетически модифицированных источников пищи [Текст] / М.П. Кирпичников, Н.В. Тышко // Вестник РАМН. – 2005. – № 10. – С. 30-37.
5. Tyshko, N.V. Safety assessment of genetically modified organisms of plant origin in the Russian Federation [Text] / N.V. Tyshko, I.N. Aksyuk, V.A. Tuteljian // Biotechnology Journal. – 2007. – Vol. 2. – № 7. – P. 826-832.
6. Тутельян, В.А. Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированной кукурузы линии MON 88017. Сообщение 1. Токсиколого-гигиенические исследования [Текст] / В.А. Тутельян, М.М. Гаппаров, Л.И. Авреньева, И.Н. Аксюк, Г.В. Гусева, Л.В. Кравченко, Л.С. Львова, В.П. Сапрыкин, Н.В. Тышко, О.Н. Чернышева // Вопросы питания. – 2008. – Т. 77. – № 5. – С. 4-12.
7. Тышко, Н.В. Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированной кукурузы линии MON 88017. Сообщение 2. Генотоксикологические, иммунологические и аллергологические исследования [Текст] / Н.В. Тышко, М.В. Брицина, И.В. Гмошинский, А.К. Жанатаев, Н.С. Захарова, С.Н. Зорин, В.К. Мазо, Б.Ф. Семенов // Вопросы питания. – 2008. – Т. 77. – № 5. – С. 13-17.

8. Тутельян, В.А. Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированной кукурузы линии MIR604. Сообщение 1. Токсиколого-гигиенические исследования [Текст] / В.А. Тутельян, М.М. Гаппаров, Л.И. Авреньева, И.Н. Аксюк, Г.В. Гусева, Л.В. Кравченко, Л.С. Львова, В.П. Сапрыкин, Н.В. Тышко, О.Н. Чернышева // Вопросы питания. – 2009. – Т. 78. – № 2. – С. 24-32.
9. Тышко, Н.В. Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированной кукурузы линии MIR604. Сообщение 2. Генотоксикологические, иммунологические и аллергологические исследования [Текст] / Н.В. Тышко, М.В. Брицина, И.В. Гмошинский, А.К. Жанатаев, Н.С. Захарова, С.Н. Зорин, В.К. Мазо, М.Н. Озерецковская, Б.Ф. Семенов // Вопросы питания. – 2009. – Т. 78. – № 2. – С. 33-38.
10. Утембаева, Н.Т. Разработка методических подходов к изучению влияния фактора сезонности на репродуктивную функцию крыс в экспериментальных исследованиях при алиментарных воздействиях [Текст] / Н.Т. Утембаева, В.А. Пашорина, К.Е. Селяскин, Н.В. Тышко // Вопросы питания. – 2009. – Т. 78. – №1. – С. 43-48.
11. Тутельян, В.А. Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированной сои линии MON 89788. Сообщение 1. Токсиколого-гигиенические исследования [Текст] / В.А. Тутельян, М.М.Г. Гаппаров, Л.И. Авреньева, Г.В. Гусева, В.М. Жминченко, Л.В. Кравченко, В.А. Пашорина, В.П. Сапрыкин, К.Е. Селяскин, Н.В. Тышко // Вопросы питания. – 2010. – Т. 79. – № 3. – С. 4-12.
12. Тышко, Н.В. Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированной сои линии MON 89788. Сообщение 2. Генотоксикологические, иммунологические и аллергологические исследования [Текст] / Н.В. Тышко, М.В. Брицина, И.В. Гмошинский, Н.С. Захарова, С.Н. Зорин, В.К. Мазо, М.Н. Озерецковская, К.Е. Селяскин // Вопросы питания. – 2010. – Т. 79. – № 3. – С. 13-17.
13. Тышко, Н.В. Оценка влияния ГМО растительного происхождения на развитие потомства крыс в трех поколениях [Текст] / Н.В. Тышко, В.М. Жминченко, В.А. Пашорина, В.П. Сапрыкин, К.Е. Селяскин, Н.Т. Утембаева, В.А. Тутельян // Вопросы питания. – 2011. – Т. 80. – № 1. – С. 14-28.
14. Тышко, Н.В. Сравнительная характеристика влияния экспериментальных рационов на рост и развитие крыс [Текст] / Н.В. Тышко, В.М. Жминченко, В.А. Пашорина, К.Е. Селяскин, Е.А. Мельник, О.К. Мустафина, С.Х. Сото, Э.Н. Трушина, М.М.Г. Гаппаров // Вопросы питания. – 2011. – Т. 80. – № 5. – С. 30-38.
15. Тышко, Н.В. Оценка репродуктивной функции крыс при раздельном и сочетанном воздействии алиментарного и токсического факторов [Текст] / Н.В. Тышко, К.Е. Селяскин, Е.А. Мельник, В.А. Пашорина, В.М. Жминченко // Вопросы питания. – 2012. – Т. 81. – № 1. – С. 33-43.
16. Тышко, Н.В. Оценка влияния ГМО растительного происхождения на развитие потомства крыс [Текст] / Н.В. Тышко, В.М. Жминченко, В.А. Пашорина, В.П. Сапрыкин, К.Е. Селяскин, Н.Т. Утембаева, В.А. Тутельян // Гигиена и санитария. – 2011. – №6. – С.73-77.
17. Мустафина, О.К. Гематологические показатели у крыс Вистар разного возраста, содержащихся на полусинтетическом полноценном виварном рационе [Текст] / О.К. Мустафина, Э.Н. Трушина, А.А. Шумакова, Е.А. Арианова, Н.В. Тышко, В.А. Пашорина // Вопросы питания. – 2013. – Т. 82. – № 2. – С. 10-16.
18. Melnik, E.A. Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats [Text] / E.A. Melnik, Yu.P. Buzulukov, V.F. Demin, V.A. Demin, I.V. Gmshinski, N.V. Tyshko, V.A. Tutelyan // Acta naturae (engl.). – 2013. – Т. 5. – №3 (18). – С. 48-56.
19. Tyshko, N.V. Assessment of the impact of genetically modified LibertyLink® maize on reproductive function and progeny development of Wistar rats in three generations [Text] / N.V. Tyshko, V.M. Zhminchenko, K.E. Selyaskin, V.A. Pashorina, N.T. Utembaeva, V.A. Tutelyan // Toxicology Reports. – 2014. – Vol. 1. – p. 330-340.
20. Тышко, Н.В. Определение активности апоптоза в органах крыс на модели токсического воздействия СС14 [Текст] / Н.В. Тышко, К.Е. Селяскин, В.А. Тутельян // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10 (часть 5). – С. 993-998.
21. Тышко, Н.В. Изучение профиля метилирования ДНК печени крыс в условиях воздействия гепатотоксикантов различной природы [Текст] / Н.В. Тышко, А.А. Запонова, И.В. Заигрин, Н.С. Никитин // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – № 5. – С. 58-65.

22. Тышко, Н.В. Модификация витаминно-минерального состава рационов как модель снижения адаптационного потенциала крыс для токсикологических исследований [Текст] / Н.В. Тышко, Э.О. Садыкова, А.Н. Тимонин, С.И. Шестакова, М.Д. Требух, В.А. Пашорина // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – № 6. – С. 64-71.
23. Tsatsakis, A.M. Impact on environment, ecosystem, diversity and health from culturing and using GMOs as feed and food [Text] / A.M. Tsatsakis, M.A. Nawaz, V.A. Tutelyan, K.S. Golokhvast, O.- I. Kalantzi, D.H. Chung, S.J. Kang, M.D. Coleman, N. Tyshko, S.H. Yang, G. Chung // Food and Chemical Toxicology. – 2017. – Vol. 107. – P. 108-121.
24. Тышко, Н.В. Контроль за генно-инженерно-модифицированными организмами растительного происхождения в пищевой продукции: научное обоснование и методическое обеспечение [Текст] / Н.В. Тышко // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86. – № 5. – С. 29-33.
25. Требух, М.Д. Характеристика иммунного статуса крыс при витаминно-минеральной недостаточности [Текст] / М.Д. Требух, Э.О. Садыкова, А.К. Голомидова, Н.А. Ригер, А.Н. Тимонин, О.К. Мустафина, Н.В. Тышко // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86. – № 6. – С. 36-41
26. Tyshko, N.V. Analysis of the intensity of apoptosis in rat organs at various stages of ontogeny [Text] / N.V. Tyshko, E.O. Sadykova, S.I. Shestakova, E.N. Trushina, O.K. Mustafina // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2018. – Vol. 166. – Issue 9. – P. 409-412.
27. Тышко, Н.В. Молекулярно-генетические исследования генно-инженерно-модифицированного картофеля: трансформационное событие РН05-026-0048 [Текст] / Н.В. Тышко, Э.О. Садыкова, М.В. Сухачева, А.К. Батулин // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87. – № 4. – С. 25-31.
28. Тышко, Н.В. Изучение влияния интоксикации кадмием на модели витаминно-минеральной недостаточности у крыс [Текст] / Н.В. Тышко, Э.О. Садыкова, А.Н. Тимонин, С.И. Шестакова, О.К. Мустафина, С.Х. Сото // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87. – № 1. – С. 63-71.
29. Tyshko, N.V. Genetically modified food products: development of safety assessment system in Russia [Text] / N.V. Tyshko, E.O. Sadykova // Health Risk Analysis. – 2018. – № 4. – С. 119-126.
30. Тышко, Н.В. Мультиплексная полимеразная цепная реакция для количественного определения генно-инженерно-модифицированного картофеля линии EN92-527-1 в пищевой продукции [Текст] / Н.В. Тышко, Э.О. Садыкова, Д.С. Груздев, М.В. Сухачева // Вопросы питания. – 2019. – Т. 88. – № 1. – С. 57-61.
31. Tyshko, N.V. Model of vitamin and mineral deficiency for toxicological research: Apoptosis activity under conditions of CCL4 intoxication [Text] / N.V. Tyshko, S.I. Shestakova // Toxicology Reports. – 2019. – Vol. 6. – P. 151-154.
32. Никитин, Н.С. Микроструктура печени у крыс при введении СС14 на фоне витаминно-минеральной недостаточности [Текст] / Н.С. Никитин, С.Л. Кузнецов, Н.В. Тышко // Морфология. – 2019. – Т. 155. – №3. – С. 42-47.
33. Tsatsakis, A. The effect of chronic vitamin deficiency and long term very low dose exposure to 6 pesticides mixture on neurological outcomes – A real-life risk simulation approach [Text] / A. Tsatsakis, N.V. Tyshko, A.O. Docea, S.I. Shestakova, Yu.S. Sidorova, N.A. Petrov, O. Zlatian, M. Mach, T. Hartung, V.A. Tutelyan // Toxicology Letters. – 2019. – Vol. 315. – P. 96-106.

Статьи, опубликованные в других изданиях

34. Тутельян, В.А. Современная законодательная, нормативная и методическая база в области обеспечения безопасности пищевой продукции в Российской Федерации [Текст] / В.А. Тутельян, С.А. Хотимченко, И.В. Гмошинский, Н.В. Тышко, М.М. Гаппаров, С.А. Шевелева, А.К. Батулин, В.В. Бессонов, О.В. Багрянцева // Аналитический вестник Совета Федерации Федерального собрания Российской Федерации. – 2013. – № 16 (500). – С. 33-46.
35. Тышко, Н.В. Определение наиболее чувствительных методов для оценки активности апоптоза в органах крыс на модели токсического воздействия тетрахлорметана [Текст] / Н.В. Тышко, К.Е. Селяскин, В.А. Тутельян // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – №2-1. – С. 34-36.
36. Tyshko, N.V. Regulation of Genetically Modified Food Use in the Russian Federation [Text] / N.V. Tyshko, E.O. Sadykova // Food and Nutrition Sciences. – 2016. – Vol. 7. – P. 743-751.

Научные монографии, переводы монографий, главы в монографиях

37. Тышко, Н.В. Влияние биотехнологий на продовольственные ресурсы и качество пищевых продуктов [Текст]: В кн.: Химия пищевых продуктов / Ред. сост.: Ш. Дамодаран, К.Л. Паркин, О.Р. Феннема – пер. с англ. – СПб.: ИД "Профессия", 2012, 1040 с. – С. 970-1023. ISBN 978-5-904757-24-3 ISBN 978-0-8493-9272-6 (США)
38. Гаппаров, М.М. Генетически модифицированные продукты. Мифы и реальность [Текст]: монография / М.М. Гаппаров, Е.Ю. Сорокина, Н.В. Тышко. – Приложение к журналу "Здоровье" "Для тех, кто лечит", 2004. – № 4. – 63 с.
39. Гаппаров, М.М. Генетически модифицированные продукты. Мифы и реальность. *Издание второе, дополненное* [Текст]: монография / М.М. Гаппаров, Е.Ю. Сорокина, Н.В. Тышко. – Киев: "КВЦ", 2006. – 40 с.
40. Тутельян, В.А. Госсанэпиднадзор за безопасностью продукции, полученной с использованием генно-инженерно-модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения. Методы лабораторного контроля [Текст]: учебно-методич. пособие для послевуз. образования / В.А. Тутельян, Б.П. Суханов, М.Г. Керимова, Е.В. Елизарова, Е.Ю. Сорокина, Н.В. Тышко, О.Н. Чернышева, О.В. Анисимова, Н.А. Кашина. – М.: Медицина для всех, 2007. – 128 с.
41. Тутельян, В.А. (Ред.) Генетически модифицированные источники пищи: оценка безопасности и контроль [Текст]: монография / В.А. Тутельян [и др.]. – М.: Издательство РАМН, 2007. – 444 с. В составе авторского коллектива Тышко Н.В. автор 2 глав, соавтор 3 глав.
42. Tutelyan, V.A. (Ed.) Genetically Modified Food Sources. Safety Assessment and Control [Text]: монография / V.A. Tutelyan [et al]. – Elsevier Inc. Academic Press, 2013. – 338 p. В составе авторского коллектива Тышко Н.В. научный редактор 5 глав, автор 2 глав, соавтор 3 глав.

Материалы научных конференций

Основные положения диссертации представлены в **65** публикациях в виде тезисов по материалам **33** научных конференций, в том числе:

43. Тышко, Н.В. Генетически модифицированная сахарная свекла: изучение антиоксидантного статуса при токсиколого-гигиенической оценке [Текст] / Н.В. Тышко // Функциональное питание, пищевая безопасность и здоровье людей в условиях мегаполиса: сб. докл. – М., 2003. – С. 80-81.
44. Тышко, Н.В. Медико-биологическая оценка генетически модифицированных источников пищи: новые подходы [Текст] / Н.В. Тышко, И.Н. Аксюк // Биотехнология: состояние и перспективы развития: мат. III моск. междунар. конгр. – М., 2005. – С. 62.
45. Тышко, Н.В. Опыт изучения системы антиоксидантной защиты при оценке безопасности генетически модифицированных источников пищи [Текст] / Н.В. Тышко // Окружающая среда и здоровье: мат. всеросс. науч.-практ. конф. мол. уч. и спец. – Суздаль, 2005. – С. 305-307.
46. Тышко, Н.В. Оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных источников пищи растительного происхождения: создание адекватной экспериментальной модели, принципы интерпретации данных [Текст] / Н.В. Тышко // Окружающая среда и здоровье: мат. II всеросс. науч.-практ. конф. мол. уч. и спец. – Рязань, 2007. – С. 195-197.
47. Тышко, Н.В. Изучение репродуктивной токсичности генно-инженерно-модифицированной кукурузы в эксперименте на трех поколениях крыс [Текст] / Н.В. Тышко, Н.Т. Утембаева // Здоровье и болезнь: мат. межд. науч.-практ. конф. – Алматы, 2009. – №2 (78). – С. 200-202.
48. Тышко, Н.В. Совершенствование системы оценки безопасности биотехнологической продукции в соответствии с направлениями развития новейшей агробиотехнологии [Текст] / Н.В. Тышко // Вопросы питания: мат. XV всеросс. конгр.нутриц. и диетол. с междунар. участ. – Вопросы питания. – 2014. – Т. 83 (приложение). – № 3. – С. 160-161.
49. Тышко, Н.В. Разработка многоуровневой системы оценки безопасности ГМО-содержащей пищевой продукции [Текст] / Н.В. Тышко, Э.О. Садыкова, А.Н. Тимонин // Биотехнология в комплексном развитии регионов: мат. междунар. науч.-практ. конф. – М.: ООО "РЭД ГРУПП", 2016. – С. 56-57.
50. Тышко, Н.В. Разработка многоуровневой экспериментальной модели *in vivo* для оценки безопасности ГМО, полученных с использованием новых биотехнологий [Текст] / Н.В. Тышко, Э.О. Садыкова, А.Н. Тимонин, С.И. Шестакова, Н.С. Никитин, М.Д. Требух, А.А. Запонова, М.С. Логинова // Фундаментальные и прикладные аспекты нутрициологии и диетологии. Качество пищи: мат. XVI всеросс. конгр.нутриц. и диетол. с междунар. участ. – Вопросы питания. – 2016. – Т. 85 (приложение). – № 2. – С. 172-173.

51. Trebukh, M.D. GMO safety assessment in the Russian Federation: the immunotoxicological studies [Text] / M.D. Trebukh, N.V. Tyshko // The 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019): abstracts. – Toxicology Letters. – 2018. – Vol. 295, Suppl. 1. – P. 115.
52. Tyshko, N.V. Mineral mix diet composition for reprotoxicological experiments in vivo: Lithium salt [Text] / N.V. Tyshko // The 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019): abstracts. – Toxicology Letters. – 2018. – Vol. 295, Suppl. 1. – P. 164.
53. Shestakova, S.I. Apoptosis activity on the vitamin and mineral deficiency model under CCL4 intoxication [Text] / S.I. Shestakova, N.V. Tyshko // Toxicology Letters. – 2018. – Vol. 295, Suppl. 1. – P. 17.
54. Тышко, Н.В. Метод идентификации и количественного определения ГМ картофеля линии PH05-026-0048 [Текст] / Н.В. Тышко, С.И. Шестакова, Э.О. Садыкова, М.В. Сухачева, Д.С. Груздев // Фундаментальные и прикладные аспекты нутрициологии и диетологии. Лечебное, профилактическое и спортивное питание: мат. XVII всеросс. конгр. с междунар. участ. – Вопросы питания. – 2018. – № 5. – С. 196-197.
55. Shestakova, S. Authorization of identification and quantification methods for new GMO lines in the Russian Federation [Text] / S. Shestakova, N. Tyshko, E. Sadykova // 43th Federation of European Biochemical Societies (FEBS) 2019 Congress: abstracts. – FEBS open Bio. – 2018. – Vol. 8. – P. 482.
56. Tyshko, N. Development of the controlled level of adaptation for toxicological studies [Text] / N. Tyshko, E. Sadykova // 43th Federation of European Biochemical Societies (FEBS) 2019 Congress: abstracts. – FEBS open Bio. – 2018. – Vol. 8. – P. 348.
57. Shestakova, S. Evaluation of the adaptive potential reducing model within in vivo experiment: approach to bionanotechnologies safety assessment [Text] / S. Shestakova, E. Sadykova, N. Tyshko // 44th Federation of European Biochemical Societies (FEBS) 2019 Congress: abstracts. – FEBS open Bio. – 2019. – Vol. 9. – Suppl. 1. – P. 371.
58. Tyshko, N. Multiplex PCR protocol development for detection and quantification of GM potato event AV43-6-G7 in raw material and food [Text] / N. Tyshko, E. Sadykova, D. Grouzdev, M. Sukhacheva // 44th Federation of European Biochemical Societies (FEBS) 2019 Congress: abstracts. – FEBS open Bio. – 2019. – Vol. 9. – Suppl. 1. – P. 371.
59. Sadykova, E. Duplex PCR protocol elaboration for detection and quantification of GM potato event EH92-527-1 in raw material and food [Text] / E. Sadykova, N. Tyshko, D. Grouzdev, M. Sukhacheva // 44th Federation of European Biochemical Societies (FEBS) 2019 Congress: abstracts. – FEBS open Bio. – 2019. – Vol. 9. – Suppl. 1. – P. 371-372.
60. Grouzdev, D. Duplex PCR protocol elaboration for detection and quantification of GM potato event PH05-026-0048 in raw material and food [Text] / D. Grouzdev, M. Sukhacheva, N. Tyshko, E. Sadykova // 44th Federation of European Biochemical Societies (FEBS) 2019 Congress: abstracts. – FEBS open Bio. – 2019. – Vol. 9. – Suppl. 1. – P. 372.
61. Tyshko, N. V. Safety assessment of genetically modified soybean: potential genotoxicity [Text] / N. V. Tyshko, S. Shestakova, E. Sadykova, N. Nikitin // The 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019): abstracts. – Toxicology Letters. – 2019. – Vol. 314, Suppl. 1. – P. 121.
62. Tutelyan, V.A. Food derived from genetically modified animals: formation of safety assessment system and new approaches to toxicological research [Text] / V.A. Tutelyan, N. Tyshko, E. Sadykova // The 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019): abstracts. – Toxicology Letters. – 2019. – Vol. 314, Suppl. 1. – P. 241-242.
63. Baranov, E.A. GM stack soybean MON87701×MON89788 reproduction toxicity investigation [Text] / E.A. Baranov, S. Shestakova, E. Sadykova, N. Tyshko // The 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019): abstracts. – Toxicology Letters. – 2019. – Vol. 314, Suppl. 1. – P. 267-268.

Список сокращений

ГМ	–	генно-инженерно-модифицированный
ГМО	–	генно-инженерно-модифицированный организм
ГП	–	глутатионпероксидаза
ГР	–	глутатионредуктаза
ЕАЭС	–	Евразийский экономический союз
КАТ	–	каталаза
МДА	–	малоновый диальдегид
ПКР	–	полусинтетический казеиновый рацион
СОД	–	супероксиддисмутаза
AIN-93	–	рацион, разработанный American Institute of Nutrition
НЬ	–	гемоглобин
МСН	–	среднее содержание гемоглобина в одном эритроците
МСНС	–	средняя концентрация гемоглобина в одном эритроците
МСV	–	средний объем одного эритроцита
MPV	–	средний объем одного тромбоцита

Благодарности

Автор признателен сотрудникам Лаборатории оценки безопасности биотехнологий и новых источников пищи, на базе которой была выполнена эта работа