

**ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ЧОРНА ІРИНА ВІТАЛІЇВНА

УДК 577.122+577.15]:[604.6:633.34

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВПЛИВ ГЛІФОСАТ-РЕЗИСТЕНТНОЇ ГЕНЕТИЧНО
МОДИФІКОВАНОЇ СОЇ НА ПОКАЗНИКИ БІЛКОВОГО ОБМІНУ ТА
АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМУ ЩУРІВ**

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____ І.В. ЧОРНА

Науковий керівник: Дроник Григорій Васильович, доктор біологічних наук, професор, академік Національної академії аграрних наук

Львів – 2021

АНОТАЦІЯ

Чорна І.В. Вплив гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої на показники білкового обміну та антиоксидантну систему щурів. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04. – біохімія – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2021.

Однією із трансгенних рослин, яку широко використовують як у сільському господарстві, так і в харчовій промисловості, є генетично модифікована соя (лінія GTS 40-3-2) з новою ознакою «Roundup Ready». Трансгенна соя виявляє стійкість до гербіциду Roundup завдяки внесенню гену бактерії *Agrobacterium tumefaciens*. Генетично модифікована соя (ГМ-соя) синтезує бактеріальну 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтаза (EPSPS), що замінює інгібований гербіцидом ензим у рослині, тому лінія сої GTS 40-3-2 (Roundup Ready) стійка до гліфосату й продовжує рости після обробки посівів цим гербіцидом, хоча бур'яни при цьому гинуть. Широке використання трансгенної сої «Roundup Ready» та гербіциду Roundup викликає занепокоєння в суспільстві щодо їх безпечності як для навколишнього середовища, так і для здоров'я тварин та людей.

Дисертаційну роботу присвячено дослідженню довготривалого впливу гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої, яку не обробляли гербіцидом й ту яку обробляли гербіцидом Roundup, та впливу самого гербіциду на продуктивність самок щурів двох поколінь, постнатальний розвиток щурів та їх масометричні характеристики, на показники протеїнового обміну (аланінамінотрансферазу (АлАт), аспартат амінотрансферазу (АсАт), гамма-глутамілтрансферазу (ГГТ), креатинін, сечовину, сечову кислоту та загальний протеїн) у нирках, печінці, сечі й крові щурів трьох поколінь. Вивчався вміст карбонільних похідних у тканинах досліджуваних тварин трьох поколінь та стан їх антиоксидантної системи (ензимна активність супероксиддисмутази, каталази й ензимів

глутатионові ланки) як один із критеріїв оцінки безпечності генетично модифікованих організмів.

Уперше проведено комплексне вивчення впливу гербіциду Roundup (основною діючою речовиною є гліфосат) та генетично модифікованої сої лінії GTS 40-3-2 на гістохімічні та біохімічні показники в нирках, печінці, крові та сечі щурів трьох поколінь, а також проаналізовано вплив кожного із цих чинників окремо.

У роботі підтверджено наявну думку про негативний вплив гербіциду Roundup та оброблену гербіцидом трансгенну сою лінії GTS 40-3-2 на структуру та функції нирок і печінки щурів, а саме зворотне набрякання клітин нирок та печінки, яке є найбільш вираженим у F_2 поколінні. Результати дисертаційного дослідження підтверджують здатність насіння сої накопичувати гербіцид Roundup, який частково можна знешкодити внаслідок термічної обробки. Виявлено, що довготривале згодовування ГМ-сої, обробленої гербіцидом та вживання гербіциду Roundup разом з питною водою призводить до підвищення смертності щурів двох наступних поколінь, особливо в перші два місяці життя. Крім того, встановлено зміну їх масометричних показників: збільшення маси печінки в дослідних групах, зокрема F_1 та F_2 поколіннях.

Аналіз біохімічних даних крові та печінки щурів, одержаних під час виконання дисертаційної роботи, підтверджує порушення будови гепатоцитів, а саме руйнування їх клітинних мембран, про що свідчить підвищення ензимної активності амінотрансфераз у крові (особливо АлАт). Підвищення аланінамінотрансферазної активності та зниження коефіцієнту де Рітіса свідчить про печінкове походження цього ензиму. Зміни інших біохімічних показників, зокрема підвищення рівня молекул середньої маси у крові (показник інтоксикації організму), доводять токсичність цього гербіциду.

Дослідження показали, що у двох дослідних групах (IV та V група) підвищується рівень окиснювальної модифікації протеїнів, про що свідчить

зниження вмісту SH-груп і підвищення карбонільних похідних, які в подальшому стають чутливими до протеолізу. Одержані результати свідчать про підвищення рівня активних форм кисню, які сприяють ініціації вільнорадикальних процесів у клітинах печінки та нирок внаслідок вживання гербіциду разом з питною водою або за наявності його залишків у насінні сої. Крім того, спостерігається виснаження системи антиоксидантного захисту та порушення рівноваги у функціонуванні прооксидантно-антиоксидантної системи. Глутатіонпероксидазна та глутатіонтрансферазна активність знижується як в крові, так і в печінці й нирках щурів, які вживали гербіцид Roundup з питною водою та оброблену ним генетично модифіковану сою, що найбільше виражено в F₁ та F₂ поколіннях. Після вживання трансгенної сої, яку не обробляли гербіцидом, ензимна активність антиоксидантного захисту майже не змінюється порівняно з контрольною групою щурів.

Ключові слова: генетично модифіковані організми; трансгенна соя; гліфосат-резистентна соя; гепатоцити; гербіцид Roundup; детоксикація.

ABSTRACT

Chorna I.V. The effects of glyphosate-resistant genetically modified soybean on protein metabolism and on rats' antioxidant system. – The qualification scientific work as a manuscript.

The thesis for Candidate of Biology degree by speciality 03.00.04. - biochemistry- Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv, 2021.

One of the transgenic crops widely used both in agriculture and in the food industry is genetically modified soybean (GTS 40-3-2 line) with the new Roundup Ready trait. This transgenic soybean is resistant to Roundup herbicide due to the introduced gene of the *Agrobacterium tumefaciens* bacterium. The GM-soybean synthesizes bacterial 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphate synthase (EPSPS) replacing the herbicide-inhibited enzyme in the plant, hence, after Roundup herbicide application in the field, the transgenic soybean continues to grow, whereas weeds die. The widespread use of Roundup Ready transgenic soybean and Roundup herbicide gives rise to concern about their safety for the environment, animal and human health.

The thesis is devoted to the study of the long-term effects of glyphosate-resistant genetically modified soybean untreated and treated with Roundup herbicide and of the herbicide itself on female rat reproduction for two generations, on rat postnatal development and massometric parameters, on protein metabolism indicators (alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), creatinine, urea, uric acid and total protein) in tissues, urine and blood of three generations of rats. The content of carbonyl derivatives in tissues of three generations of rats and the state of their antioxidant protection system (concentrations of superoxide dismutase, catalase, glutathione and glutathione-dependent enzymes activity) were studied as one of the criteria for safety assessment of genetically modified organisms.

The comprehensive study of the common effect of Roundup herbicide (the main active substance is glyphosate) and genetically modified soybean GTS 40-3-2 on histochemical and biochemical parameters of tissues, blood and urine of three

generations of rats has been carried out for the first time; the impacts of both factors separately have been also investigated.

The thesis has confirmed the negative effects of Roundup herbicide and transgenic soybean GTS 40-3-2 treated with herbicide on both structure and function of rat kidneys and livers, namely, causing reversible cellular swelling in kidney and liver cells, which is the most pronounced in the third generations of rats. The results of the dissertation research show the ability of soybean seeds to accumulate the herbicide "Roundup", which can be partially neutralized due to heat treatment. It was found that long-term feeding of GM soy treated with the herbicide and the use of the herbicide "Roundur" together with drinking water leads to increased mortality of rats of the next two generations, especially in the first two months of life. In addition, the changes in their massometric parameters (an increase in liver mass among the experimental groups), especially in the F₁ and the F₂ generations of rats were established.

Analysis of biochemical data of rat blood and liver obtained during carrying out the thesis work confirms the hepatocytes structure disruption, namely, some damage to their cell membranes, as evidenced by an increase in the aminotransferase level in the blood (especially ALT). An increase in alanine aminotransferase activity and decrease in coefficient De Ritis Ratio (AST/ALT ratio) indicates the liver origin of this enzyme. Some changes in other biochemical parameters, in particular, an increase in the level of average molecules in blood (as indicator of intoxication) prove the toxicity of this herbicide.

Studies have shown that in two experimental groups (groups IV and V) the level of oxidative modification of proteins increases, as evidenced by a decrease in the content of SH groups and an increase in carbonyl derivatives, which subsequently become sensitive to proteolysis. The obtained results testify to the increase in the number of reactive oxygen species, contributing to the initiation of free radical processes in the liver and kidney cells of the rats received the herbicide with drinking water and the rats fed with soybean seeds, containing the herbicide residues. The depletion of antioxidant protection system and the oxidant-

antioxidant system imbalance have been also observed. The glutathione peroxidase and glutathione transferase activities also decreased in blood, livers, and kidneys of the rats received the Roundup herbicide with drinking water and of the rats fed with transgenic soybean treated with herbicide. The decrease was more pronounced for the F_1 and F_2 generations of rats. For the rats fed with untreated transgenic soybean the antioxidant protection enzymes activity remains almost unchanged compared to the control group.

Key words: genetically modified organisms, transgenic organisms, glyphosate-resistant, hepatocytes, Roundup herbicide, detoxification.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації у наукових фахових виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз

1. **Чорна І. В.**, Дроник Г. В. Метаболізм азотистих сполук у сироватці крові щурів трьох поколінь при вживанні гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої та гербіциду «Roundup». Біологія тварин. 2018. 20, № 4. С. 69–73. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*

2. **Чорна І. В.**, Дроник Г. В. Постнатальний розвиток приплоду самок щурів та масометричні показники органів щурів двох поколінь при вживанні генетично модифікованої сої та Раундапу. Біоресурси та природокористування. 2018. 10, № 3-4. С. 11–18. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*

3. **Чорна І. В.**, Дроник Г. В., Рогозинський М. С. Безпечність вживання гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої. Біологія тварин. 2018. 20, № 1. С. 40–48. *(Дисертантка здійснила аналіз та узагальнення літературних даних; підготувала текст статті і сформулювала висновки).*

4. **Чорна І. В.** Вплив гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої та гербіциду «Roundup» на рівень деяких метаболітів азотистого обміну у сечі щурів. Біоресурси та природокористування. 2018. 11, № 3-4. С. 5–15.

5. **Чорна І. В.**, Дроник Г. В., Давиденко І. С. Гістологічне дослідження печінки щурів, що вживали генномодифіковану сою, оброблену гербіцидом «Roundup». Вісник ОНУ. Біологія. 2018. 23, 1. С. 158-166. *(Дисертантка відібрала матеріал, підготувала проби та проаналізувала статистичні матеріали, власні дані підготувала текст статті, сформулювала висновки).*

6. **Чорна І. В.** Структурно-функціональний стан нирок щурів двох поколінь при вживанні гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої та гербіциду «Roundup» ScienceRise: Biological Science. 2019. 1, № 16. Р. 25–29.

7. **Chorna I. V.**, Dronik G. B., Lukashiv T. O., Yuzkova V. D. Oxidatively modified proteins in kidneys of rats fed with glyphosate-resistant genetically modified soybean and the herbicide Roundup. Regul. Mech. Biosyst. 2019. 10, № 3. Р. 319-325. (Web of Science). *(Дисертантка провела дослідження вмісту карбонільних похідних, сульфгідрильних груп та активності протеолітичних ферментів).*

Публікації, які додатково відображають наукові результати

8. Дроник Г. В., **Чорна І. В.**, Рогозинський М. С. Біологічне значення показників системи антиоксидантного захисту щурів при оцінці безпечності вживання генетично модифікованих організмів. Молодий вчений. 2018. 10. С. 461–469. *(Дисертантка зробила аналіз і узагальнення літературних даних; підготувала текст і сформулювала висновки).*

9. Дроник Г. В., **Чорна І. В.** Вплив традиційної та генетично модифікованої сої на рівень деяких метаболітів азотистого обміну в сироватці крові щурів. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2017. 18, № 2. С. 134–139. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*

Список публікацій, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

10. **Чорна І. В.** Вплив генетично модифікованої сої на індивідуальний розвиток та статеве дозрівання щурів. Тези конф. «Актуальні проблеми гуманітарних та природничих наук» (м. Київ, 28-29 жовт. 2016 р.). Київ, 2016. С. 57–59.

11. Дроник Г. В., **Чорна І. В.** Показники азотистого обміну щурів при вживанні трансгенної та нативної сої. Тези конф. «Сучасні тенденції розвитку

науки» (м. Харків, 26-27 трав. 2017 р.). Харків, 2017. С. 33–35. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*

12. Дроник Г. В., **Чорна І. В.** Масометричні зміни щурів при вживанні натуральної та генетично модифікованої сої. Тези XV Всеукр. наук. конф. «Актуальні питання біології та медицини» (м. Старобільськ, 25–26 трав. 2017 р.). Старобільськ, 2017. С. 71–73. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*

13. **Чорна І. В.**, Дроник Г. В., Вплив натуральної та трансгенної сої на концентрацію сечової кислоти в крові та у сечі щурів. Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. «Нове слово в науці і практиці: гіпотези і апробація результатів досліджень» (м. Київ, 23-24 черв. 2017 р.). Київ, 2017. С. 90-91. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*

14. Дроник Г. В., **Черная И. В.** Содержание средних молекул в сыворотке крови крыс при употреблении традиционной и трансгенной сои. Вестник современных исследований. Омск, 2017. № 6-1 (9). С. 7–8. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*

15. **Черная И. В.**, Дроник Г. В. Влияние нативной и генетически модифицированной сои на количество приплода и смертность первого потомства крыс. Материалы 21-й междунар. Пущинской школы-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 17-21 апр. 2017 г.). Пущино, 2017. С. 143–144. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала*

отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).

16. Дроник Г. В., **Чорна І. В.** Вплив традиційної та генетично модифікованої сої на рівень деяких метаболітів азотистого обміну в сироватці крові щурів. Матеріали 7-ї міжнар. наук.-практ. конф. «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування» (м. Львів, 4-6 жовт. 2017 р.). Львів, 2017. С. 134–139. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*

17. Дроник Г. В., **Чорна І. В.**, Рогозинський М. С. Вплив традиційної та генетично модифікованої сої на рівень креатиніну в сироватці крові у двох поколіннях щурів. Матеріали конф. «Актуальні питання сучасної науки» (м. ІваноФранківськ, 7-8 лип. 2017 р.). Івано-Франківськ, 2017. С. 37–38. *(Дисертантка провела дослідження рівня креатиніну в сироватці крові, опрацювала статистичні дані, брала участь у написанні тез).*

18. Дроник Г. В., **Чорна І. В.** Показники активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази в сироватці крові щурів, яким згодовували традиційну та генетично модифіковану сою. Тези конф. «Актуальні наукові проблеми. Розгляд, рішення, практика» (м. Одеса, 26-27 трав. 2017 р.). Одеса, 2017. С. 84–85. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*

19. **Чорна І. В.**, Дроник Г. В. Масометричні показники внутрішніх органів щурів двох поколінь при вживанні гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої та гербіциду «Roundup». Матеріали міжнар. літнього наукового симпозіуму «Інноватика в сучасній освіті та науці: теорія, методологія, практика» (м. Одеса, 26-27 лип. 2018 р.). Одеса, 2018. С. 76-78. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження,*

статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).

20. **Чорна І. В.,** Дроник Г. В. Вплив раундапостійкої генетично модифікованої сої та гербіциду раундап на рівень сечовини у сечі трьох поколінь щурів. Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. «Наука, технології, інновації: світові тенденції та регіональний аспект» (м. Одеса, 28-29 верес. 2018 р.). Одеса, 2018. С. 144–147. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*

21. **Чорна І. В.,** Дроник Г. В. Окислювальна модифікація білків в субклітинній фракції печінки щурів при довготривалому згодовуванні генетично модифікованої та традиційної сої. Матеріали III міжнар. наук.-практ. конф. «Теорія і практика актуальних наукових досліджень». Запоріжжя, 2018. С. 30–32. *(Дисертантка виконала експериментальну частину дослідження, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів та підготувала статтю до друку).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І	
ТЕРМІНІВ	15
ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	21
1.1. Безпечність вживання традиційної та гліфосат-резистентної сої, обробленої та необробленої гербіцидом Roundup	21
1.1.1. Хімічний склад традиційної та генетично модифікованої сої, їх вплив на організм тварин	23
1.1.2. Характеристика гербіциду Roundup, способи його надходження та біологічна дія в організмі тварин	28
1.2. Вплив генетично модифікованої сої та гербіциду на функціональну активність органів і систем	34
1.2.1. Постнатальний розвиток та масометричні показники щурів за вживання гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої	35
1.2.2. Морфологічні та гістохімічні особливості розвитку внутрішніх органів щурів за вживання гліфосат-резистентної сої та гербіциду	37
1.3. Показники протеїнового обміну як основні біохімічні маркери оцінки стану організму за дії токсинів гербіциду	40
1.3.1. Вплив генетично модифікованої сої на гематологічні та біохімічні показники щурів	41
1.3.2. Біологічна роль показників азотистого обміну та їх зміни за патологічних станів	48
1.4. Біологічне значення показників системи антиоксидантного захисту під час оцінки безпечності вживання генетично модифікованих організмів	52
1.4.1. Процеси утворення активних форм кисню та окиснювальна модифікація протеїнів в організмі тварин	53

1.4.2. Вплив трансгенної сої та гербіциду на прооксидантно-антиоксидантний стан клітин	60
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	66
2.1. Загальна методика та схема проведення дослідження	66
2.2. Основні методи досліджень.	67
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	80
3.1. Хімічний склад насіння традиційної і трансгенної гліфосат-резистентної сої	80
3.2. Особливості протеїнового обміну у щурів, яким згодовували трансгенну сою та гербіцид Roundup	84
3.3. Азотистий обмін щурів, за вживання трансгенної сої та гербіциду Roundup	106
3.4. Гістологічна оцінка печінки та нирок щурів за споживання трансгенної сої і гербіциду	114
3.5. Гістохімічні та біохімічні особливості окиснювальної модифікації протеїнів у нирках та печінці щурів, яким згодовували генномодифіковану та гербіциду Roundup	133
3.6. Вплив генетично модифікованої сої та гербіциду Roundup на ензимну активність антиоксидантного захисту	155
3.7. Постнатальний розвиток і масометричні показники щурів, яким згодовували гліфосат-резистентну сою оброблену гербіцидом Roundup	166
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	175
ВИСНОВКИ	190
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	193
ДОДАТКИ	215

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню

АлАт –аланінамінотрансфераза;

АОС –антиоксидантна система;

АсАт –аспартатамінотрансфераза;

ДТНБК 5,5'-дитіо-біс(2-нітробензойна) кислота

ГГТ – гама-глутамілтрансфераза

ГМО – генетично модифіковані організми

ГП – глутатіонпероксидаза

ГТ - глутатіонтрансфераза

КТ – каталаза;

ОМП – окиснювальна модифікація протеїнів

МСМ – молекули середньої маси

СОД – супероксиддисмутаза

R/B –коєфіцієнт співвідношення протеїнових карбонільних груп та аміногруп

SH – сульфгідрильні групи

ВСТУП

Актуальність теми. Зростаюча кількість населення Землі потребує нових джерел харчових продуктів, одним із яких є генетично модифіковані організми. Вони набули широкого застосування, невибагливі до кліматичних умов, стійкі до шкідників і гербіцидів, мають високу врожайність. Серед генетично модифікованих рослин найпоширенішими вважають такі культури, як соя, кукурудза, картопля, ріпак, бавовник, пшениця, ячмінь. Боби сої широко використовують у харчовій промисловості для виробництва багатьох продуктів харчування, що пов'язано з високим вмістом у них протеїнів і ліпідів, а також інших корисних речовин: вуглеводів, фосфатидів і вітамінів, макро- і мікроелементів. А в сої є і антипоживні речовини: інгібітори протеаз, лектини, сапоніни, уреаз, гемаглютиніни, конгліцінін, протеїн соїн [86]. У сільському господарстві широко використовують трансгенну сою з новою ознакою Roundup Ready. Така соя є стійкою до дії гербіциду Roundup, у якому основною діючою речовиною є гліфосат [72]. Вплив цієї речовини на організм людини і тварин ще досконало не вивчений, зокрема, на репродуктивну функцію та постнатальний розвиток тварин, на структуру та функціонування органів і їх систем, обмінні процеси. Гліфосат належить до фосфорорганічних сполук, є неселективним гербіцидом системної дії, який вважається найбільш малотоксичним для тварин і людини. Більшість фосфорорганічних сполук нестійкі у зовнішньому середовищі, розпадаються протягом 1-2 місяців [184]. Гранично допустима концентрація (ГДК) для різних фосфорорганічних сполук коливається від 0,02 до 0,5 мг/м³, ГДК у воді водойм – 0,02 мг/дм³ [88]. Отруєння може настати в результаті вдихання парів гербіциду, проникнення його через травний тракт і шкіру. За хронічного впливу на організм людини і тварин більшість фосфорорганічних сполук, зокрема гліфосат, має ефект функціональної кумуляції [88]. Окрім цього, інактивація таких сполук відбувається під час гідролізу чи взаємодії з протеїнами. Внаслідок їх

окиснення утворюються активні метаболіти, що можуть взаємодіяти з біомолекулами організму тварини та людини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана впродовж 2013–2019 років. Дослідження в межах дисертаційної роботи проводили на кафедрі біотехнології та екології Чернівецького факультету Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут» і в Буковинській державній сільськогосподарській дослідній станції НААН відповідно до завдання: 28.00.01.10 Ф «Вивчити біохімічні показники під час згодовування гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої у трьох поколіннях щурів» (ДР № 0116U001268). Дисертантка досліджувала вплив гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої на показники протеїнового обміну й антиоксидантну систему щурів.

Мета і завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи – з'ясувати вплив гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої, необробленої та обробленої гербіцидом Roundup, і вплив гербіциду на показники протеїнового обміну й антиоксидантну систему в трьох поколіннях щурів.

Для досягнення мети поставлено такі **завдання**:

- з'ясувати вплив гліфосат-резистентної сої та гербіциду Roundup на біохімічні показники протеїнового обміну в нирках, печінці, крові й сечі щурів;
- дослідити рівень молекул середньої маси в крові щурів трьох поколінь за умов впливу трансгенної сої та гербіциду Roundup;
- визначити показники азотистого обміну в крові та сечі щурів трьох поколінь за умов впливу гербіциду та генетично модифікованої сої;
- дослідити вплив генетично модифікованої сої лінії GTS 40-3-2 та гербіциду на морфологію нирок і печінки щурів трьох поколінь;
- з'ясувати вплив трансгенної сої і гербіциду Roundup на показники антиоксидантної системи та окиснювальну модифікацію протеїнів;

- оцінити вплив гліфосат-резистентної сої та гербіциду Roundup на показники народжуваності й постнатальний розвиток, а також на масометричні показники у трьох поколіннях щурів.

Об'єкт дослідження – стан антиоксидантної системи, протеїнового і азотистого обміну в тканинах та сечі щурів.

Предмет дослідження – активність ензимів антиоксидантного захисту, показники протеїнового і азотистого обміну за впливу гліфосат-резистентної сої та гербіциду Roundup на організм щурів.

Методи дослідження: фізико-хімічні (визначення фізико-хімічного складу насіння традиційної і трансгенної сої); біохімічні: фотоколориметричні (концентрація гемоглобіну, протеїнових фракцій крові, активність амінотрансфераз, продуктів окиснювальної модифікації протеїнів (ОМП), сульфгідрильних груп), спектрофотометричні (активність ензимів антиоксидантної системи, вміст молекул середньої маси); морфологічні (кількість формених елементів крові); гістологічні (зрізи нирок і печінки) та гістохімічні (коефіцієнт R/B); статистичні (визначення достовірності результатів досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше досліджено окремий та сумісний вплив гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої і гербіциду Roundup на показники протеїнового й азотистого обміну, активність антиоксидантної системи та репродуктивну здатність самок щурів. Доведено негативний вплив гербіциду Roundup та здатність накопичуватися у насінні трансгенної сої, яка стійка до його дії. Вперше показано, що досліджувані чинники можуть призводити до порушення функціонального стану печінки, прогресування синдрому ендогенної інтоксикації та ниркової недостатності. Вперше з'ясовано, що гербіцид здатний підвищувати інтенсивність вільнорадикальних процесів в організмі щурів, що призводить до окиснення біомолекул, а довготривала його дія – до виснаження ензимів системи антиоксидантного захисту. При цьому виявлені зміни викликають порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у

тканинах щурів F_1 і F_2 поколінь. Доведено, що за вживання генетично модифікованої сої, яка була оброблена гербіцидом, та гербіциду окремо призводить до зниження репродуктивної здатності самок щурів і збільшення смертності щуренят першого, а особливо другого покоління впродовж перших двох місяців.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дисертаційної роботи розширюють сучасні уявлення про вплив фосфорорганічних гербіцидів (зокрема й ті, що містять гліфосат) на організм тварин. Результати досліджень можна використовувати для обґрунтування антропоєкологічного ризику від забруднення фосфорорганічними гербіцидами (зокрема гліфосатом) водойм і сільськогосподарської продукції, що призводить до порушень в організмі тварин і посилення цього ефекту в наступних поколіннях. Теоретичні положення роботи можуть бути використані в курсах лекцій з екології, агроєкології, екологічної біохімії та екологічної токсикології у закладах вищої освіти. Результати роботи були включені в теми спецкурсу курсів підвищення кваліфікації вчителів біології, хімії, екології та природознавства Інституту післядипломної педагогічної освіти Чернівецької області.

Особистий внесок здобувача. Авторка самостійно виконала експериментальну частину дисертаційної роботи, проаналізувала стан проблеми на основі здійсненого інформаційного пошуку, підбрала і освоїла методи досліджень, здійснила статистичну обробку отриманих результатів, які проаналізувала й узагальнила. Дисертантка спільно з науковим керівником – д.б.н. Г. В. Дроником обґрунтувала концепцію дослідження, сформулировала основні положення, мету і завдання дисертаційної роботи. З наукових праць, опублікованих у співавторстві, у дисертації використано лише ті ідеї та положення, які є результатом особистої роботи здобувача. Конкретний внесок здобувача висвітлено в наукових публікаціях. Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на міжнародних науково-практичних конференціях: «Актуальні проблеми

гуманітарних та природничих наук» (Київ, 2016), «Сучасні тенденції розвитку науки» (Харків, 2017), «Нове слово в науці і практиці: гіпотези і апробація результатів досліджень» (Київ, 2017), «Вестник современных исследований» (Омск, 2017), «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2017), «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування» (Львів, 2017), «Актуальні питання сучасної науки» (Івано-Франківськ, 2017), «Актуальні питання біології та медицини» (Старобільськ, 2017), «Актуальні наукові проблеми. Розгляд, рішення, практика» (Одеса, 2017), «Теорія і практика актуальних наукових досліджень» (Запоріжжя, 2018), «Наука, технології, інновації: світові тенденції та регіональний аспект» (Одеса, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертації опублікована 21 праця, у тому числі 9 статей, з яких 7 статей у фахових наукових виданнях України, у тому числі 1 стаття у виданні, включеному до міжнародної наукометричної бази Web of Science, 12 – матеріалів і тез конференцій.

Структура та обсяг дисертаційної роботи. Результати роботи викладені на 218 сторінках комп'ютерного тексту. Дисертація складається з анотації, списку наукових публікацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень і їх обговорення, розділу узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, що містить 185 найменувань, у тому числі 32 латиницею. Дисертація ілюстрована 79 рисунками, містить 15 таблиць і 3 додатки.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Безпечність вживання традиційної та гліфосат-резистентної сої, обробленої та необробленої гербіцидом Roundup

В останні десятиліття поряд з традиційним методом селекції, що є інструментом досягнення бажаних властивостей рослинної культури стали методи біотехнології, зокрема генної інженерії. Такі методи полягають у зміні геному не тільки рослин (генній модифікації), але й інших організмів шляхом вилучення генів або їх конструкцій з ДНК організму-донора, та внесення їх в організм-реципієнта. Штучно внесені гени кодують бажану властивість чи ознаку (посухостійкість, морозостійкість, стійкість до дії гербіциду та ін.), при цьому генетично модифіковані рослини набувають нових корисних ознак. Внаслідок цього трансгенні рослини почали широко використовувати у сільському господарстві, медичній та харчовій промисловостях, та в інших сферах людської діяльності [19, 50, 121].

Внаслідок контрольованого та неконтрольованого вирощування трансгенних організмів у багатьох країнах, перед вченими постало питання про безпечність вживання таких рослин та продуктів харчування, що їх містять. Для перевірки безпечності таких генетично модифікованих організмів необхідно перевіряти наступні фактори: токсичність, стабільність внесених в них генів, здатність спричиняти алергічні реакції, вміст специфічних компонентів та інше [19, 50]. Хоча проведені чисельні наукові дослідження щодо впливу генетично модифікованих рослин та їх наслідків на організм тварин, однозначної відповіді вони не дали [46, 167, 179]. Разом з цим створюються нові генетично модифіковані організми, і тому необхідно проводити дослідження по кожному новому модифікованому організмі окремо та їх вплив на здоров'я людини та тварин.

Однією з найпоширеніших трансгенних рослин являється соя, що стійка до гербіциду Roundup, хоча і проводилися різні дослідження щодо впливу цієї трансгенної сої на організми різних тварин, питання про її

безпе́чність залишається відкритим [46, 48]. Соя, як традиційна так і генетично модифікована містить в середньому 38-42 % протеїну, унікальним за своїми властивостями, він здатний використовуватися організмом людини на 90 %. Також у сої містяться вуглеводи, жири, фосфатиди, мікро- та макроелементи, вітаміни та інші корисні речовини. Крім цього, як традиційна, так і трансгенна соя містить і антипоживні речовини. До антипоживних речовин відносять: інгібітори протеаз (інгібітори трипсину і хімотрипсину), лектини, сапоніни, антивітаміни, уреаза гемагглютиніни [86], конгліцінин, протеїн соїн, неперетравлювані вуглеводи — рафінозу та стахіозу, антиендокринні і рахіт-стимулюючі агенти [86, 107]. Більшість з цих речовин мають протеїнову структуру, тому вони інактивуються за дії високих температур [86, 92, 107], хоча після термічної обробки активними залишаються такі елементи, як ізофлавіони (геністеїн, дайдзеїн). У кишечнику ці речовини піддаються гідролізу та подальшому метаболізму, у результаті чого утворюються сполуки з естрогенною активністю: дейдзеїн, формонетин, біоканін-А, геністеїн та інші [92]. Саме тому необхідне детальне вивчення впливу цих антипоживних речовин, як традиційної, так і трансгенної сої на організм тварин.

Світовим лідером з виробництва та поставки трансгенної сої є американська фірма «Монсанто». У 1995 році ця фірма випустила генетично модифіковану сою з новою ознакою «Roundup Ready» (RR), що стійка до гербіциду «Roundup», основною дієюю речовиною якого є гліфосат. У 1970 році Джоном Францем, який працював в американській компанії «Монсанто», були виявлені гербіцидні властивості цієї речовини [121].

Для стійкості сої до гербіциду Roundup в неї був внесений ген бактерії *Agrobacterium tumefaciens*. Трансгенна соя синтезує бактеріальну 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтаза (5-enolpyruvylshikimat-3-phosphate synthase (EPSPS)), що замінює інгібований гербіцидом ензим в рослині [63]. Тому генетично модифікована соя стійка до гліфосату і продовжує рости при обробці поля гербіцидом Roundup, тоді як бур'яни, гинуть. Залишається до

кінця не вивченим чи міститься гербіцид у бобах генетично модифікованої сої в неактивній формі чи ні. Тому, дослідження впливу сої сорту Чернівецька 9 та гліфосат-резистентної сої (лінії GTS 40-3-2), яку обробляють і не обробляють гербіцидом Roundup є досить важливим завданням.

1.1.1. Хімічний склад традиційної та генетично модифікованої сої, їх вплив на організм тварин

Широкого розповсюдження у сільському господарстві набула соя. У харчовій промисловості соя використовується як наповнювач в забезпеченні якісним рослинним протеїном продуктів харчування: кондитерських, ковбасних, хлібобулочних виробів, олії, соуси та інше, адже боби сої містять до 42% протеїну [115]. Поживна цінність бобів визначається не тільки кількістю протеїну, але його якістю, яка залежить від збалансованості амінокислотного складу, вмісту незамінних амінокислот, перетравності та характеру впливу на засвоєння протеїну деяких неспецифічних факторів [141]. У бобових культурах, і зокрема сої, недостатній вміст сірковмісних амінокислот, триптофану, треоніну, валіну та ізолейцину, але багато лізину [116]. В сої, як і в інших бобових культурах містяться в достатній кількості вітаміни: β -каротин, піридоксин, рибофлавін, вітамін Е, ніацин, біотин, фолієва кислота, пантотенова кислота, тіамін, холін [39, 86]. Причому, встановлено, що в бобах сої міститься 16-30% жиру, 22-26% вуглеводів, а також макро- й мікроелементи (фосфор, магній, калій, кальцій, сірка, хлор, кремній, марганець, натрій, залізо, йод, бор, алюміній, мідь та інші). У насінні сої міститься у шість разів більше вітаміну B_2 ніж у пшениці, ячменю, вівса, гороху та у три рази більше вітаміну B_1 ніж у сухому коров'ячому молоці [142, 143]. Залізо сої засвоюється в організмі свиней на 80%, що в 2-3 рази більше ніж з інших рослинних кормів [143].

Порівнявши літературні джерела [115, 141], у яких вивчався хімічний склад генетично модифікованої сої та декількох сортів традиційної сої можна впевнено сказати, що склад органічних речовин у насінні сої приблизно

сталий. Вміст золи знаходиться від 5,41 до 5,99%, тобто в межах допустимої похибки. А ось кількість протеїну, жиру, клітковини кожного окремо різна. Причому значно вищий вміст протеїну і клітковини у зразках бобів сої немодифікованих рослин, а рівень жиру, навпаки, вищий у насінні трансгенних культур [111, 141].

Результати досліджень показали, що протеїн сортів сої “Агат”, “Юг-30”, Київська- 27”, Чернівецька 8, Чернівецька 9 за амінокислотним складом близький до ідеального. Протеїн насіння сої трансгенних рослин у насінні становить 29,5% та він менш цінний порівняно з протеїном їх немодифікованих аналогів (вміст протеїну 37,5%) [141]. Крім того, у сортах сої Чернівецька 8 та Чернівецька 9 вміст протеїну складає 40,45 та жиру 19,3%, а вміст лізину досить високий. За амінокислотним складом боби генетично модифікованої сої мали низький вміст лізину, а сума незамінних амінокислот була на рівні 35,91%, 41,09%, 37,70%, вміст замінних амінокислот, при цьому, вищий порівняно з аналогами [108, 111]. Тому фізіологічна цінність протеїнів сої генетично модифікованих рослин значно нижча від аналогів (сортів сої Чернівецька 8 та Чернівецька 9).

Розглянемо, які саме антипоживних речовин містяться у насінні сої та який можливий вплив їх на організм тварин. У насінні сої, як традиційної, так і трансгенної містяться антипоживні речовини такі як інгібітори протеаз; антивітаміни А, D, E, B₁₂; сполуки, що знижують доступність деяких мікроелементів (Zn, Mn, Cu, Fe); алкалоїди; лектини або фітогемаглютеніни; алергени; антигормони, що викликають зоб, і естрогенні ізофлавіони – геністеїн і даїдзеїн; олігосахариди – стахіоза, рафіноза й вербаскоза, які викликають метеоризм; ензими – уреаза, ліпаза й ліпоксигеназа [39, 116]. Антипоживні речовини викликають у тварин пригнічення росту, зниження ефективності використання корму, захворювання щитовидної залози, гіпертрофію підшлункової залози, гіпоглікемію і порушення діяльності

печінки та їх загибель [105]. Отже, розглянемо окремо кожний вид антипоживних речовин та їх вплив на організм тварин.

До інгібіторів протеаз, що входять в боби сої відносяться інгібітори трипсину та хімотрипсину, саме ці речовини захищають їх від поїдання птахами, гризунами та від розвитку в них мікрофлори. У випадку, коли сира соя вживається нежуйними тваринами, в їх організмі інгібітори протеаз, які містяться в сої, зв'язують ензими трипсин та хімотрипсин тварин, і, тим самим, знижується ефективність перетравлення протеїну корму. Згодовування нативних бобів сої веде до зниження темпів росту тварин і до зменшення коефіцієнту конверсії кормів. У сирих бобах сої присутні два основні інгібітори протеаз – інгібітор Кунітца й інгібітор Баумана-Бірка [116]. Останній більш стійкий до дії температури, лугів та кислот. У сирих бобах сої наявність цих інгібіторів складає 1,4% і 0,6%, відповідно. Максимально допустима активність інгібіторів трипсину для молодняку тварин 3 мг/г сої або на кожні 10% протеїну повинно припадати не більше 1 мг/г інгібіторів трипсину [116].

Лектини або фітогемаглютеніни у насінні сої складають до 3%, із ними пов'язують токсичність бобів сої, оскільки виникають множинні тромбози в капілярах слизової оболонки шлунково-кишкового тракту тварин, що призводить не тільки до різкого зниження засвоєння їжі, але й до значного розладу функції травлення [9]. Установлено, що, крім еритроцитів, лектини можуть аглютинувати й інші тваринні клітини, зокрема епітеліальні клітини слизової оболонки кишечника й лімфоцити. Соеві лектини зменшують синтез та секрецію інсуліну в щурів [106] і цим самим підвищують виділення азоту з сечею, вказуючи на зв'язок із протеїновим обміном [107]. У насінні сої сапонінів порівняно небагато (0,43-0,83 %) [105]. В якості антипоживного фактора їх роль не визначена.

До антипоживних речовин, що викликають гормональні розлади у тварин, відносяться глюкозиди, які належать до групи естрогенних

ізофлавонів, таких як геністеїн і даїдзеїн, вміст яких близько 0,1 % у протеїну бобів сої. Вони в експериментах на самках щурів і мишей викликали естрогенну реакцію та знижували вміст кальцію в кістках, що сприяло розвитку рахіту [105]. Досить шкідливі естрогенні ізофлавоони для репродуктивного здоров'я тварин. Вони блокують ароматазу, це ензим який перетворює андрогени в естрогени, а в самців – 5-альфа-редуктазу, що пригнічує синтез дигідротестостерону [177]. Також естрогенні ізофлавоони пригнічують секрецію лютеїнізуючого гормону та стимулюють синтез печінкою протеїну який зв'язує вільні статеві гормони [92].

Термічно необроблене зерно сої також містить антивітаміни, що можуть спричинити рахіт у птахів [154]. Сира соя в птиці викликає підвищену потребу у вітаміні Е. Про дефіцит вітаміну Е судили за швидкістю росту наявності ексудативного діатезу, розм'якшенню мозку і смертності [154]. Руйнування вітаміну Е відбувається під дією α -токоферолоксидази, що міститься в сирому зерні сої. У зерні сої виявлені термостабільний антивітамін А та термолабільний антивітамін В₁₂ [105, 154].

У бобах сої виявлені протеїни гліцинін і β –конгліцинін [105], які в молодняку тварин викликають алергічну реакцію. Відомі випадки алергічних реакцій і в людей, ці алергени стійкі до термічної обробки.

Сира соя містить металозв'язуючі речовини, що знижують також доступність таких мікроелементів як цинк, марганець, мідь і залізо. Високу спорідненість до іонів металів мають протеїн-фітинові комплекси [106].

У зерні сої містяться олігосахариди, що викликають метеоризм. Це відбувається, тоді коли для годівлі використовують корми, що містять неперетравлювані організмом моногастричних тварин олігосахариди, такі як: стахіоза, рафіноза й вербаскоза, які споживаються мікрофлорою кишечника. Частина цих олігосахаридів під час замочуванні насіння сої протягом 2-х годин переходить із бобів у воду.

Боби сої містять також ліпазу і ліпоксидазу, які викликають гідроліз і окиснення соєвого жиру, при цьому утворюються окисненні продукти

поліненасичених жирних кислот, які проявляють високу біологічну активність по відношенню до клітинних мембран. При високій концентрації їх в кормі може спостерігатися отруєння тварин. Термічна обробка зерна інактивує ці ензими, що зменшує вміст пероксидів ліпідів та вільних жирних кислот навіть при тривалому зберіганні сої [106].

До антипоживних речовин сої належить уреаза, під дією якої відбувається гідроліз сечовини до аміаку і вуглекислого газу. Крім того, уреаза в шлунку тварини розщеплює сечовину шлункового соку, чим зумовлює залужнення середовища навколо часточок корму, що перешкоджає дії пепсину. Саме розщеплення уреазою сечовини у кишковому соку зумовлює вивільнення аміаку, який є токсичним для організму тварин. Визначення активності уреази дає змогу непрямим методом оцінити необхідну ступінь обробки бобів сої. Безпечна активність уреази в термічно обробленому зерні сої та продуктах його переробки повинна становити не більше 0,05 од. рН, на відгодівлі – 0,1 од. рН, для корів – 0,2—0,3 од. рН [105].

Отже, перед згодовуванням кормів тваринам, які містять насіння сої їх необхідно піддавати термічній обробці. Низькомолекулярні сполуки – антигормони і антивітаміни мають високу термостабільність. Контроль за знешкодженням антипоживних речовин і придатність кормів з соєю до згодовування тваринам проводиться шляхом визначення активності інгібіторів трипсину.

Саме інгібітори трипсину володіють приблизно половиною антипоживної активності серед усіх антипоживних сполук бобів сої, вони найбільш термостабільні порівняно з іншими протеїновими антипоживними речовинами. За активністю уреази визначають ступінь термічної обробки насіння сої, інактивація якої відбувається паралельно з інактивацією інгібіторів трипсину (за стандартною вологістю). Підвищення вологості бобів пришвидшує інактивацію уреази і навпаки уповільнює інактивацію інгібіторів трипсину, зокрема у соєвому «молоці» уреаза зникає вже після

першої хвилини його кип'ятіння, тоді як активність інгібіторів трипсину в цих умовах зберігається протягом 1-1,5 години [154]. У бобах сої активність інгібіторів трипсину вважається безпечною для молодняку тварин – 3 мг/г, а величина активності уреазі не повинна перевищувати 0,05 умовної одиниці рН (для дорослих тварин ці показники у двічі більші) [105, 116].

Крім того, висока температура обробки насіння сої також негативно впливає на доступність лізину сої. При баротермічній обробці втрачається 15-20 % лізину, при прожарюванні його вміст може знизитись удвічі, саме тому до кормів доцільно додавання лізину в раціони (особливо для моногастричних тварин) [116, 154].

1.1.2. Характеристика гербіциду «Roundup», способи його надходження та біологічна дія в організмі тварин

Однією з найважливіших причин широкого використання генетично модифікованих рослин є їх стійкість до гербіцидів, адже найефективнішим та економічно рентабельним на сьогодні є хімічний метод контролювання росту бур'янів. З моменту відкриття явища вибіркової фітотоксичності вважалося, що стійкість чи чутливість рослин до того або іншого гербіциду є видовою ознакою. Однак при довготривалому застосуванні одних й тих же гербіцидів, у популяціях чутливих до даних препаратів видів бур'янів було виявлено високостійкі біотики. У зв'язку з цим виникла необхідність відрізняти різні види стійкості рослин до гербіцидів, для цього американським товариством гербологів було запропоновано вживати терміни «толерантність» та «резистентність» [184]. Толерантність означає природжена здатність видів рослин до виживання і відтворення після обробки гербіцидом, а резистентність являється успадкованою здатністю рослин виживати і відтворюватися після впливу гербіциду в дозі, зазвичай летальній для дикого типу. У рослин резистентність може бути природною або індукованою з використанням, наприклад, таких методів, як генна інженерія або селекція [32].

Біотехнологічним шляхом ген CP4 EPSPS було привнесено у геном сої, утворюючи при цьому стійку до гліфосату лінію 40-3-2, саме це дало початок нової ери комерціалізації трансгенних ліній стійких до гербіцидів сільськогосподарських рослин, таких як, соя, кукурудза, ріпак, бавовна, цукровий буряк, тощо. В Україні інтерес до виробництва сої зростає з кожним роком, так за даними Держкомстат України у 2018 році валовий збір сої становив 4,46 млн. т., експортовано 2,8 млн. т., а до 2021 року планується зібрати до 6,0 млн. т. При цьому, за неофіційними даними, в Україні близько 80 % нелегально вирощується гліфосат-резистентна генетично модифікована соя, лінії 40-3-2 [130]. Враховуючи той факт, що за останніми даними показано онкогенну властивість гліфосату на здоров'я людини, що збільшує ризики виникнення “Неходжкінської” лімфоми [130]. В європейських країнах вже діє заборона на використання гліфосату, а слідових кількостей жорстко регламентуються у кінцевій сільсько-господарській продукції [130, 168].

Гліфосат (N-(фосфометил)-гліцин, $C_3H_8NO_5P$) – похідний амінокислоти гліцину і на сьогоднішній день це найпоширеніший гербіцид широкого спектру дії у світі [121, 168]. Токсична дія гліфосату обумовлена тим, що цей гербіцид інгібує ензим 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат синтазу. А цей ензим синтезує хоризмат – рослинний попередник трьох ароматичних амінокислот: фенілаланіну, тирозину, триптофану та деяких інших важливих компонентів рослин. Коли він попадає на рослину він блокує синтез цих важливих амінокислот і рослина гине, але синтез цих амінокислот у тварин відбувається іншим шляхом і тому не інгібується гліфосатом [184]. Тому гліфосат відноситься до малотоксичних гербіцидів, що підтверджується його летальною дозою $LD_{50}=5600$ мг/кг маси під час внутрішнього застосування в експериментах на щурах. Генетично модифікована соя (ГМ-соя) містить повну копію гену 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат синтази з ґрунтової бактерії *Agrobacterium sp. strain CP4*, що робить сою стійкою до гербіциду Roundup (що містить гліфосат), який застосовують для боротьби з бур'янами [175].

Виробники гербіциду Roundup стверджують, що він не включається до метаболізму рослиною та дуже швидко виводиться, не завдаючи шкоди. До кінця не вивчено чи залишається гербіцид в неактивній формі в тканинах рослини, і як вони себе можуть поводити в харчових ланцюгах. Групою вчених була висунута версія, що цей гербіцид може накопичуватися у рослинах та негативно впливати на тварин [72, 75, 178]. Механізм стійкості трансгенної сої до гліфосату здавалось би не мав викликати хвилювань, щодо використання ГМ-сої у харчових продуктах, але встановлено, що водна витяжка з ГМ-сої призводить до пригнічення росту рослин: раундапостійкої сої пригнічує в 1,9-2,5 раз, інтенсивність росту проростків зерна пшениці, жита і тритикале в декілька раз, порівняно з такою ж витяжкою традиційної сої [75, 76].

Дослідження, які проводилися українськими вченими показали, що при кип'ятінні в дистильованій воді внутрішніх органів щурів (печінки, серця, нирок і легень) у водний розчин переходять термостійкі водорозчинні протеїни, нуклеїнові кислоти, мінеральні речовини та інші низькомолекулярні сполуки [75]. У розчин також можуть потрапляти плазмідні, тобто кільцеві структури ДНК агробактерій, бо продукти синтезу гена *Agrobacterium tumefaciens* є в бобах трансгенної сої (тобто токсичні низькомолекулярні сполуки чи залишки гліфосату та його проміжні метаболіти). Результати досліджень показали, що водний екстракт внутрішніх органів щурів, які споживали довгий час трансгенну сою, містить біологічно активні сполуки, які призвели до активного розмноження і підвищення життєздатності інфузорії. Існує ймовірність, що в організмі тварин та людини ці сполуки можуть стимулювати до неконтрольованого розмноження деяких видів клітин [72].

Французькі науковці вивчали механізми токсичного впливу чотирьох різних за складом гербіцидів Roundup на клітини людини [156]. Дослідження проводилися на клітинах пуповинної крові новонароджених, при цьому брали мінімальну концентрацію гербіциду Roundup. В ході експерименту

було виявлено пошкодження клітинних мембран і ДНК. «Roundup» перешкоджає і клітинному диханню. Порушення окиснення в дихальному ланцюзі може призвести до утворення вільних радикалів, які призводять до окиснення біомолекул: протеїнів, ліпідів, вуглеводів. Дослідники стверджують, що до складу гербіциду Roundup входять і інші речовини, що посилюють дію основної речовини – гліфосату [156].

Основні шляхи потрапляння гербіциду Roundup до організму тварин та людини – через воду, через насіння або вегетативну частину трансгенних рослин, які оброблялися цим гербіцидом. Окрім того, можливі й інші шляхи потраплення його до організму людини – через різні ланцюги живлення. Надходження пестицидів в організм людини з продуктами харчування становить 95%, з водою – 4,7%, з атмосферним повітрям – 0,3% і зовсім незначні кількості їх проникають в організм через шкіру [32].

Результати дослідження впливу гербіциду Roundup та інших гербіцидів на організм риб при їх потраплянні у відкриті водойми показали, що в результаті поширення процесу вакуольно-крапельної дистрофії спостерігається некроз клітин печінки коропів [49]. Внаслідок пошкодження печінки гербіцидами утворюється вогнище некрозу, що призводить до виходу кальпаїну та гідролізу протеїнів плазматичної мембрани сусідніх клітин. Цей висновок підтверджується даними зменшення вмісту загального протеїну в печінці коропа [49]. Багато дослідників показали високу чутливість личинок риб до дії забруднювальних речовин, зокрема гербіциду Roundup, які потрапляють у водне середовище, та навіть у невеликих концентраціях вони згубно впливають на розвиток і виживання гідробіонтів [75, 76, 175]. Негативний вплив гербіциду спостерігається на ранніх стадіях онтогенезу риб, призводячи до загибелі ікри та личинок, що, в свою чергу, впливає на процес відтворення та чисельність особин у популяції [32; 156].

Інші дослідження [180], показують, що гліфосат може блокувати деякі ензими, які необхідні для нормального функціонування організму тварин. В цих дослідженнях показано, що ензими кишечника, які дозволяють виводити

токсини з організму, не функціонують внаслідок вживання гліфосат-резистентною соєю тваринами.

Дослідники з Орхуського університету в Данії досліджували різні звіти фермерів на прохання данського міністра сільського господарства [181]. Мартін Тан Соренсен вивчив кілька досліджень, проведених раніше, що виявили ризики пов'язані зі здоров'ям худоби через вплив гліфосату. Дані свідчили про те, що гліфосат найбільше впливає на худобу під час чутливих етапів життя тварини. Він досліджував згубний вплив гліфосату на мікроорганізми в шлунково-кишковому тракті тварин. Також було помічено, що гліфосат може пригнічувати доступність мікроелементів, які впливають на різні функції в організмі сільськогосподарських тварин [180].

Гліфосат не тільки порушує життєвий цикл корисних бактерій в шлунково-кишковому тракті, але й виснажує імунітет тварин і робить їх більш схильними до хвороб. У рогатої худоби спостерігалось збільшення кількості бактерій, зокрема *Clostridium botulinum*, грампозитивної бактерії роду костридій, яка викликає ботулізм. Така хвороба значно поширилась в Німеччині, але це не єдина інфекція, яка була знайдена у сільськогосподарських тварин, що споживали генетично модифікований корм. Також було встановлено, що сальмонели і клостридії мають високу стійкість до гліфосату, але саме гірше те, що корисні бактерії, такі як *Enterococcus*, *Bacillus* і *Lactobacillus* виявилися найбільш вразливими і були практично знищені гліфосатом. Без достатньої кількості корисних бактерій, кишечник худоби стає живильним середовищем для патогенних мікроорганізмів [181].

Інші дослідження показали шкоду, яку гліфосат викликає в організмі ссавців [184]. Виявлено, що він пригнічує у людини ензим цитохром P450, який допомагає організму виводити шкідливі хімічні речовини. Це означає, що гліфосат викликає хімічне перевантаження в організмі, змушуючи організм бути перенасичений великою кількістю хімікатів, і алюмінієм, свинцем, миш'яком чи будь-якою іншою токсичною речовиною [184].

У 2015 році Чарлез Бенбрук і Філіп Лендріган разом з співавтором в Журналі медицина Нової Англії розглянули перспективу подальшого використання гербіциду (діючою речовиною яких є гліфосат). Вони також закликали уряд Сполучених Штатів провести нові оцінки безпеки гліфосату, які були оголошені вірогідним людським канцерогеном [171].

Останніми роками проведено багато досліджень щодо впливу генетично модифікованої гліфосат-резистентної сої на мікроорганізми, тварин та рослин [32, 172, 177]. Також були проведені дослідження які показали, що під час вживання гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої спостерігалось підвищення рівня молекул середньої маси у крові щурів, зростання активності лужної фосфатази в трьох покоління та активностей АлАт і АсАт в сироватці крові щурів у двох поколінь (F_1 та F_2), це може свідчити про ураження гепатоцитів печінки та про ушкодження печінкових жовчних шляхів, що підтверджуються й іншими дослідженнями [26]. Слід відзначити, що короткотривале згодовування трансгенної сої тваринам не виявили метаболічних порушень, також спостерігаються зміни біохімічних показників щурів двох поколінь, у раціоні яких 50 % за необхідністю в протеїнах було замінено на гліфосат-резистентну трансгенну сою [26], подібний результат спостерігався і у дослідженнях на свинях [53].

Отже, в десять років проводилися експериментальні дослідження у яких вивчався вплив гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої та гліфосату, які показали шкідливу дію цих факторів на організм людини та тварин. Крім того, експериментально підтверджено, що гербіцид Roundup здатний накопичуватися, як у насінні гліфосат-резистентної сої, так і у внутрішніх органах тварин, що її споживали. Інший спосіб потрапляння гербіциду до організму тварин і людини через питну воду внаслідок обробки полів, хоча дослідження сумісної дії цих двох факторів в достатній мірі ще не вивчено.

1.2. Вплив генетично модифікованої сої та гербіциду на функціональну активність органів і систем тварин

Вплив гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої обробленої гербіцидом Roundup та самого гербіциду на організм тварин і людини може супроводжуватися різним спектром токсичних ефектів. Крім того і сама трансгенна соя може містити токсичні чи алергенні протеїни (наприклад, Gly-m-Bd-30-K), що також, очевидно, впливають на організм тварин. Вживання трансгенної сої, обробленої гербіцидом, та гербіциду разом з питною водою може призвести до пошкодження внутрішніх органів (легень, шлунка, нирок, печінки) та розвитку шкірних захворювань (виразки, екземи, алергічних реакцій) [68, 121, 122, 123]. Такі метаболічні порушення також залежать і від тривалості вживання трансгенної сої. Саме під час тривалого вживання спостерігається більш виражена негативна дія трансгенної гліфосат-резистентної сої та гербіциду.

Найбільш характерним для харчового отруєння гліфосат-резистентною соєю та гліфосатом є ураження нирок і печінки, що супроводжується порушенням жирового обміну, розвитком фіброзу, некрозу, порушенням функції мембран мітохондрій та ішемією [158, 161]. Такі дані підтверджуються дослідженням здоров'я фермерів в Шрі Ланці, які застосовували Roundup без захисних масок і пили воду з підвищеним вмістом гліфосату [170]. У них спостерігалось пригнічення активності ензиму цитохрому P450 (CYP1A1/2 і CYP3A), що бере участь в детоксикації багатьох ксенобіотиків, і як наслідок – систематичне посилення впливу інших токсинів, які потрапляють в організм [170].

Результати ряду досліджень вказують на негативний вплив гліфосату на репродуктивну функцію ссавців. Гербіцид Roundup порушує функції репродуктивної системи чоловіків, викликаючи, опосередковану кальцієм, загибель клітин в сім'яниках і клітинах Сертолі [160, 162].

За останні роки з'явилися дані зарубіжних і вітчизняних досліджень щодо гострої токсичності гліфосату, оскільки отримані відхилення гематологічних та біохімічних показників крові лабораторних тварин [90, 117]. В дослідженнях на мишах встановлено значні зміни гематологічних показників зі зменшенням числа еритроцитів, гематокрита і гемоглобіну, а також значний макроцитоз у мишей обидвох статей [97, 117].

1.2.1. Постнатальний розвиток та масометричні показники щурів за вживання гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої

Серед усіх сільськогосподарських культур соя, у тому числі й генетично модифікована, характеризується найвищим вмістом протеїну саме тому її широко застосовують, як у тваринництві так і в харчовій промисловості. У бобах сої присутні фітоестрогени, які можуть мати негативний вплив на організм тварин. Проведений біохімічний аналіз показав [73], що фітоестрогени подібні за структурою й молекулярною масою до ендогенних естрогенів тварин. Саме завдяки цьому вони можуть розпізнаватися та зв'язуватися з естрогенними рецепторами, хоча вони не депонуються в організмі тварин. У печінці фітоестрогени можуть утворювати комплекс із глюкуроновою кислотою, який виводиться із жовчю або сечею. Отже, фітоестрогени традиційних сортів сої та ГМ-сої мають потенційну здатність модифікувати механізми, що регулюють статевий цикл і репродуктивну функцію людини та тварин [73, 126]. Ізофлавоноїди рослин, можуть викликати у тварин негативні наслідки. Так у самок тварин, які харчувалися рослинами багатими ізофлавоноїдами, відзначена поява (поза вагітністю) ознак лактації; це явище спостерігалось навіть у самців [73]. У баранів, що харчувалися конюшиною, відзначили зниження концентрації сперматозоїдів у еякуляті, після чого було проведено низку досліджень, що підтвердили гіпотезу про негативний вплив фітоестрогенів на ембріональний розвиток щурів [73] та активність сперматозоїдів у самців свиней [79]. Саме

тому важливим є вивчення впливу традиційної й трансгенних сортів сої на репродуктивну функцію самок щурів, а також на масометричні показники їх внутрішніх органів. Як, свідчать літературні джерела вживання трансгенної сої впливає і на наступне покоління тварин [39, 124], саме тому постнатальний розвиток потомства тварин та їх масометричні показники залишаються не менш важливими. Експериментальні дослідження [39], які проведені раніше показали, що вживання натуральної та гліфосат-резистентної генномодифікованої сої за 40 днів до запліднення, а також під час вагітності призвело до зниження їх фертильності та підвищення доімплантаційної смертності, що може бути зумовлено залишковою активністю ізофлавононів у насінні сої, які мають естрогенну дію. Споживання самками щурів дослідних груп трансгенної сої пригнічує життєздатність приплоду в перші два місяці життя, хоча не виявлено суттєвих відмінностей у натальному та постнатальному розвитку приплоду, отриманого від самок, яким згодовували натуральну сою. Коефіцієнти маси внутрішніх органів у самок, що вживали нативну та генетично модифіковану сою знижувалися для серця на 6,5 % та 10,9 % і печінки – на 0,7 % і 4,9 % та зростали на 12,2 % і 17,1 % для селезінки, порівняно з контролем. Подібні результати одержані іншими вченими, які проводили дослідження на мишах [183], свинях [73] та інших тварин [77, 68], що свідчить про те, що не тільки залишкова активність ізофлавононів у ГМ-сої може впливати на репродуктивну функцію та розвиток тварин, а наявність у ній інших сполук [126].

Інші експериментальні дослідження показали, що трансгенна соя при її згодовуванні поросяткам із 2-х місячного віку упродовж 3-х поколінь викликає відсутність статевого потягу в 75 % кнурців. Такий результат пояснюється тим, що в ГМ-сої наявні високоактивні токсичні сполуки, які синтезовані генами ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens* та залишки гліфосату в бобах [79].

Експерименти, в яких досліджувався постнатальний розвиток курчат при вживанні гліфосат-резистентної сої показали: що із 38 курчат загинуло 28,

що становить 73 %. При розтині трупів курчат ніяких патологічних змін органів травлення та залоз внутрішньої секреції і кишечника не виявлено, крім того, вчені стверджують, що вміст ізофлавонів у насінні сої не могли бути причиною падіжу курчат, які вживали сою протягом 2-місяців. Низька життєздатність курчат є наслідком наявності у ГМ сої неприродних пептидів протеїну, очевидно, сполук гліфосату з тирозином, триптофаном і фенілаланіном [77]. У гліфосат-резистентній сої нижчий на 30 % вміст ароматичних амінокислот порівняно з традиційною соєю [77, 81]. Довготривале згодовування трансгенної сої курчатам і куркам-несучкам викликає низьку запліднювальну здатність яєць цих курок-несучок і дуже низьку життєздатність потомства [77].

Дослідження впливу гліфосату, окремо так і з іншими харчовими добавками призвело також до небажаних результатів: зниження маси тіла та органів, зниження імунітету та інше [73, 81]. Основним фактором зниження маси тіла щурів є уповільнення енергетичного метаболізму в клітинах під впливом гліфосату [114, 132, 133]. Саме тому, який фактор вживання генетично модифікованої сої чи гербіциду має більший вплив на масометричні показники, фертильність та постнатальний розвиток, чи можливо ці два фактори підсилюють дію один одного необхідно ще вивчати.

1.2.2. Морфологічні та гістохімічні особливості розвитку внутрішніх органів щурів за вживанні гліфосат-резистентної сої та гербіциду

Проведені чисельні дослідження щодо впливу гліфосат-резистентної сої та гліфосату на внутрішні органи щурів, показали, що довготривале вживання генетично модифікованої сої (15-20% на яку було замінено стандартний корм) спричинює набряк та дистрофічні зміни наднирників, нирок та печінки, що призводить до зменшення адаптаційних можливостей органів. Українськими вченими були проведені дослідження впливу

генетично модифікованої сої на метаболізм та гістологію печінки і нирок щурів двох поколінь, у раціоні яких 50 % за необхідністю в протеїнах було замінено на гліфосат-резистентну трансгенну сою. Тривалість згодовування сої щурам становила дев'ять та три місяці. Результати досліджень показали, що підвищення катаболізму протеїнів у тканинах печінки та нирок супроводжується низькоенергетичними переміщеннями в аденіловій системі, це свідчить про швидкість старіння організму [38]. Такий факт підтверджується дослідженнями морфологічних параметрів печінки та нирок іншими науковцями [38,122]. Вчені припускають, що такі зміни можуть бути пов'язані з потраплянням в організм щурів гербіцида Roundup, який може міститися в невеликих кількостях у сої. Короткотривале згодування сої тваринам не призводить до метаболічних порушень. Подібні результати були одержані і багатьма іншими дослідниками [24, 38, 78, 80], що також підтвердили негативний вплив гліфосат-резистентної генетично-модифікованої сої на будову внутрішніх органів, що проявляється у порушенні структури та некрозу окремих клітин у більшості органів, зокрема печінці та нирках. В інших експериментах проводили дослідження впливу гліфосату як на біохімічні показники [24], так і на гістологічні [35], що показали токсичний вплив гліфосату як окремо, так при комбінованій дії малих доз з плюмбум ацетату, купрум сульфату та гліфосату. У тканині печінки спостерігається явище некрозу та дистрофії, які асоціюються зі значною клітинною інфільтрацією за дії вище зазначених факторів, а також виявлені структурні зміни в нирках статевонезрілих щурів під час впливу даних ксенобіотиків, що вказує на порушення функції цього органу. Зокрема, вживання як трансгенної сої так і гліфосату призводить до зниження відтворювальної здатності самок щурів [41, 35, 123], крім того вживання ГМ-сої призводить до зменшення секреції глікозаміногліканів, що призвело до послаблення бар'єрного захисту, ушкодження епітеліальних клітин, розвитку атрофічних процесів у міометрії та ендометрії, кистоподібного розширення одних маткових залоз і вакуольної дистрофії епітелію інших, лімфоїдно-

гістіоцитарної інфільтрації власної пластинки ендометрію, що вказувало на зниження морфофункціонального (репродуктивного) стану матки. Саме можливо і з цим пов'язано зменшення приплоду другого покоління, які підтверджують й інші дослідження [122]. Основні прояви дії гліфосату – це зміни у структурі та функціях органів, а системна дія гліфосату та бензоату на організм щурів викликає розвиток міокардіальної дистрофії, набряк легень і гепатодистрофію. Результати біохімічного дослідження крові свідчать, що всі три речовини негативно впливають на паренхіму печінки, що проявляється різною мірою. Гліфосат викликає розвиток повторних дистрофічних процесів, таких як гранулярна дистрофія. У комбінації з бензоатом натрію і сахарином спостерігали ознаки токсичної гепатодистрофії або масового прогресуючого некрозу паренхіми печінки, тобто процеси, які поєднують глибокі дистрофічні і некротичні, часто незворотні, процеси. Таким чином, вивчення сумісної дії генетично модифікованої сої та гербіциду «Roundup» на будову та функціонування нирків і печінки, що містить гліфосат є важливим.

1.3. Показники протеїнового обміну як основні біохімічні маркери оцінки стану організму за дії токсинів гербіциду

Протеїновий обмін специфічний і забезпечує безперервність відтворення й оновлення протеїнів організму. Характерною особливістю є його розгалуженість: в обміні протеїнів амінокислот беруть участь сотні проміжних метаболітів, тісно пов'язаних з обміном вуглеводів і ліпідів. Кожний організм має свій неповторний склад протеїнів, який генетично детермінований. Протеїни не депонуються в організмі, тому необхідне постійне надходження протеїнів з їжею, що розщеплюється у травному тракті на вільні амінокислоти, з яких синтезуються власні структурні протеїни організму [74].

Важливе значення має не лише кількість протеїнів, що надходять з їжею, але і їх склад. Біологічна цінність протеїнів тим вища, чим ближчий їх амінокислотний склад до складу протеїнів органів людського тіла. Ступінь засвоєння харчового протеїну залежить від ефективності його розпаду під впливом ензимів шлунково-кишкового тракту. Для визначення біологічної цінності протеїнів важливе значення має вміст і співвідношення в них незамінних амінокислот, саме такі протеїни містяться в насінні сої [5].

Особливості впливу продуктів генетично модифікованої сої на показники протеїнового обміну в організмі тварин і людини недостатньо вивченні. Залишається пересторога, що генетично модифіковані продукти можуть призвести до порушення протеїнового обміну.

Порушення протеїнового обміну може бути зумовлено наступними причинами:

- порушенням надходження в організм протеїнів, їхнього перетравлення та всмоктування в кров;
- порушенням біосинтезу протеїну в клітині;
- порушенням проміжного обміну амінокислот;
- підвищенням швидкості розпаду протеїну;
- утворення неспецифічних кінцевих продуктів обміну протеїнів.

Причинами порушення надходження харчового протеїну є: голодування, незбалансоване харчування (за амінокислотним складом), недостатня перетравлюваність, в результаті запальних та дистрофічних змін шлунково-кишкового тракту.

Порушення біосинтезу протеїнів у клітинах може бути зумовлено: мутацією генів, що кодують їх, порушенням транскрипції, трансляції та посттрансляційної модифікації протеїнів, впливом отруйних речовин і специфічних інгібіторів на процеси синтезу протеїну, дефіцитом незамінних амінокислот та АТФ [6, 25].

Проміжний обмін протеїну складається з реакцій переамінування, дезамінування та декарбоксилювання.

Внаслідок процесів переамінування під впливом трансаміназ утворюються нові амінокислоти. Процеси переамінування можуть посилюватися внаслідок ушкодження печінки або за інсулінової недостатності. Іншою причиною порушення переамінування є зниження ензимної активності трансаміназ (АсАт, АлАт), що виникає внаслідок порушення їх гормональної регуляції, за нестачі протеїнів в продуктах харчування або під час порушення роботи печінки [2, 31]. Важливими показниками є також визначення протеїнових фракцій та протеїну в крові, що також свідчить про різні порушення в організмі, а визначення вмісту молекул середньої маси вказує на ступінь інтоксикації.

1.3.1. Вплив генетично модифікованої сої на біохімічні показники крові щурів

Одними з найважливіших лабораторних показників, що відображають основні біохімічні аспекти токсичних уражень печінки та нирок є стандартні біохімічні тести: ензимна активність АлАт, АсАт, гамма-глутамілтранспептидази (ГГТП), вміст загального протеїну, молекул середньої маси, протеїнові фракції та інші [10]. Розглянемо перш за все одні з

найважливіших, а саме ензимну активність аміотрансаміназ.

Підвищення ензимної активності АсАт, що перевищує підвищення активності АлАт, характерно для пошкодження серцевого м'яза; якщо ж показник АлАт вище, ніж АсАт, то це, як правило, свідчить про руйнування клітин печінки [58, 113]. Зростання ензимної активності (АсАт) в динаміці може свідчити, як про розширення вогнища інфаркту, так і про залучення в патологічний процес інших органів і тканин, наприклад, печінки.

Аланінамінотрансфераза (АлАт, КФ 2.6.1.2) каталізує реакцію між аланіном і 2-оксоглутаратом з утворенням глутамінової і піровиноградної кислоти. Переамінування відбувається в присутності коензиму – піродоксальфосфату – похідного вітаміна В₆. При зворотньому ході реакції із глутаміновою кислотою і піруватом утворюється аланін і 2-оксокислота.

Дослідження, які раніше показали, що довготривале згодовування гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої призводить до зростання ензимної активності лужної фосфатази в сироватці крові щурів у трьох поколіннях, а трансаміназ у двох поколіннях, може свідчити про ураження гепатоцитів печінки та про ушкодження печінкових жовчних шляхів [40, 87, 124,]. Також вплив генетично модифікованої сої «Roundup Ready» на активність трансаміназ в крові свиней вивчався іншими вченими [53], ці дослідження показали, що за вживання ГМ-сої впродовж восьми місяців призвело до підвищення ензимної активності трансфераз в крові свиней, що свідчить про шкідливий вплив трансгенної сої на печінку та міокард свиней [26], паралельно проводилися експерименти й іншими вченими, які отримали подібні результати [24]. Спостерігаються зміни ензимної ативності аміотрансфераз у тканинах печінки та серці: їх активність незначно знижується у печінці та підвищується у серці за вживання генетично модифікованої сої стійкої до гербіциду Roundup [40, 185]. Визначення ензимної активності АлАт, АсАт, рівня молекул середньої маси (МСМ) та загального протеїну у крові та в печінці щурів під час застосування гліфосату окремо та за сумісної дії його разом з солями важких металів призводить до

зростання їх активності як у трьохмісячних щурів, так і дворічних [23]. Підшкірне введення гліфосату мишам протягом чотирьох діб призвело до змін у біохімічних показниках у крові: підвищення загального фосфору в плазмі крові, та зниженні ензимної активності лужної фосфатази і АлАт [91].

γ-Глутамілтрансфераза (ГГТ, КФ 2.3.2.2) – ензим, який бере участь в обміні амінокислот, каталізує перенесення γ-глутамільного залишку на амінокислоту або на іншу молекулу. За допомогою цього ензиму відбувається транспорт амінокислот через клітину мембрану. ГГТ розташовується в плазматичній мембрані клітин, що мають високу адсорбційну або секреторну здатність (наприклад, у печінкових каналцях) [110]. Деякими авторами показано, що ензимна активність ГГТ в тканинах печінки та нирок вища, а в крові її активність невелика.

Однак під час захворювання печінки і жовчевивідних шляхів незмінно визначається підвищена активність ензиму ГГТ в сироватці. ГГТ є специфічним ензимом печінки, жовчних проток та гепатобіліарної системи. Невелике збільшення ензимної активності ГГТ спостерігається у випадках медикаментозної інтоксикації і будь-якого окисного стресу [110, 135].

За всіх форм захворювань печінки ензимна активність ГГТ у сироватці зростає. Найбільш висока ензимна активність у випадках обструктивних уражень печінки. Це більш чутливий показник патології печінки, ніж АлАт і АсАт. Підвищення ензимної активності ГГТ викликають багато речовин (токсини, лікарські препарати та інші) здатні індукувати мікросомальне окиснення та окиснювальний стрес. Вплив гербіциду Roundup та генетично модифікованої сої обробленої цим гербіцидом на ензимну активність ГГТ в крові щурів раніше не вивчався.

У більшості випадків як гострої, так і хронічної ендогенної інтоксикації в організмі обов'язково утворюються продукти деградації протеїнів – молекули середньої маси (МСМ), що легко проникають із тканин у кров і поєднуються з певними рецепторами на поверхні відповідних клітин, впливаючи на їх функції. МСМ – це речовини середньої молекулярної маси

(від 300 — 500 до 5000 Да), що володіють значною токсичністю, зокрема на клітини печінки, нирок, головного мозку та несприятливо впливають на метаболічні процеси в організмі [83].

За високої концентрації пептидів у крові зменшується здатність сироваткового альбуміну зв'язувати і транспортувати низькомолекулярні й лікарські речовини. Тому, молекули середньої маси розглядаються як основний показник ендогенної інтоксикації [12, 83].

Синдром інтоксикації, який супроводжує патологічні процеси, зумовлений багатьма механізмами. Він пов'язаний з дизкоординацією метаболічних процесів, які відбуваються під час патології різного генезу – інфекційного (вірусного, бактеріального, паразитарного), токсичного, травматичного, генетичного, а також який спричинений побічною дією лікарських препаратів, що застосовуються з терапевтичною метою [30].

Порушення внаслідок різних хвороб функцій органів і систем (видільної, дезінтоксикаційної та інших), адаптаційно-приспосувальних процесів призводить до підвищення концентрації природно існуючих метаболітів, проміжних та кінцевих продуктів їх обміну, що проявляють токсичну дію, спричиняючи інтоксикацію організму [30, 148].

Метаболічна інтоксикація проявляється багатьма симптомами, залежно від характеру і патогенезу хвороби. Метаболічні порушення, які мають загальне значення в розвитку патології, – активація пероксидного окиснення ліпідів, зсуви в антиоксидантній системі, зниження енергетичного потенціалу, гіпоксія, – описані під час різних патологічних процесах. Показаний їхній взаємозв'язок з імунними порушеннями, зокрема, з підвищенням концентрації циркулюючих імунних комплексів, особливо токсичних їх фракцій. Все це призводить до порушення процесів мікроциркуляції [22].

Метаболічна інтоксикація може мати характерні особливості за окремих хвороб і пов'язана з накопиченням в організмі конкретних метаболітів [30, 136].

МСМ накопичуються не лише у крові, але здатні накопичуватися в фізіологічних рідинах і деяких тканинах. Так, вони є продуктами порушення процесів обміну і деструкції тканин. Вважають, що до 80% МСМ являються продуктами порушення протеїнового обміну в результаті активації протеаз в умовах аномального протеолізу під час гострих і хронічних захворювань [62]. Так, під час різних паталогій і пошкодженнях печінки рівень МСМ майже в усіх її фракціях підвищується чи має тенденцію до підвищення, що пов'язано, ймовірно з деструкцією печінки, і подальшим виходом пептидів у кров [104, 138].

МСМ накопичуються, і потім виводяться з організму не лише через кров, але й через сечу. У здорової людини з сечею виводиться невелика кількість МСМ, оскільки вони майже повністю реабсорбуються в проксимальній частині каналців нефрона. В щіточній каймі просвіту каналців наявні активні пептидази, які швидко гідролізують пептиди; амінокислоти, що утворились, реабсорбуються в кров [17, 30, 118].

Таким чином, патологічні процеси, незалежно від факторів, що їх спричиняють, супроводжуються біохімічними порушеннями, в результаті накопичення природньо існуючих або модифікованих метаболітів, проміжних і кінцевих продуктів обміну, що призводить до інтоксикації організму – "метаболічної інтоксикації" [30]. У дослідженнях вчених які вивчали вплив гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої на організм щурів, спостерігалось підвищення рівня МСМ у крові щурів, зокрема, $0,42 \pm 0,06$ г/л проти $0,35 \pm 0,008$ г/л у контрольній групі, але ця різниця була не вірогідна [41]. Інші результати досліджень, показують підвищення МСМ під час вживання гербіциду Roundup щурами усіх вікових груп, у яких виявлявся синдром ендогенної інтоксикації, на що вказує зростання вмісту молекул середньої маси, які містять аліфатичні (МСМ₁) та ароматичні амінокислоти (МСМ₂). Так, при вживанні гліфосату (у вигляді гербіциду Roundup) вміст МСМ₁ збільшується у 1,4 рази, вміст МСМ₂ у 2 рази [24].

Іншим показником протеїнового обміну є визначення вмісту протеїну та його фракцій у крові, що є сумарним вираженням процесів синтезу та розпаду протеїну. У плазмі крові налічуються близько сотні протеїнів, які виконують в організмі різноманітні функції (транспортні протеїни, антитіла, гормони, ензими, інгібітори ензимів тощо). У дорослої людини концентрація протеїнів плазми крові становить 57-81 г/л [61].

Основна частина загального протеїну плазми крові (біля 90%) припадає на альбуміни, глобуліни і фібриноген. Розглянемо такі протеїни як: альбуміни та глобуліни. Альбуміни в організмі виконують ряд важливих функцій: транспортують водонерозчинні речовини (стероїдні гормони, тироксин, токсини та лікарські засоби), регулюють осмотичний тиск, є депо амінокислот [10]. Глобуліни поділяються за функціональними та фізико-хімічними властивостями: α_1 -глобуліни (здійснюють транспорт кортикостероїдів, ліпідів та тироксину), α_2 -глобуліни (транспортують ліпіди та іони міді), β -глобуліни (транспортують залізо та ліпіди) та γ -глобуліни (імуноглобуліни) [10, 61].

У нормі концентрація альбумінів у крові становить 40-50 г/л (52-65% загального протеїну). Альбуміни підтримують онкотичний тиск крові, таким чином, беруть участь у регуляції водного обміну між кров'ю та позаклітинним простором. При зниженні концентрації альбумінів менше ніж 30 г/л онкотичний тиск зменшується та виникають набряки. Крім того, альбуміни беруть участь у транспорті вуглеводів, ліпідів, гормонів, пігментів, мінеральних речовин, саме вони зв'язують вільні жирні кислоти і транспортують їх [61].

Глобуліни – це гетерогенна група протеїнових молекул, в якій виділяють α -, β - та γ - глобуліни. Кожна з цих фракцій містить специфічні протеїни, які виконують певні біохімічні функції. Нормальне значення концентрації глобулінів у сироватці крові 20-30 г/л [10, 61].

Дослідження вмісту загального протеїну та його фракцій в крові широко використовується в клінічних дослідженнях, тому що при різних

патологічних станах вміст протеїну та їх якісний склад у плазмі крові змінюються. Вимірювання концентрації протеїну крові досліджують, для встановлення фізіологічного стану тварин. В експериментах, у яких вивчався вплив трансгенної сої на концентрацію протеїнових фракцій у крові 4-х та 8-місячних свиней [54] показали, що споживання сої впродовж 8-ми місяців призводить до зниження вмісту α_2 -глобулінів на 21,54 % та до підвищення кількості γ -глобулінів на 24,33 % порівняно з контролем, що свідчить про зниження рівня естрогенів у крові свиней. В інших дослідженнях вивчалася комбінована дія гербіциду Roundup, плюмбум ацетату, купрум сульфату на показники співвідношення протеїнових фракцій у сироватці крові щурів [65]. Результати цих досліджень показали перерозподіл протеїнових фракцій у сироватці крові щурів: знижується вміст альбумінів на фоні зростання концентрації глобулінів, що може свідчити про порушення в роботі нирок [65].

При вивченні протеїнового обміну слід звертати увагу не лише на протеїни плазми крові, а й на зміни в печінці. Печінка виконує детоксикаційну й протеїн-утворюючу функції. Виявлено, що після крововтрати вміст альбумінів і глобулінів плазми крові відновлюється швидко саме завдяки печінці. Важливу роль відіграє печінка й у проміжному протеїновому обміні, за рахунок процесів дезамінування та синтезу сечовини. У ній також знешкоджуються отруйні продукти кишкового гниття протеїну [31].

Важливу роль в протеїновому обміні, крім печінки відіграють і нирки. У них здійснюються процеси відщеплення аміаку, який нейтралізує кислоти, утворюючи при цьому солі амонію, що виділяються з сечею, від амінокислот. При цьому через нирки організм звільняється від кінцевих продуктів протеїнового обміну (аміак, сечовина, креатинін, сечова та гіпурова кислоти). Саме тому під час дослідження показників протеїнового обміну була взята саме печінка, нирки та кров щоб повною мірою оцінити зміни в організмі тварин.

1.3.2. Біологічна роль показників азотистого обміну та їх зміни за патологічних станів

Фосфороорганічні сполуки широко використовують у сільському господарстві у вигляді пестицидів та гербіцидів. Сучасні гербіциди це складні синтетичні сполуки, токсичні не лише для об'єктів застосування, але й для людини та тварин. Одним з найпоширеніших гербіцидів який використовується у всьому світі є гербіцид Roundup, основною діючою речовиною у ньому є гліфосат. Створення генетично модифікованих організмів, які стійкі до дії гліфосату сприяло широкому використанню цього гербіциду. Гліфосат вважається одним з малотоксичних і належить до третього класу токсичних речовин. Однак, існують дані, що він як і усі фосфорорганічні сполуки, впливає на нервову та серцево-судинну системи, підвищує артеріальний тиск, може впливати на процеси обміну речовин [6].

Протеїновий катаболізм призводить до постійного утворення аміаку в організмі внаслідок окиснювального дезамінування амінокислот. Кінцевим азотовмісним продуктом деградації протеїнів є азот сечовини, яка виводиться з організму разом із сечею [1, 66].

Визначення концентрації сечовини і креатиніну в сироватці крові та сечі є важливим діагностичним біохімічним маркером розвитку багатьох патологічних станів. Обидва показники використовуються для оцінки функцій нирок, порушення обміну речовин, а також для діагностики захворювань [95].

У ході нормального клітинного метаболізму й амінокислот в організмі утворюється аміак (NH_3). Цей токсичний побічний продукт метаболізму транспортується кров'ю в печінку, де знешкоджується, перетворюючись на сечовину в ензимному процесі – орнітиновому циклі (циклі сечовини). Додатковим механізмом детоксикації аміаку в місцях утворення є його зв'язування у формі глютаміну за участю глютамінсинтетази [11].

Сечовина – низькомолекулярна сполука, яка вільно проходить через мембрани клітин паренхіматозних органів і еритроцитів. Вона не несе

метаболической функции и как вторичный метаболит должна элиминироваться из организма. Синтезирована в печени сечовина переносится с кровью в почки, где фильтруется и экскретируется с мочой [1, 6, 140].

Концентрация сечовины в плазме крови зависит от скорости её синтеза, клубочковой фильтрации и скорости почечной перфузии [139]. У пациентов с почечной недостаточностью фильтрация сечовины в почках замедляется, вследствие чего её уровень в моче снижается, а в крови повышается. В этом случае больше сечовины попадает с крови в кишечник. Действие кишечной уреазы на эту сечовину становится клинически важным источником развития гиперамониемии [1].

Повышение (обычно в несколько раз относительно верхнего показателя нормы) концентрации сечовины, что сопровождается, как правило выражением клиническим синдромом интоксикации, называется уремией. Образование сечовины повышается за употребления большого количества протеина, катаболических состояний, при всасывании аминокислот и протеина после желудочного кровотечения [11].

Концентрация в плазме сечовины повышается во время обезвоживания организма вследствие усиленной пассивной реабсорбции в почечных канальцах. Снижение уровня сечовины в плазме происходит за нарушения синтетической функции печени, а также вследствие употребления небольшого количества протеинов [14].

Концентрация сечовины в плазме часто используется как показатель функции гломерулярного аппарата почек, но более точную оценку даёт определение концентрации креатинина в плазме.

Если говорить про креатинин, то данная субстанция образуется в момент резкой необратимой дегидратации креатина. Креатинин – конечный продукт обмена протеина в организме теплокровных животных и человека, который образуется в мышцах и выделяется в кровь. Он не выполняет никакой полезной функции и выводится из организма путём почечной фильтрации и частично с помощью канальцевой секреции. Выделение креатинина с мочой пропорционально массе мышечной ткани и зависит от возраста и пола (для мужчин допустимы

більш високі показники концентрації креатиніну в плазмі крові, ніж для жінок) [14]. В організмі креатинін утворюється із креатину внаслідок азотистого обміну. Оскільки щоденна потреба в креатині може тільки частково покриватися за рахунок дієти, решта синтезується безпосередньо в організмі [139, 140].

Креатинін відіграє подібну до сечовини роль, оскільки також є побічним продуктом обміну речовин [11]

Одночасне збільшення сечовини та креатиніну в крові є сигналом розвитку ниркової недостатності. Аналіз його вмісту не тільки в крові, але й в сечі дає можливість оцінити, перш за все, швидкість клуб очкової фільтрації [56].

Отже, креатинін синтезується переважно у м'язах – вивільняється з міоцитів і транспортується в нирки, звідки виводиться разом з сечовиною в складі сечі. Якщо здатність нирок виводити сечовину і креатинін порушується, вони починають накопичуватися в крові.

Оцінка вмісту сечовини і креатиніну в крові та сечі слугує індикатором порушень нирок на ранніх стадіях різних захворювань. Біохімічні зміни в аналізі крові та сечі характеризують не лише роботу нирок, але й діяльність інших органів, зокрема печінки [103].

Іншим важливим показником азотистого обміну є сечова кислота. Сечова кислота утворюється під час розпаду пуринових основ і циркулює в крові у вигляді іонізованого урату. У нормі наближення критичної концентрації сечової кислоти в плазмі призводить до елімінування її з сечею. В людини і нижчих приматів його рівень в крові регулюється нирками, однак у більшості інших ссавців елімінація здійснюється печінкою. Гепатоцити окиснюють сечову кислоту з утворенням водорозчинного алантоїну, який екскретується нирками. Сечова кислота продукується в печінці з ендогенно синтезованих складових пурину. Рівень сечової кислоти відображає стан рівноваги між продукцією та екскрецією. Урати не засвоюються тканинами організму, тому вони виділяються нирками, та, частково, за допомогою

шлунково-кишкового тракту. Нирками виділяється $2/3$ від всього обігу сечової кислоти. До цього процесу залучені чотири процеси, що відбуваються у нирках: 1) клубочкова фільтрація; 2) перед секреторна тубулярна (канальцева) реасорбція; 3) канальцева екскреція; 4) зворотня секреторна реасорбція. В нормальних умовах сечова кислота вільно фільтрується в ниркових клубочках, оскільки лише 5% зв'язується з плазмовими протеїнами. Клубочкова фільтрація складає лише 7-12% навантаження від екскреції сечової кислоти. Після клубочкової фільтрації сечова кислота підлягає процесам канальцевої реабсорбції і секреції в проксимальних, звивистих канальцях. Неповна секреторна реабсорбція – головний чинник виділення сечової кислоти сечею. Основними причинами підвищення концентрації сечової кислоти в крові та сечі такі: надходження з їжею продуктів, які містять багато пуринів (м'ясо, бобові), а також внаслідок порушення роботи печінки та фільтрації в нирках [57].

Експериментальні дослідження, у яких вивчався вплив гліфосату та солей важких металів показали зростання вмісту в крові креатиніну, сечовини, залишкового азоту та зменшення концентрації протеїну, що свідчить про пригнічення функції печінки внаслідок їх дії [23]. Інші дослідження показали що рівень сечовини не змінюється, а інші показники крові вказують на порушення роботи печінки [24].

1.4. Біологічне значення показників системи антиоксидантного захисту під час оцінки безпечності вживання генетично модифікованих організмів

В країнах Євросоюзу прийнята загальна схема перевірки безпечності генномодифікованих організмів, яка включає в себе наступне: загальну характеристику організму-донора та організму-реципієнта, оцінку композиційної еквівалентності та харчової якості генномодифікованих організмів, яку проводять на лабораторних тваринах (щурах, мишах, коровах курчатах та інших тваринах). Також трансгенні організми перевіряють на безпечність нових протеїнів, що кодуються штучно внесеними генами, такі протеїни перевіряються на токсичність та алергенність [19].

Інша схема перевірки генномодифікованих продуктів складається з медико-генетичної, медико-біологічної і технологічної оцінки.

Медико-генетична оцінка здійснюється завдяки використанню полімеразної ланцюгової реакції для визначення промоторів, маркерних генів, термінаторів і їх біохімічну та експресійну стабільність [19].

Медико-біологічні оцінки включають: перевірку на нейротоксичність, токсичність, мутагенність, канцерогенність, алергенність, вплив на систему імунного захисту та репродуктивну функцію. Оцінку токсичності трансгенних продуктів проводять разом з морфологічними, гематологічними та біохімічними показниками. Визначають такі біохімічні показники: вміст малонового альдегіду та дієнових кон'югатів; активність ензимів 1-ї і 2-ї фази біотрансформації ксенобіотиків (цитохром P450, цитохром b₅, епоксигідролази, ацетилестерази, глутатіонтрансферази та глюкуронозилтрансферази); концентрацію ензимів лізосом (арилсульфатази А і В, β-глюкуронідази та β-галактозидази); вміст антиоксидантних ензимів (глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, каталази, супероксиддисмутази) [55].

Технологічна оцінка генетично модифікованих продуктів включає: оцінку технологічних параметрів, фізико-хімічні та органолептичні властивості продукції.

Накопичення у насінні рослин гербіцидів чи синтез токсичних речовин генномодифікованими рослинами може мати негативний вплив на організм тварин при споживанні цих трансгенних продуктів. У механізмах дії різних токсичних речовин важливу роль відіграє здатність стимулювати утворення активних форм кисню (АФК), процесів окиснювальної модифікації протеїнів та пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), цим самим спричиняючи розвиток оксидативного стресу [55]. Саме тому визначення вмісту окиснювальної модифікації протеїнів та ензимів антиоксидантного захисту має важливе значення під час оцінки безпечності вживання трансгенних рослин.

1.4.1. Процеси утворення активних форм кисню та окиснювальна модифікація протеїнів в організмі тварин

В аеробних організмах постійно утворюються АФК у відповідь на ендогенні та екзогенні фактори, хоча раніше вважали, що утворення їх в клітині (окиснювальний вибух) є проявом неспецифічного імунного захисту організму при інфекційному ураженні [102].

Аеробні організми повністю залежать від кисню, який метаболізується в електронтранспортному ланцюзі мітохондрій шляхом чотириелектронного відновлення до двох молекул води за участю цитохром с-оксидази – останнього компонента дихального ланцюга. Понад 90% кисню, що надходить до клітин метаболізується таким шляхом. Частина молекул O_2 метаболізується шляхом послідовного одноелектронного відновлення, що призводить до утворення активних форм кисню (АФК), насамперед, вільних радикалів, які характеризуються високою реакційною активністю [52, 102]. Вільні радикали та АФК можуть вивільнятися із мітохондрій та реагувати з внутрішньоклітинними молекулами, внаслідок чого відбувається зміна

структури або утворення реакційно активних форм цих молекул [3, 159, 182]. АФК можуть утворюватися не тільки в мітохондріях, але і в цитоплазмі клітин, плазматичній та ядерній мембранах, мікросомах, а також у позаклітинному середовищі, зокрема, у плазмі крові [3, 4, 52]. Джерелом їхнього утворення є транспорт електронів у мембранах мітохондрій, функціонування цитохромів P450, NADPH-залежних оксидаз (представників NOX-родини ензимів), які широко розповсюджені в клітинах різних органів і тканин, та деякі інші металовмісні протеїни [156, 182].

За певних фізіологічних умов концентрація АФК в клітинах може збільшуватися, так наприклад під час старіння організму та різних захворюваннях, а також під впливом екологічних чинників (зокрема, іонізуючого випромінювання, радіоактивного забруднення), за умов надходження в організм ксенобіотиків, важких металів та токсинів [3, 4]. Однак при різних стресових та патологічних станах відбувається надмірне утворення вільних радикалів, що призводить до порушення будови клітин та процесів метаболізму. Також збільшення рівня вільних радикалів відбувається внаслідок недостатньої їх інактивації в організмі [102].

АФК – це супероксидний радикал молекули кисню ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водню (H_2O_2), гідроксильний радикал, які утворюються в клітині, що поглинає кисень в ході нормального метаболізму [16].

Під час різних патологічних станів в організмі починають інтенсивно утворюватися АФК, які ініціюють окиснення протеїнів, нуклеїнових кислот та ліпідів, тим самим викликаючи пошкодження різних клітинних структур. Окиснення молекул ліпідів супроводжується пошкодженням мембранних структур та ліпопротеїнових комплексів. Окиснення протеїнів може супроводжуватися різноманітними патологічними змінами. У разі окиснення молекул ензимів може значно змінюватися метаболізм на рівні клітин та тканин за рахунок зміни активності і здатності взаємодіяти із субстратом. Продукти вільнорадикального окиснення впливають на генетичний апарат клітини, тим самим зумовлюючи неконтрольований ріст клітин [43, 156].

Патологічні наслідки виникають внаслідок надмірного накопичення АФК, пероксидів і їх вторинних продуктів, цей стан звичайно називають оксидантним стресом, а фактори і речовини, які сприяють цьому, називають прооксидантами. Фактори, які викликають окиснювальний стрес, можуть бути різні: вплив токсичних та канцерогенних речовин, дія радіації, ріст та розвиток пухлин, та інші захворювання, але всі вони в кінцевому рахунку викликають окиснювальну модифікацію макромолекул (окиснювальну модифікацію протеїнів (ОМП), ПОЛ тощо). Одним з таких факторів може бути вживання генномодифікованих продуктів, які можуть містити, як гербіцид, так й інші токсичні речовини, що здатні спровокувати вільнорадикальні процеси та окиснювальну модифікацію біомолекул [60]. Під час вивчення комбінованої дії купрум сульфату, плюмбум ацетату, гліфосату (у формі Roundup) спостерігається генерація АФК, найвищий вміст яких спостерігають за комбінованої дії важких металів та гліфосату в мододих тварин. При цьому у цих тварин в усіх вікових групах зростає активність вільнорадикального окиснення, про що свідчить підвищення вмісту дієнових кон'югатів і ТБК-активних продуктів [36].

Окиснювальна модифікація протеїнів пов'язана з пошкодженням як поліпептидного ланцюга, так і окремих амінокислот з утворенням декількох типів радикалів. Процес ОМП має складний і специфічний характер, який встановлюється амінокислотним складом протеїнів [60].

Внаслідок окисно-відновних реакцій в організмах відбувається генерація таких АФК ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, RO_2 , OH_2 , H_2O_2 та інші), які беруть участь у різних фізіологічних та патологічних процесах. Однією з найактивніших форм кисню є гідроксильний радикал ($\cdot OH$), який викликає ПОЛ, ОМП, пошкодження нуклеїнових кислот і вуглеводів, що веде до метаболічних порушень і структурних змін у клітинах. Ступінь ОМП може бути різним, від пошкодження окремих амінокислот до фрагментації протеїнів, це залежить від інтенсивності генерації АФК [51].

ОМП за дії АФК відбувається з утворенням додаткових карбонільних груп у бічних ланцюгах амінокислот [34, 51, 100]. Внаслідок дії вільних радикалів у певних ділянках поліпептидного ланцюга можуть виникати нові радикали, які, взаємодіючи з іншими амінокислотними залишками, можуть брати участь в утворенні нових радикальних продуктів. У такий спосіб можуть утворюватись алкіл-пероксильні, алкіл-пероксидні та алкоксильні радикали, які, залежно від оточення, піддаються подальшим перетворенням [119].

Під час окиснення протеїнів у них утворюються альдегідні та кетоніві групи амінокислотних залишків (карбонільні групи), підвищений рівень яких може бути показником вільнорадикального окиснення і окисного стресу [82].

Ступінь та інтенсивність окиснення біологічних речовин залежить від рівноваги між генерацією АФК, буферною ємністю та активністю антиоксидантної системи захисту. Генерація АФК є природним процесом, який сприяє вилученню біологічних сполук під час регуляції гомеостазу. Вільні радикали призводить до складних модифікацій у протеїнових молекулах [93].

Саме ОМП відводиться провідна роль у балансі між синтезом та деградацією простих і складних протеїнів, що визначають здатність клітин генерувати та проводити регуляторні імпульси, здійснювати рецепторні, медіаторні та енергетичні функції. Вважають, що саме розлади ОМП, які є таким самим природним процесом, як і утворення АФК, є однією з патогенетичних ланок розвитку патологічних станів внаслідок оксидативного стресу [9]. Таким чином, ОМП відіграє ключову роль у молекулярних механізмах оксидативного стресу, а оксидативний стрес є важливою ланкою багатьох патологічних процесів у організмі під час різних захворювань [9, 59].

ОМП може сприяти змінам амінокислотних залишків або змінам валентності та координації металів, що призводить до порушення структури протеїнів та полегшення процесів протеолізу. Збільшення концентрації АФК

супроводжується блокуванням та розпадом основних ензимів антиоксидантної системи (АОС). Підвищення рівня пероксидів та окиснювально модифікованих макромолекул, супроводжується наступною інактивацією ензимів-антиоксидантів, що призводить до виснаження активності АОС, зниження пулу речовин-антиоксидантів та загибелі клітин. Таким чином, інтенсивність ОМП може бути маркером ступеня пероксидних процесів та фактором, який впливає на стан АОС [127].

Показано, що ОМП веде до зміни не тільки первинної, але й вторинної та третинної структури протеїнів. Накопичення окиснених протеїнів розглядається як один із факторів регуляції синтезу протеїнів, активації протеолітичних ензимів, які вибірково руйнують окиснені протеїни. Також ОМП генерує нові антигени і провокує імунну відповідь. Продукти такої модифікації можуть бути причиною вторинного пошкодження інших біомолекул [109].

У зв'язку з особливостями хімічного складу і структурною організацією протеїнів, процес ОМП має складний і специфічний характер, що спряжено з утворенням великої кількості окиснених продуктів радикальної та нерадикальної природи.

Фактично всі амінокислотні залишки протеїнів здатні до окиснення, та в даний час охарактеризовані не всі утворені при цьому продукти окиснення. Найчутливіші до окиснення сірковмісні (метіонін, цистеїн) і ароматичні (триптофан, тирозин і фенілаланін) амінокислотні залишки протеїнів [127]. Амінокислоти протеїнів також піддаються металокаталітичному окисненню при цьому утворюються карбонільні похідні.

Карбонільні похідні протеїнів – це стабільні продукти, які утворюються за участю амінокислотних залишків проліну, аргініну, лізину, треоніну. Також карбонільні похідні протеїнів можуть утворюватися за участю амінокислотних залишків лізину, цистеїну і гістидину з продуктами ПОЛ. Причому карбонілювання аргініну і лізину супроводжується втратою одного або більше атомів азоту [152]. Акумуляція карбонільних груп протеїнів може

бути раннім показником тканинного пошкодження, викликаного вільними радикалами, при деяких патологічних станах вони можуть складати 50-70 % клітинних протеїнів [150].

Окиснення протеїнів може відбуватися за рахунок окиснення сульфгідрильних груп (SH-груп) цистеїну, що призводить до утворення дисульфідних зв'язків між його двома молекулами. SH-групи (тіолова група, меркаптогрупа) – це хімічно-активні групи протеїнів, які відіграють важливу роль в процесах клітинного дихання, реакціях окисного фосфорилування, регуляції проникливості мембран, входять до складу активних центрів багатьох ензимів і коензимів (визначають їх каталітичну активність), а також беруть активну участь у підтриманні третинної структури протеїнів. За кількістю SH-груп можна судити про метаболічну активність ензимів. Сульфгідрильні групи протеїнів не тільки здійснюють каталітичну функцію, але й захищають їх від пошкоджуючої дії несприятливих факторів зовнішнього середовища [149].

SH-групи володіють антиоксидантними властивостями, значною реакційною здатністю в окисно-відновних реакціях і їх кількість зменшується під час оксидативному стресі, який виникає в результаті порушення балансу між продукцією вільних радикалів і механізмами антиоксидантного контролю. В нормі вміст SH-груп становить 400-600 мкмоль/л [84].

Вільнорадикальне пероксидне окиснення (ВРПО) утворює цілий ряд продуктів, що є результатом взаємодії вільних радикалів між собою, так і з макромолекулами. При ВРПО разом з АФК утворюються, й інші активні радикали (кетони, альдегіди, пероксиди та спирти), які здатні ковалентно взаємодіяти з окремими функціональними групами протеїнів, що призводить до їх полімеризації та руйнування амінокислот, особливо тих, які містять сульфгідрильні групи (цистеїн, метіонін). Усе це викликає модифікацію протеїнів, що може призвести до зміни активності окремих ензимів. Активні радикали можуть призводити до руйнування біоантиокислювачів (убіхінону, вітамінів, стероїдних гормонів), що можуть змінювати склад фосфоліпідів

(призводити до появи в їх гідрофобній частині продуктів окиснення), що веде до ініціації процесів іонного транспорту, змінювати конформацію протеїнів і ліпідний складу клітинних мембран. При цьому змінюються структурні і функціональні властивості мембран. Низько- і високомолекулярні сполуки, які мають тіолові групи, зокрема цистеїн, цистин, глутатіон відносять до водорозчинних біоантиоксидантів. Оскільки основною мішенню для АФК є протеїни, важливу роль у їх захисті від ендогенних АФК відіграють цистеїн та відновлений глутатіон. Їхні сульфгідрильні групи легше окислюються ніж SH-групи протеїнів, при цьому захищаючи самі протеїни від окиснювальної модифікації [33].

Функція SH-груп полягає в утворенні тіоефірного зв'язку з ацильною групою молекули субстрату. SH-групи протеїнів можуть відігравати роль реакційноздатного акцептора під час реакцій ензимного переносу ацильних, амідних, фосфатних та інших залишків. SH-групи окисних ензимів можуть відігравати важливу роль у проміжних перенесеннях електронів від субстратів до акцепторів [84]. У результаті модифікації протеїнів може порушуватися їх конформація, і вони стають більш чутливими до дії протеолітичних ензимів, які гідролізують протеїни. Протеоліз – ензимний гідроліз пептидних зв'язків в протеїнах і пептидах, один з найважливіших і універсальних хімічних процесів живої природи. Функції внутрішньоклітинних протеолітичних ензимів полягають у деградації протеїнів, а також у каталізі реакцій обмеженого протеолізу, необхідних для регуляції клітинного метаболізму [119]. Найбільш чутливими до окиснення є лізин, аргінін, пролін, треонін, сульфуровмісні (метіонін, цистеїн, цистин) та ароматичні (гістидин, триптофан, тирозин) амінокислотні залишки протеїнів, які перетворюються на карбонільні похідні. Продукти ОМП мають триваліший період розпаду, порівняно із продуктами ПОЛ, що робить їх перспективним маркером оцінки інтенсивності вільнорадикального окиснення у біологічних системах [52]. Дослідження у яких вивчався вплив гербіциду показали пошкодження клітинних мембран і ДНК, крім того

виявилось, що Roundup перешкоджає клітинному диханню, що призводить до утворення вільних радикалів та окиснення біомолекул [156].

Отже, ОМП має як негативний, так і позитивний значення, оскільки призводить до утворення каталітично неактивних або малоактивних ензимів та функціонально неповноцінних протеїнів. Окрім того, ОМП є стимулом до оновлення протеїнів. ОМП значно збільшує їх доступність до дії протеолітичних ензимів, тому протеолітичні ензими відіграють важливу роль у деградації окиснювальних протеїнів [127]. Визначення ОМП, вмісту SH-груп та протеолітичної активності ензимів у тканинах тварин за вживання ГМО, може показати інтенсивність вільнорадикальних процесів та ступінь окиснення протеїнів. Саме окиснювальна модифікація є маркером інтенсивності пероксидних процесів та фактором, який впливає на стан антиоксидантної системи [33].

1.4.2. Вплив трансгенної сої та гербіциду на прооксидантно-антиоксидантний стан клітин

Антиоксидантна система захисту (АОЗ) організму тварин здатна контролювати і зупиняти всі етапи реакцій утворення вільних радикалів, починаючи від їх ініціації і закінчуючи утворенням гідропероксидів та малонового діальдегіду. При дії токсичних та шкідливих речовин на організм, при захворюваннях чи інших патологічних станах підвищується у клітинах ензимна активність антиоксидантного захисту [152].

До антиоксидантної системи належить глутатіонова система, до складу, якої входять глутатіон і ензими, що каталізують його зворотні реакції окиснення та відновлення (глутатіонпероксидазу, глутатіонредуктазу та глутатіонтрансферазу). До ензимів антиоксидантної системи відносять також каталазу, пероксидазу та супероксиддисмутазу, які каталізують реакції прямого руйнування пероксидних сполук в організмі людини і тварин [144].

Глутатіонова система захищає компоненти клітини від окиснення АФК та вільними радикалами. Основним антиоксидантом є відновлений глутатіон – низькомолекулярний тіол, що виступає донором водню в окисно-відновних реакціях [144]. У відновленій формі глутатіон хімічно взаємодіє з АФК, руйнує вільні радикали, видаляє ацилпероксидази з мембран. В якості кофактора він входить до складу ензимів глутатіонової системи, які знешкоджують пероксид водню (глутатіонпероксидаза), ліпопероксидази мембран та ксенобіотики (глутатіонтрансфераза), підтримують пул відновленого глутатіону (глутатіонредуктаза), забезпечуючи комплексний антиоксидантний захист [70, 144]. Глутатіон є важливим антиоксидантом в організмі тварин та людини, саме він підтримує функціонально активну конформацію протеїнів, а також захищає сульфгідрильні групи глобіну, мембрани еритроцитів та двовалентне залізо від дії окиснювачів.

Найважливішою функцією глутатіону є його участь в процесах знешкодження токсичних речовин та ксенобіотиків, які потрапляють до організму разом з продуктами харчування, напоями, через шкіру або продуктами дихання. Метаболізм шкідливих речовин та ксенобіотиків відбувається в печінці за участю відновленого глутатіону [70]. Глутатіон підвищує стійкість клітин до негативних впливів різних стресових факторів, захищає організм від АФК; відновлює й ізомеризує дисульфідні зв'язки, також виконує функцію ензимів; впливає на синтез нуклеїнових кислот, спричиняє вплив на проліферацію клітин та підтримує функціональний стан біологічних мембран. Зменшення концентрації глутатіону в еритроцитах та в клітинах тканин, може призвести до активації ПОЛ. Глутатіон є основним компонентом антиоксидантної системи в усіх клітинах та органах, він перетворюється на дисульфід за участю глутатіонпероксидази, а за дії глутатіонредуктази перетворюється у відновлений глутатіон. Знешкодження токсичних сполук у клітинах печінки відбувається за участю глутатіонтрансферази шляхом перенесення на них атомів сірки [70].

Глутатіонпероксидаза (ГП) бере участь у знешкодженні й інактивації пероксидних радикалів та пероксиду водню. Зменшення активності цього ензиму призводить до розвитку вільнорадикальної патології. Майже у всіх тканинах еукаріот була виявлена глутатіонпероксидаза, найбільша її кількість міститься у матриксі мітохондрій та цитозолі [70, 89]. Цей ензим забезпечує захист клітинних мембран від пошкодження пероксидними радикалами. Глутатіонпероксидаза каталізує розпад H_2O_2 та відновлення гідропероксидів глутатіоном. ГП має високу чутливість до пероксиду водню, тому цей ензим здатний знешкоджувати H_2O_2 при низьких концентраціях [70, 137].

Однією з основних функцій глутатіонтрансферази (ГТ) є захист клітин від ксенобіотиків та продуктів ПОЛ шляхом приєднання до субстрату молекули глутатіону або нуклеофільного заміщення гідрофобних груп [118]. ГТ здатна відновлювати фосфоліпіди, що входять до складу клітинних мембран. Цей ензим бере участь в утворенні і метаболізмі гормонів, та відновленні гідропероксидів жирних кислот і нуклеотидів. Найбільша концентрація ГТ в ендоплазматичному ретикулумі та цитозолі, трохи менше його міститься в мітохондріях та ядрі. Розрізняють глутатіонтрансферази, які взаємодіють з катіонами (у печінці, нирках та кишечнику) і аніонами (головний мозок, легені, селезінка, еритроцити, плацента). Залежно від специфічності субстрату також розрізняють глутатіонтрансферазу, яка взаємодіє з алкенами, епоксидами, алкіленами, арилами, алканами, ентеротоксинами [137].

ГТ є важливим ензимом антиоксидантної і детоксикаційної системи, під час роботи якої утворюється тіоефір метаболіту з відновленим глутатіоном. У більшості випадків ця реакція призводить до інактивації токсичної речовини [137].

Відновлення окисненої дисульфідної форми (GSSG) глутатіона у відновлену сульфгідрильну (GSH) каталізує ГР за рахунок $\text{НАДФН} + \text{H}^+$, що є донором протонів. В основному ГР міститься в цитоплазмі, вона також є в

мікросомах, мітохондріях та ядрах. Біологічна функція цього ензиму, полягає в підтримці високого рівня відновленого глутатіону та низького рівня окисненого глутатіону. Окислення GSH в GSSG відбувається при відновленні пероксидів в реакціях за участю ГТ та ГП та дисульфідів за участю ГТ та інших ензимів. Підвищення концентрації цього ензиму спостерігається при збільшенні поділу клітини та під час росту пухлини [89, 137].

Ще одними з важливих ензимів антиоксидантної системи є супероксиддисмутаза та каталаза.

Супероксиддисмутаза (СОД) відіграє важливу роль у механізмах антиоксидатного захисту. СОД є внутрішньоклітинним ензимом, який присутній майже в усіх клітинах організму [33]. Основна роль цього ензиму полягає в дисмутації супероксидного радикала O_2^- у O_2 і H_2O_2 , який потім метаболізується в H_2O і O_2 каталазою та ГП [128, 129]. СОД швидко руйнується при потраплянні з клітини в міжклітинну рідину (лімфу, плазму, синвіальну рідину). СОД в крові умовно ділиться на ізоензими, яких розрізняють три форми: Fe-, Zn-Cu- та Mn-залежні СОД. Метали розташовані в активному центрі ензиму та виконують каталітичну функцію, вони послідовно відновлюються і окиснюються. СОД-марганець-вмісний ензим, міститься у мітохондріальному матриксі (Mn-СОД), а Cu, Zn-СОД в цитоплазмі. Експериментальні дослідження клітинної смерті показали, що пов'язана з апоптозом фрагментація ДНК зменшується під дією Cu, Zn-СОД [64].

СОД може виступати прооксидантом та взаємодіяти з пероксидом водню, ініціюючи утворення супероксидного аніону і гідроксильного радикала. Зниження та підвищення активності супероксиддисмутази є наслідком розвитку патологічних процесів в організмі. Зниження вмісту цього ензиму в клітинах призводить до посилення цитотоксичної дії H_2O_2 , що утворюється в результаті дисмутації супероксиду [27, 128].

СОД знешкоджує АФК, які після розпаду утворюють пероксид водню та можуть пошкоджувати і сам ензим, тому СОД функціонує разом із

каталазою. Каталаза швидко розщеплює H_2O_2 на воду та кисень [128, 145]. У крові ж СОД виступає первинним антиоксидантом і здатний підтримувати та контролювати рівень вільних радикалів.

Каталаза бере участь у дезінтоксикації пероксиду водню [145]. До складу молекули каталази входять чотири однакові субодиниці, до складу їхнього активного центру входить гем, який зв'язаний з молекулою НАДФН. Каталаза міститься переважно в пероксисомах гепатоцитів, хоча її висока концентрація виявлена також в мітохондріях і ЕПР гепатоцитів [145]. Для клітин концентрація H_2O_2 має важливе значення, оскільки вона може запускати каскад реакцій вільнорадикального окиснення поліненасичених жирних кислот ліпідів, через що можуть руйнуватися мембрани, порушуватись функціонування клітин та наступати некроз [128, 145]. Активність ензимів антиоксидантного захисту за вживання гліфосат-резистентної сої щурами не вивчалася. У раніше проведених дослідках вивчався сумісний вплив гліфосату та солей важких металів. Результати досліджень показали, що 30-денна інтоксикація купрум сульфатом, плюмбум ацетатом та гліфосатом (у формі гербіциду Roundup) в допорогових дозах (1/20 LD50) супроводжується пригніченням антиоксидантної системи, про що свідчить зменшення вмісту відновленого глутатіону, та пригніченням активності ензимів глутатіонової системи як у сироватці крові, так і в гомогенаті печінки [37, 164]. Також, активність СОД та каталази значно знижується в крові та гомогенаті печінки всіх вікових груп щурів під впливом інтоксикації купрум сульфатом, плюмбум ацетатом та гліфосатом [164].

Отже, для оцінки безпечності вживання генетично модифікованих продуктів на організм щурів важливе значення відіграє активність антиоксидантних ензимів. Антиоксидантна система є однією з найважливіших захисних систем організму, яка підтримує оптимальний рівень окисно-відновних процесів, крім того вона знешкоджує побічні продукти ПОЛ, ОМП та АФК, що генеруються за умов різних патологічних

станів та дії токсичних речовин. Споживання трансгенних рослин тваринами та людиною, може містити такі небезпеки для організму: синтез алергенних чи токсичних протеїнів, що кодують штучно внесенні гени у рослину, можливість накопичення гербіциду у насінні генномодифікованих рослин та інше. Вплив генетично модифікованих продуктів на тварин та людину залишається до кінця не вивченим, саме тому визначення вмісту антиоксидантних ензимів у крові та органах може служити одним з основних критеріїв безпечності вживання ГМО.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальна методика та схема проведення дослідження

Дослідження проводилися на щурах лінії Вістар масою 180-220 г. З метою попередження можливого впливу добових ритмів на досліджувані показники, досліди проводили в один і той же час доби. Всі експерименти на тваринах здійснювали у відповідності з „Правилами використання лабораторних експериментальних тварин”. Щурі були поділені на п'ять груп, по 14 щурів у кожній груп (7 самок і 7 самців):

I – інтактні тварини (утримувалися на стандартному раціоні віварію);

II – тварини, яким 20-26 % стандартного раціону замінено на традиційну сою за поживною цінністю;

III – щурі, яким 20-26% стандартного раціону замінено на генетично модифіковану сою, необроблену гербіцидом Roundup;

IV – щурі, раціон яких містив 20-26% трансеної сої, яка була оброблена гербіцидом;

V – щурі, які утримувалися на стандартному раціоні віварію та отримували разом з питною водою гербіцид (0,1 мкг/л), що є допустимою концентрацією в межах вимог Європейського Союзу.

Боби традиційної та трансгенної сої перед додаванням в корми проходили термічну обробку при 140 °C протягом 2 год, для зниження уреазної активності та знешкодження антипоживних речовин.

Після 42 днів утримання на відповідному раціоні, щурів спаровували та одержали через 22-25 днів перше покоління, так було одержано два покоління щурів (покоління F_1 та покоління F_2). Визначали кількість приплоду в I, II, III та IV та V групах у двох поколіннях в гнізді в перший день після народження. У дослідних групах рахували смертність щуренят (покоління F_1 та покоління F_2) на перші 5 діб та протягом першого місяця життя. Після народження щуренят самки (покоління F_0) продовжували утримуватися на тому ж раціоні (I, II, III та IV група) та разом з питною

водою одержувати гербіцид (V група). Через два місяці було відібрано по 24 щура F_1 покоління кожної групи, які продовжували утримуватися на тому ж раціоні. У віці 4 місяці статевозрілих самок та самців F_1 покоління спаровували та через 24-29 днів було одержано F_2 покоління.

У віці 12-ти місяців молодих самок та самців (покоління F_0 , F_1 , F_2) було декапітовано. Декапітацію тварин проводили під легким наркозом, без порушень норм гуманного поводження з лабораторними тваринами, з урахуванням загальноприйнятих біоетичних норм і дотримання міжнародних положень про проведення експериментальних робіт [166].

2.2. Основні методи досліджень.

Визначення активності трипсинового інгібітору в соєвому насінні.

Метод базується на розщепленні казеїну трипсином. Реакцію пригнічує інгібітор трипсину, який отримують екстрагуванням із соєвого насіння.

Оскільки всі реагенти є протеїнами, тому важливими факторами є концентрація водневих іонів, температура, співвідношення ензим-субстрат тощо, тому використовують буферний розчин, відтворюючи рН кишечника. Проводять протеолітичний гідроліз казеїну трипсином. Ензимну реакцію зупиняють хімічною денатурацією протеїнів, вносячи трихлороцтову кислоту. Продуктами ензимної реакції є амінокислоти, які залишаються у розчині. Кількість амінокислот, отриманих у реакційному середовищі визначають реакцією з реактивом Фоліна, продукти якої є забарвленими. За інтенсивністю забарвлення визначають вміст амінокислот за тирозином. Активність трипсинового інгібітору виражають кількістю у мг амінокислоти тирозину, утвореною під час протеолітичного ензимного гідролізу казеїну, віднесеною до 1 г аналізованого матеріалу [120].

Визначення активності уреазу у насінні сої.

Насіння сої подрібнюють і уреазу екстрагують фосфатним буферним розчином. До ферменту додають субстрат - сечовину, розщеплюється з виділенням аміаку. Наявність аміаку змінює рН середовища у лужний діапазон значень.

Подрібнене насіння сої зважують близько 1 г на аналітичних вагах у конічній колбі. У колбу до наважки вносять 50,0 мл фосфатного буферного розчину (рН7,0) і 1,5 г сечовини. Колбу ставлять у струшувач лабораторний і витримують за постійного перемішування 30 хв. за температури 20-25 °С. Визначення рН середовища проводять за допомогою рН-метра.

Активність уреаз (х) характеризують зміною величини рН протягом 30 хв і визначають за формулою :

$$x = \text{pH}_2 - \text{pH}_1$$

де pH_2 – рН суміші зі насіння сої після 30 хв. експозиції у струшувачі-перемішувачі;

pH_1 – рН фосфатного буферного розчину [120, 146].

Визначення активності ліпази у насінні сої

Визначення активності ліпази базується на проведенні гідролізу триацилгліцеридів внесеної олії ліпазою, що міститься у насінні чи продуктах їх переробки. Активність визначають за вмістом вільних жирних кислот, що утворюються під час гідролітичного розщеплення олії ліпазою, яка знаходиться у 1 г наважки.

Свіжоподрібнене на дробарці насіння зважують на технічних вагах, беручи наважку близько 10 г у конічну колбу на 200 мл. До наважки додають 20 мл фосфатного буферного розчину з рН 5,0 і 2 мл рафінованої дезодорованої олії.

Колбу поміщають у термостатований струшувач-перемішувач і проводять ферментативну реакцію за температури 35 °С протягом 1 год. Після проведення реакції її зупиняють, додаючи до вмісту колби 50 мл спиртово-ефірної суміші.

Далі у колбу вносять 5 краплин тимолфталейну(для світлих екстрактів можна використовувати фенолфталейн) і титрують 0,1 н спиртовим розчином КОН до голубого кольору(для фенолфталейну - до рожевого).

Одночасно ставлять контрольну пробу, у яку беруть всі вказані вище компоненти крім наважки матеріалу, і визначають вміст вільних жирних кислот титруванням.

Активність ліпази (x) виражають у мл 0,1 н розчину КОН і визначають за формулою:

$$x = \frac{(V_2 - V_1) \cdot k}{p},$$

де V_2 – об'єм 0,1 н розчину КОН, що пішов на титрування дослідної проби, мл;

V_1 – об'єм 0,1 н розчину КОН, що пішов на титрування контрольної проби, мл;

k – поправка до титру 0,1 н розчину КОН;

p – наважка матеріалу, г [120].

Визначення активності ліпоксигенази у насінні сої

Свіжоподрібнене на дробарці насіння зважують на технічних вагах 5 г, до наважки додають 25 мл фосфатного буферного розчину з рН 7,0 і 50 мл рафінованої дезодорованої олії.

Колбу із сумішшю помішають у термостатований струшувач-перемішувач і проводять ферментативну реакцію за температури 40 °С протягом 1 год. Після проведення ферментативної реакції у колбу додають 10 г хлориду натрію для пришвидшення розшарування емульсії. У розшарованій прозорій олії визначають пероксидне число за стандартною методикою [120].

Одночасно визначають пероксидне число олії без додавання дослідного матеріалу контрольна проба.

Активність ліпоксигенази (x) характеризують зміною пероксидного числа олії з розрахунку вмісту її в одиниці маси дослідного матеріалу:

$$x = \frac{(ПЧ_2 - ПЧ_1)}{p},$$

де $ПЧ_2$ – пероксидне число дослідної проби, ммоль $1/2O_2$ /кг;

ПЧ₁- пероксидне число контрольної проби, ммоль1/2O₂/кг;

p— наважка матеріалу, г.

Визначення перекисного числа в олії.

Перекисним числом жиру називають число мілілітрів розчину тіосульфату натрію (Na₂S₂O₃), що необхідне для титрування вільного йоду, який виділився при окисленні йодиду калію пероксидним угрупованням 1 г жиру. Метод ґрунтується на здатності пероксидних угруповань жиру реагувати з йодидом калію в кислому середовищі.

В першу колбу помістити наважку олії масою 1 г (досліджувана проба), в другу – 1 мл води (контрольна проба). Потім в обидві колби додати по 5 мл льодяної оцтової кислоти, 6 мл хлороформу та 1 мл свіжоприготовленого насиченого розчину йодиду калію. Після цього вміст колб струшувати впродовж 5 хв., додати 10 крапель розчину крохмалю як індикатора й відтитрувати розчином тіосульфату натрію до зникнення синього забарвлення.

Перекисне число (Np або ПЧ) розрахувати за формулою

$$\text{ПЧ} = (V_d - V_k) \cdot f$$

де (V_d-V_k) – різниця результатів титрування відповідно дослідної та контрольної проб 0,005 моль/л розчином Na₂S₂O₃, мл;

f – поправочний коефіцієнт на титр 0,005 моль/л розчину Na₂S₂O₃ [21, 146].

Морфологічні методи дослідження.

Зразки тканин нирок та печінки вирізали із середньої частини, шматочки товщиною біля 5 мм були відібрані для гістологічних досліджень.

Виготовлення гістопрепаратів для світлової мікроскопії:

1) Фіксація тканини. Фіксацію проводили за кімнатної температури (18–20 °C) у 10% розчині нейтрального формаліну більше 48 годин.

2) Заливання проб парафіном і приготування зрізів [112, 69].

Парафіновий блок (на колодці) міцно закріплювали на об'єктотримачі мікротома для різання зрізів. Товщина парафінових зрізів досягала до 10 мкм.

Висушували в термостаті за температури +40 °С протягом двох годин [96].

Наклеєні на предметні скла парафінові зрізи перед фарбуванням звільняли від парафіну за допомогою розчинника – ксилол (після розчинення парафіну ксилол змивали 96° спиртом) і фарбували гематоксилін-еозином.

Мікропрепарати вивчали у світловому мікроскопі. Цифрові копії оптичного зображення отримували за допомогою цифрового фотоапарата Olympus SP550UZ. Ці копії аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми ImageJ (версія 1.48v, вільна ліцензія, W.Rasband, National Institute of Health, USA, 2015).

Гістохімічні методи дослідження Для гістохімічного дослідження відібрані шматочки нирок та печінки, фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну більше 48 годин. Після фіксації матеріал зневоднювали у висхідній батареї розчином етилового спирту та проводили парафінове заливання при температурі +58 °С. Гістологічні зрізи 5 мкм завтовшки забарвлювали на «кислі» та «основні» протеїни бромфеноловим синім за методом Мікель-Кальво. З гістологічних зрізів за стандартних умов освітлення в прохідному світлі робили цифрові копії зображень і аналізували комп'ютерної програми ImageJ, а також виконували комп'ютерну мікроспектрофотометрію у системі кольору RGB (Red, Green, Blue).

Для вимірювання окиснювальної модифікації протеїнів застосовано коефіцієнт R/B, який отримують шляхом попереднього комп'ютерного мікроспектрометричного визначення величин червоної (R) та синьої (B) ділянки спектру забарвлення при застосуванні 256 градацій інтенсивності кольору.

Біохімічні методи дослідження.

Дослідження кількості еритроцитів

Після декапітації тварин кров відбирали у пробірку з гепарином. Кількість еритроцитів у крові визначали з використанням камери Горяєва [85].

Дослідження вмісту гемоглобіну

Вміст гемоглобіну визначали гемоглобінціанідним методом. Оптичну густину отриманого розчину гемоглобінціаніду визначали на спектрофотометрі за довжини хвилі поглинання 540 нм проти трансформуючого розчину [15].

Визначення вмісту сечовини у сироватці крові та сечі.

Вміст сечовини в сироватці крові та сечі визначали спектрофотометричним методом за допомогою набору реактивів «Філіст-Діагностика» (Дніпропетровськ). Принцип методу заснований на тому, що сечовина утворює з діацетилмонооксимом у присутності іонів заліза (III) та тіосемікарбазиду комплекс червоного кольору, за інтенсивністю забарвлення якого визначали її концентрацію. Оптичну щільність визначали фотометрично на фотоколориметрі КФК-3 при довжині хвилі 540-560 нм в діапазоні (0-1,0) од. Довжина оптичного шляху складала 10 мм [94].

Визначення креатиніну кінетичним методом у сироватці крові та сечі.

Вміст креатиніну у сироватці крові та сечі визначали фотометричним методом за допомогою набору реактивів «Філіст-Діагностика» (Дніпропетровськ). Принцип методу заснований на тому, що пікринова кислота взаємодіє у лужному середовищі з креатиніном з утворенням забарвленого комплексу між креатиніном та пірат іоном [95, 101].

Визначення вмісту сечової кислоти у сироватці крові та сечі.

Вміст сечової кислоти у сироватці крові та сечі визначали фотометричним методом. Принцип метода заснований на тому, що концентрація сечової кислоти пропорційна інтенсивності блакитного кольору, який виникає при реакції з фосфорно-вольфрамовим реактивом. Оптичну щільність визначали на фотоколориметрі КФК-3 при довжині хвилі 650 нм. Довжина оптичного шляху складала 10 мм [13].

Визначення загального протеїну.

Вміст загального протеїну у тканинах і сечі визначали за біуретовою реакцією [7]. Протеїни реагують в лужному середовищі з сірчаною кислотою з утворенням сполук, забарвлених в фіолетовий колір. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 540 нм, вона пропорційна концентрації протеїну, яку виражали в г/л [8].

Визначення аланінамінотрансферазної активності (КФ 2.6.1.2)

Аланінамінотрансферазну активність у тканинах визначали фотометричним методом за допомогою набору реактивів «Філіст-Діагностика» (Дніпропетровськ).

Принцип методу базується на амінуванні 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном, яке відбувається під дією аланінамінотрансферази, в результаті чого утворюються L-глутамінова та піровиноградна кислоти. Визначення базується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразонів 2-оксоглутарової та піровиноградної кислот в лужному середовищі. Оскільки, гідразон піровиноградної кислоти має більш високий коефіцієнт молярної екстинції, то виявляється прямо пропорційна залежність оптичної щільності реакційного розчину від ензимної активності [176]. Розрахунок ензимної активності в сироватці крові проводили за калібрувальним графіком і виражали в мкмоль/год на мл сироватки крові або мкмоль/год на мг білка.

Визначення аспартатамінотрансферазної активності (КФ 2.6.1.1)

Аспартатамінотрансферазну активність у тканинах визначали фотометричним методом за допомогою набору реактивів «Філіст-Діагностика» (Дніпропетровськ).

Принцип методу базується на амінуванні 2-оксоглутарової кислоти L-аспарагіновою кислотою, з утворенням L-глутамінової та 2-оксоглутарової кислот. За дії аспартатамінотрансферази, щавлевооцтова кислота самовільно декарбоксилюється з утворенням піровиноградної кислоти. Визначення базується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразонів 2-оксоглутарової та піровиноградної кислот в

лужному середовищі. Оскільки, гідразон піровиноградної кислоти має більш високий коефіцієнт молярної екстинції, то виявляється прямо пропорційна залежність оптичної щільності реакційного розчину від ензимної активності [176]. Розрахунок ензимної активності в сироватці крові проводили за калібрувальним графіком і виражали в мкмоль/год на мл сироватки крові або мкмоль/год на мг білка.

Визначення γ -глутамілтранспептидазної активності (ГГТ) (КФ 2.3.2.2)

Принцип методу базується на тому, що за дії γ -глутамілтранспептидази глутаміновий залишок з γ -L-(+)-глутаміл-4-нітроаніліда переходить на дипептидний акцептор-гліцилгліцин. При цьому вилучається хромоген-п-нітроанілін. Оптичну щільність реакційного розчину виміряють після гальмування ензимної реакції оцтовою кислотою [163].

Ензимна активність ГГТ виражали у мкмоль/год·мл сироватки крові, з врахуванням наступного перерахунку:

$$\text{мкмоль}/(\text{с} \cdot \text{л}) = \text{мккат}/\text{л} = 60 \text{Мод}/\text{л} (\text{U}/\text{L}) = 3,6 \text{ мкмоль}/(\text{год} \cdot \text{мл}).$$

Визначення протеїнових фракцій крові

Вміст альбумінів, α -, β - і γ -глобулінів досліджували нефелометричним методом з використанням фосфатних буферів [28].

Принцип методу ґрунтується на тому, що фосфатні розчини визначеної концентрації осаджують протеїнові фракції плазми крові з утворенням суспензії, ступінь каламутності якої визначають нефелометрично при довжині хвилі 590–670 нм. Вміст кожної фракції обчислювали у %, приймаючи їх загальну суму за 100%.

Визначення рівня молекул середньої маси.

Принцип метода заснований на осадженні високомолекулярних протеїнів з досліджуваної рідини 10% розчином ТХО з подальшим центрифугуванням та визначення абсорбції світла супернатанту при 10 кратному розведенні дистильованою водою [20].

Хід визначення рівня молекул середньої маси в крові (гомогенат): сироватку крові обробляли 10% розчином ТХО. До 1 мл сироватки (гомогенат) додавали 0,5 мл 10% ТХО. В якості контролю використовували сам розчин ТХО розведений у 30 разів дистильованою водою. Оптична щільність його проти води складає 0,123 ум. од. на хвилі 254 нм.

Дослідні зразки центрифугували при 3000 об/хв. протягом 30 хвилин. До 0,5 мл надосадової рідини додавали 4,5 мл дистильованої води. Вміст пробірки перемішували і вимірювання проводили на спектрофотометрі в УФ світлі при довжині хвилі 280 нм — для визначення ароматичних амінокислот і при довжині хвилі 254 нм — для визначення аліфатичних амінокислот проти контролю. Рівень МСМ виражають в умовних одиницях, кількісно рівних показникам екстинції на мг протеїну.

Визначення вмісту карбонільних похідних у гомогенатах печінки та нирках.

Визначення вмісту карбонільних похідних протеїнів у субклітинних фракціях печінки та нирок проводили з використанням динітрофенілгідразину (ДНФГ).

Принцип методу ґрунтується на взаємодії карбонільних похідних з ДНФГ, в результаті чого утворюються похідні динітрофенілгідразону, кількість яких пропорційна кількості карбонільних похідних у молекулах протеїну [44]. Вміст карбонільних похідних протенів виражали в нмоль на мг протеїну.

Визначення вмісту протеїнових сульфгідрильних груп.

Визначення вмісту протеїнових сульфгідрильних груп (SH-груп) у субклітинних фракціях проводили методом, який заснований на використанні реагенту Елмана, який реагує з SH-групами, утворюючи змішаний дисульфід та вивільняючи при цьому тіонітрофенільний аніон, кількість якого прямопропорційна кількості вільних SH-груп протеїнів, що прореагували з реактивом Елмана. Вміст протеїнових SH-груп виражали в нмоль/мг протеїну [174].

Визначення протеолітичної активності.

Визначення протеолітичної активності (модифікований метод Ансона). Метод заснований на гідролізі гемоглобіну до пептидів та амінокислот з послідовним їх визначенням. За одиницю протеолітичної активності прийнята здатність ензиму перетворювати за 1 хв. при температурі 30°C гемоглобін в неосаджений трихлороцтовою кислотою стан в кількості, що відповідає 1 мкмоль тирозину [153]. Протеолітичну активність гомогенату печінки та нирок виражали в нмоль/хв·мг протеїну.

Визначення вмісту відновленого глутатіону у крові та досліджуваних тканинах.

Сульфгідрильна група відновленого глутатіону вступає в реакцію з 5,5-дітіобіс- (2-нітробензойної) кислотою (реактив Елмана), в результаті чого в еквімолярних кількостях утворюється забарвлений в жовтий колір тіонітрофенільний аніон (ТНФА), що має максимум поглинання при 412 нм.

До сироватки крові доливають 1,0 мл 20% ТХО, пробу ретельно перемішують і залишають в холодильнику на 15-20 хв. Проби виймають з холодильника і центрифугують 15 хв. при 3000 об / хв. і 0-4 ° С. У дві хімічні пробірки наливають по 0,5 мл фосфатного буфера і в кожну додають по 1,0 мл надосадової рідини. У дослідну пробірку доливають 0,05 мл розчину реактиву Елмана, а в контрольну пробірку № 2 – 0,05 мл метанолу. Вміст пробірок добре перемішують. Вимірюють оптичну щільність дослідної та контрольної проб проти фосфатного буфера (0,3 М фосфатный буфер, рН 8,0) при 412 нм в кюветі 10 мм [29].

$$A = \frac{(E_0 - E_k) \times 10,55 \times 10^6 \times 166,4}{13100}$$

A – активність фермента в мкМ відновного глутатіона /(л·хв);

E₀ - оптична густина дослідної проби в порівнянні з дослідною при ферментативному окисленні глутатіона;

Ек - оптична густина контрольної проби в порівнянні з дослідною при ферментативному окисненні глутатіона;

10,55 - кінцевий об'єм проби, мл;

166,4 - фактор розведення;

10^6 - переведення мМоль в мкМоль

13100 - коефіцієнт молярної екстинкції ТНФА

Визначення глутатіонпероксидазної активності (КФ 1.11.1.9)

Глутатіонпероксидаза регулює рівень екзогенного й ендогенного гідрогенпероксиду та гідроксильного аніону, контролює ліпопероксидацію мембранних структур клітин та може окиснювати SH-групи протеїнів.

Ензиму активність визначали з використанням реактиву Елмана. До 31,88 ммоль/л розчину глутатіону (24,3 мг глутатіону відновленого, 27,7 мг Na_2EDTA та 14,5 мг натрію азиду розчинили в 35 мл фосфатного буферу рН 7,4) додавали гемолізату чи супернатанту та інкубували 5 хв за 37 °С; додавали 0,1 мл 13,8 ммоль/л розчину пероксиду водню реакцію зупиняли 2 мл 20% розчином трихлороцтової кислоти. В контрольну пробу після додавання 20% розчину ТХО додавали пероксид водню. Центрифугували протягом 15 хв за 3000 об/хв. Далі до 0,5 мл надосадної рідини із контрольної та дослідної проб додають по 10 мл фосфатного буферу (рН 7,4) та додають 0,05 мл реактиву Елмана (0,01 М розчин ДТНБК у метанолі). Через 5 хв визначали адсорбцію при довжині хвилі 412 нм на СФ-46. Активність глутатіонпероксидази виражали в мкмоль відновленого глутатіону/хв×мг протеїну [98].

Визначення глутатіонтрансферазної (КФ 2.5.1.18) активності у біологічному матеріалі.

Глутатіонтрансферазну активність плазми крові визначали спектрофотометрично при $\lambda=340$ нм в 0,1 М калій-фосфатному буфері (рН 6,5), що містив 1 мМ ЕДТА 1 мМ 1-хлор-2,4-динітробензол, 5 мМ відновленого глутатіону. Суспензію клітин доводили до 0,4 мг протеїну на 1 мл реакційного середовища. Глутатіонтрансферазну активність розраховували в нмоль відновленого глутатіону/хв на 1 мг протеїну [169],

враховуючи, що молярний коефіцієнт екстинції 1-хлор-2,4-динітробензолу дорівнює $9,6 \cdot 10^{-3} \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Визначення загальної супероксиддисмутазної активності (КФ 1.15.1.1) в органах та крові.

СОД – ензим, що здійснює дисмутацію супероксид-аніон радикалів і підтримує їх вміст на оптимальному рівні, забезпечуючи, таким чином, гомеостаз у клітині та в цілому організмі.

Супероксиддисмутазну активність визначали за методикою І. П. Кайдашева, 2003 [7], принцип якої ґрунтується на тому, що у присутності СОД швидкість аутоокиснення адреналіну в лужному середовищі знижується. Порівняння швидкості аутоокиснення адреналіну в присутності СОД та без неї дає можливість оцінити активність СОД у дослідному матеріалі. Одержані результати виражали в мкмоль/хв·мг протеїну. Процент інгібування розраховують за формулою:

$$\% \text{ інгібування} = [1 - (D_o/D_k)] \times 100 \%$$

*де D_o -оптична густина в присутності гемолізат чи гомогената,
 D_k -оптична густина в відсутності гемолізат чи гомогената.
 Активність СОД розраховують в умовних одиницях активності.
 За 1 ум. од. акт. приймали 50 % інгібування реакції.*

Визначення каталазної активності (КФ 1.11.1.6).

Каталазна активність в гомогенатах органів визначали методом [67]. До 0,1 мл гомогенату клітин додавали 2 мл 0,03 % розчину H_2O_2 . У контрольну пробу замість гомогенату вносили 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняли через 10 хв. додаванням 1 мл 4% молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі при $\lambda=410$ нм у порівнянні з контрольною пробєю, у яку замість H_2O_2 додавали 2 мл води. Каталазну активність розраховували за різницею екстинкції контрольної і дослідної

проб та з врахуванням коефіцієнта мілімолярної екстинкції H_2O_2 ($22,2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel, використовуючи t-критерій Стюдента. Вірогідними вважали результати, якщо $p \leq 0,05$. При цьому в таблицях та рисунках для позначення достовірної розбіжності між групами використовували наступні символи:

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Хімічний склад бобів традиційної і трансгенної гліфосат-резистентної сої

Останніми роками широко почали використовувати генетично модифіковану сою з новою ознакою «Roundup Ready». Тому, перед додаванням у корм експериментальних тварин сої, проводилося якісне визначення у зразках сої наявності генетично модифікованих вставок. У дослідженнях було використано традиційну сою вітчизняного сорту Чернівецька 9 селекції Буковинської державної сільськогосподарської дослідної станції НААН. Зразки сої обох сортів (Чернівецька 9 та лінії GTS 40-3-2) були перевірені на наявність генетичної модифікації, що підтверджено Українською лабораторією якості і безпеки продукції АПК протоколом №1691-Н. У зразку №2 виявлені цільові послідовності промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) та термінатора NOS (T-NOS) T1 плазмиди *Agrobacterium tumefaciens* (табл. 3.1.1).

Таблиця 3.1.1.

Виявлення генетично модифікованих продуктів з їх вмістом у зразках сої, ($M \pm m$, $n=3$)

Найменування показників, одиниць вимірювань	Сорт Чернівецька 9	Сорт сої лінії GTS 40-3-2
<i>Кількісний аналіз</i>		
Масова частка ГМО, %	не виявлено	більше 10 %
<i>Якісний аналіз</i>		
Цільова послідовність промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV)	не виявлено	виявлено
Цільова послідовність термінатора NOS (нопалінсинтази (NOS) <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	не виявлено	виявлено
Цільова послідовність ГМ-лінії MON 89788	не виявлено	не виявлено

Водночас, проводились аналізи на поживну цінність насіння традиційної та генетично модифікованої сої. Аналіз результатів показав, що соя сорту Чернівецька 9 за хімічним складом (вологість, масова частка протеїну, жирів, мікро- та макроелементів) ідентична генетично модифікованому гліфосат-резистентному сорту сої лінії GTS 40-3-2. Виявлені за окремими показниками різниці знаходяться у межах біологічної норми (табл. 3.1.2). Як видно з таблиці 3.1.2. насіння традиційної сої (сорт Чернівецька 9) містить на 6% більше протеїну, ніж сорт сої лінії GTS 40-3-2 та менше на 2,59% сирої клітковини, а масової частки олії в перерахунку на суху речовину менше на 3,48%, що вказує на її більшу поживну цінність (додаток А).

Таблиця 3.1.2.

Визначення поживної цінності традиційної (сорт Чернівецька 9) та трансгенної (сорт сої лінії GTS 40-3-2) сої, ($M \pm m$, $n=3$)

<i>Найменування показників, одиниць вимірювань</i>	<i>Сорт Чернівецька 9</i>	<i>Сорт сої лінії GTS 40-3-2</i>
Вологість, %	10,47± 0,05	9,97±0,01***
Масова частка протеїну в перерахунку на суху речовину, %	40,67±0,23	34,63±0,16***
Масова частка олії, на натуральну вологість, %	18,17±0,03	21,49±0,07***
Масова частка олії, в перерахунку на суху речовину, %	22,17±0,03	25,65±0,07***
Масова частка сирої клітковини, на натуральну вологість, %	11,92±0,38	14,51±0,01***

Примітка: *** $p \leq 0,001$ порівняно з показниками традиційної сої (сорт Чернівецька 9).

При добрій термічній або хімічній обробці більшість антипоживних речовин знешкоджується через те, що вони протеїнової природи. Для того щоб переконатися, що ці речовини дійсно знешкодилися, у насінні сої

визначалася активність трипсинового інгібітору, уреазу (табл. 3.1.3), ліпази та ліпоксигенази (табл. 3.1.4).

Так, уреазу являється ензимом під дією якого відбувається гідроліз сечовини до аміаку і вуглекислого газу. Уреазу бобів сої в шлунку тварини розщеплює сечовину шлункового соку, чим залужнює середовище навколо часточок корму, що перешкоджає дії пепсину. Розщеплюючи сечовину кишкового соку, уреазу сприяє вивільненню аміаку, який є токсичним для організму тварин. Показник активності уреазу дає змогу непрямим методом оцінити необхідну ступінь обробки бобів сої. Для знешкодження антипоживних речовин та зниження уреазної активності соєві боби перед додаванням в корми термічно обробляли протягом 2 год варили, після чого висушували у сушильній шафі при 140 °С. Після такої термічної обробки насіння обох сортів сої перевіряли на наявність антипоживних речовин за загально прийнятими методиками [105, 120]. За результатами дослідження активність уреазу в термічно обробленій сої традиційній, генетично модифікованій необробленій гербіцидом та обробленій гербіцидом становить 0,005, 0,001 та 0,011 (у нормі не більше 0,05 од. рН, на відгодівлі – 0,1 од. рН, для корів – 0,2-0,3 од. рН) (табл. 3.1.3).

Таблиця 3.1.3.

**Вміст інгібітора трипсину та активності уреазу у насінні сої сорту
Чернівецька 9 та сорту сої лінії GTS 40-3-2, ($M \pm m$, $n=14$)**

<i>Сорт</i>	<i>Вміст інгібітору трипсину, мг/г</i>	<i>Активність уреазу, рН</i>	<i>Висновок</i>
Сорт Чернівецька 9	1,98±0,039	0,046±0,0041	Ступінь інактивації достатній
Сорт сої лінії GTS 40-3-2 (не оброблена)	2,18±0,091	0,054±0,0028	Ступінь інактивації достатній
Сорт сої лінії GTS 40-3-2 (оброблена)	2,24±0,16	0,054±0,0067	Ступінь інактивації достатній

У насінні сої також можуть бути присутні інгібітори протеолітичних ензимів, зокрема трипсиновий інгібітор, який є низькомолекулярним протеїном. Інгібітори Кунітца та Баумана-Бірк, які мають молекулярну масу 20-22 кДа, утворюють з ензимами стійкі сполуки, які не проявляють ензимної активності. У шлунку тварин інгібітор трипсину, що може міститися у насінні сої, не дає змоги трипсину розщепити протеїни кормів. Тварини отруюються в результаті протікання процесів гниття у кишечнику.

Отже, представлені в таблиці 3.1.3 результати досліджень показали, що термічна обробка насіння призводить до знешкодження антипоживних речовин, що узгоджується з даними літературних джерел [125].

У насінні сої також може міститися ліпаза, яка каталізує гідролітичне розщеплення складноефірних зв'язків у жирах. Крім того, у соєвих бобах також може міститися ліпоксигеназа (ліпоксидаза, ліпооксидаза), яка каталізує окиснення жирів. Ензимну активність протеїн проявляє у визначеному діапазоні рН і температури. Ліпоксигеназу відносять до класу оксидоредуктаз, кінцевими продуктами гідролізу є пероксиди, гідропероксиди, які визначають за пероксидним числом. Результати дослідження показали деяке підвищення кислотності у насінні трансеної сої (табл. 3.1.4), що очевидно пояснюється підвищення гідролітичної активності ензимів [105].

Таблиця 3.1.4.

Показники кислотного та пероксидного числа у насінні сої сорту Чернівецька 9 та сорту сої лінії GTS 40-3-2 ($M \pm m$, $n=14$).

<i>Сорт</i>	<i>Кислотне число, мг KOH/г</i>	<i>Перекисне число олій, ммоль 1/2O/кг</i>
Сорт Чернівецька 9	1,42±0,12	1,55±0,048
Сорт сої лінії GTS 40-3-2 (не оброблена)	1,58±0,15	1,41±0,06
Сорт сої лінії GTS 40-3-2 (оброблена)	1,65±0,18	1,50±0,056

Отже, термічна обробка насіння сої призводить до знешкодження уреази та інгібітора трипсину, хоча вміст інгібітора трипсину та активність уреази залишається більшою у насінні трансгенної сої ніж традиційної, але вірогідної різниці між ними немає (див. табл. 3.1.3). Термічна обробка насіння сої призводить до часткової інактивації ліпази та ліпооксигенази, як у традиційній, так і в трансгенній сої. При цьому вміст ліпази у насінні трансгенної сої залишається більшим, ніж у традиційної, про що свідчить збільшення кислотного числа (див. табл. 3.1.4). Ліпаза і ліпоксидаза, можуть викликати гідроліз і окиснення соєвого жиру, при цьому утворюються окиснені продукти поліненасичених жирних кислот які проявляють високу біологічну активність по відношенню до клітинних мембран. При високій концентрації їх в кормі може спостерігатися отруєння тварин. Саме термічна обробка насіння інактивує ці ензими, що також зменшує вміст пероксидів ліпідів та вільних жирних кислот навіть при тривалому зберіганні сої, і не призводить до негативних наслідків [105].

3.2. Особливості протеїнового обміну у щурів, яким згодовували трансгенну сою та гербіцид Roundup

Розвиток клінічних проявів різноманітних змін в організмі залежить від адаптаційних можливостей біохімічних систем організму, функціонування яких порушується за екстремальних умов, у тому числі і за дії токсичних речовин.

З метою дослідження можливого негативного впливу генетично модифікованої сої обробленої та необробленої гербіцидом Roundup, а також самого гербіциду на організм щурів було вивчено склад периферичної крові експериментальних тварин (табл. 3.2.1).

В крові щурів досліджували кількість еритроцитів та лейкоцитарну формулу. В результаті проведеного дослідження було встановлено, що вживання генетично модифікованої сої та гербіциду не викликало статистично значущих відхилень в кількості лейкоцитів. Не спостерігалось змін лейкоцитарної формули, а саме кількості базофілів, еозинофілів,

нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів в контрольних та експериментальних групах протягом дванадцяти місяців.

Таблиця 3.2.1.

Вплив генетично модифікованої сої та гербіциду Roundup на гематологічні показники перифірійної крові у щурів (F₀, F₁, F₂ поколінь), (M±m, n= 10)

Показники	Групи експерименту				
	I група	II група	III група	IV група	V група
	F ₀ покоління				
Гемоглобін, г/л	147±7,8	136±13,9	144±2,75	136±2,7	119±3,7**
Еритроцити, 10 ¹² /л	4,1±0,017	4,1±0,009	4,4±0,011*	4,4±0,072***	4,42±0,105***
Лейкоцити 10 ⁹ /л	7,8±0,09	7,4±0,08**	7,5±0,073**	10,4±0,06**	11,4±0,06**
ШОЕ, мм/год	2,5±0,17	2,3±0,15	2,6±0,16	2,4±0,22	2,7±0,21
Еозинофіли, %	1,3±0,15	1,33±0,17	1,5±0,17	1,6±0,13	1,6±0,13
Нейтрофіли паличеоядерні, %	1,5 ±0,189	2,22±0,13*	2,25±0,16*	2,33±0,17***	2,67±0,21***
Нейтрофіли сегментоядерні,%	14,7±0,78	13,7±0,5***	13,7±0,28***	18,6±0,83***	21,7±1***
Лімфоцити, %	52,3±1,15	51,6±1,07	55,9±1,96	60±3,56	64,6±2,14***
Моноцити, %	3,1±0,44	3,4±0,34	3,3±0,5	3,1±0,23	4,1±0,53
F ₁ покоління					
Гемоглобін, г/л	130±3,7	122±1,87	100±1,0***	116±3,9*	111±2,9***
Еритроцити, 10 ¹² /л	4,2±0,102	4,28±0,055	4,29±0,08	4,29±0,053	4,36±0,045
Лейкоцити 10 ⁹ /л	7,2±0,063	7,5±0,73**	7,2±0,082*	9,5±0,092***	9,4±0,58***
ШОЕ, мм/год	2,6±0,16	3,0±0,21	3,3±0,14**	3,5±0,17**	3,7±0,16***
Еозинофіли, %	1,44±0,18	1,3±0,17	1,3±0,15	1,4±0,16	1,5±0,17
Нейтрофіли паличеоядерні, %	1,4±0,176	1,33±0,17	1,3±0,15	1,38±0,16	1,4±0,17
Нейтрофіли сегментоядерні,%	12,3±0,53	11,56±0,82	12,3±0,46	18,1±1,61**	17,3±1,52**
Лімфоцити, %	59,4±1,15	60,7±1,3	61,8±1,87	62,8±1,44	64±3,28
Моноцити, %	3,4±0,5	3,1±0,23	2,8±0,27	3,0±0,37	3,3±0,26
F ₂ покоління					
Гемоглобін, г/л	120±3,67	123±1,27	117±1,0*	108±1,6**	110±1,29*
Еритроцити, 10 ¹² /л	4,06±0,066	4,1±0,18	4,26±0,054	4,12±0,066	4,21±0,048
Лейкоцити 10 ⁹ /л	7,2±0,082	7,5±0,012	7,2±0,073***	9,7±0,037***	9,6±0,03***
ШОЕ, мм/год	2,3±0,15	2,4±0,22	3,1±0,23*	3,2±0,2**	3,6±0,16***
Еозинофіли, %	1,6±0,22	1,78±0,22	1,89±0,17	1,89±0,21	1,6±0,13
Нейтрофіли паличеоядерні, %	1,4±0,15	1,7±0,26	1,7±0,28	2,0±0,21	2,0±0,21
Нейтрофіли сегментоядерні,%	12,6±0,5	13±0,62	14,3±0,63***	18,9±1,017***	20,3±0,68***
Лімфоцити, %	59±0,59	60,6±0,6	62,4±1,27*	63,9±1,06***	71,3±2,08***
Моноцити, %	3,1±0,47	2,9±0,28	3,1±0,35	3±0,15	3,4±0,4

Примітка. Тут і надалі: * p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001 порівняно з показниками контрольної групи.

У всіх дослідних групах не спостерігалось значних змін в кількості еритроцитів у порівнянні з контролем та вихідними даними. Кількість лейкоцитів у тварин експериментальних груп залишалася в межах норми (у II та III групах), а у IV та V групі спостерігалось незначне зниження лімфоцитів та підвищення моноцитів після довготривалого вживання трансгенної сої та гербіциду Roundup. Також у F_0 поколінні підвищується у крові кількість сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів, у F_1 та F_2 поколінні лише нейтрофілів сегментоядерних. По іншим показникам не спостерігалось змін лейкоцитарної формули крові експериментальних щурів. Такі дані можуть свідчити про можливий негативний токсичний вплив гербіциду на організм щурів. Слід зазначити, що встановлені нами зміни не є самостійним гематологічним симптомом, оскільки у переважній більшості випадків токсичний вплив речовин супроводжує стани, за яких у лейкоцитарній формулі збільшено число нейтрофілів, і це свідчить про інтоксикацію організму [4].

З метою дослідження змін, що відбуваються в організмі щурів під час довготривалого споживання гербіциду Roundup та трансгенної сої обробленої та необробленої цим гербіцидом, визначалося співвідношення протеїнових фракцій у сироватці крові щурів F_0 , F_1 та F_2 поколінь (таб. 3.2.2). Результати дослідження крові показали значне зниження вмісту альбумінів у V групі у F_0 поколінні приблизно до 19,6 %, у F_1 поколінні до 17,2 % та F_2 поколінні до 17,69 %, та у IV групі у F_0 поколінні приблизно до 25,25 %, у F_1 поколінні до 21,58 % та у F_2 поколінні щурів до 18,6 %. Очевидно, такі результати свідчать про зниження протеїнсинтезуючої функції та порушення роботи печінки під час довготривалого споживання гербіциду та ГМ-сої обробленої цим гербіцидом. За дії досліджуваних ксенобіотиків спостерігалось зменшення вмісту альбумінів у плазмі крові тварин усіх трьох поколінь: у F_0 поколінні – на 34 % (V група) та 29 % (IV група), у F_1 поколінні – на 30 % (V група) та 26 % (IV група), у F_2 поколінні – на 42 % (V група) та 41% (IV група) (табл. 3.4.2). Також спостерігалось зниження

альбумінів у III групі: на 27 % (F_0 покоління), 25 % (F_1 покоління) та 34 % (F_2 покоління). У II спостерігалось найбільше зниження альбумінів на 22 % (F_1 покоління).

У тварин експериментальних груп всіх трьох поколінь спостерігали тенденцію до зростання концентрації α_1 -, α_2 -, β -глобулінів та фракцій γ -глобулінів порівняно з контрольною групою (табл. 3.4.1). Так, концентрація α_1 -, α_2 - та β -глобулінів у сироватці крові щурів за комбінованого впливу Roundup (V група) та ГМ-сої підвищилася (IV група). У F_0 покоління (V група), відповідно, у 1,6, 2 та 4 рази від рівня інтактних тварин, щодо γ -глобулінів, то їх вміст не змінився. У F_1 покоління також спостерігалось зростання концентрації α_1 -, α_2 -, β -глобулінів у 1,6, 1,7 та 2,3 рази, щодо γ -глобулінів, то їх вміст збільшився у 1,24 рази. У F_2 покоління – концентрації α_1 -, α_2 -, β -глобулінів у 1,3, 1,82 та 3,4 рази та γ -глобулінів у 1,5 рази порівняно з контролем. У IV групі зростала концентрація α_1 -, α_2 -, β -глобулінів у 1,7, 2,3 та 3,2 рази, а γ -глобулінів знижувалася у 1,2 рази у F_0 покоління. У F_1 покоління їх концентрації зростають у 1,6, 2,3 та 2,2 рази, а вміст γ -глобулінів не змінювався порівняно з контролем. У F_2 покоління концентрація α_1 -, α_2 -, β -глобулінів зростала у 1,3, 1,82 та 3,4 рази, а γ -глобулінів у 1,5 рази. У III дослідній групі також спостерігалось збільшення концентрації α_1 -, α_2 -, β -, γ -глобулінів: у F_0 покоління у 2,4 рази, концентрації α_2 - та γ -глобулінів не змінювалися, а β -глобулінів збільшувалися 3,3 рази; у F_1 покоління у 1,9, 2,3, 1,3 та 1,2 рази. У F_2 покоління концентрація α_1 -глобулінів не змінювалася, а концентрації α_2 -, β -, γ -глобулінів збільшувалися у 1,94, 2,6 та 1,7 рази порівняно з контролем.

При цьому у II групі також спостерігалось збільшення концентрації α_1 -, α_2 -, β -, γ -глобулінів практично у всіх трьох поколіннях щурів: концентрація α_1 -глобулінів зменшувалася у 1,2 рази та підвищувалася концентрація протеїнів всіх інших фракцій у 2,5, 3,3 та 1,2 рази порівняно з контрольною групою (у F_0 покоління). У F_1 покоління підвищувалася концентрація α_2 -глобулінів у 2 рази, а інших фракцій глобулінів у 1,6 рази. У

F₂ поколінні концентрація α 1-глобулінів зменшувалася у 1,8 разу, проте концентрації α 2-глобулінів та β -глобулінів підвищувалися у 2,5 та 2 рази, водночас не змінювалася концентрація γ -глобулінів.

Відомо, що співвідношення між різними класами протеїнових структур у сироватці крові відображає стан організму [10, 65]. Альбуміновий коефіцієнт (співвідношення між кількістю альбумінів і сумою глобулінів) є показником стану протеїнового обміну в організмі. Низькі значення цього показника вказують на зростання катаболізму протеїнів.

Отже, вказані зміни співвідношення протеїнових фракцій у крові щурів свідчать про сповільнення синтезу альбумінів у печінці при вживанні сої та гербіциду. Наведені вище результати наших досліджень вказують на те, що, поряд із змінами розподілу та вмісту протеїнових фракцій, відбуваються зміни стану імунної системи. Відомо, що на вікові особливості функціонування імунної системи впливають як екзо-, так і ендогенні чинники (токсичні речовини) [10]. У II дослідній групі збільшення концентрації γ -глобулінів несуттєва, окрім F₁ покоління. Аналізуючи дані наших досліджень, можемо вважати, що використані токсиканти (гербіцид та оброблена ним соя) пригнічують гуморальну ланку імунітету в тварин в усіх поколіннях [65]. Відомо, що коефіцієнт альбуміно/глобулінового співвідношення (А/Г) – важливий діагностичний тест протеїнового обміну в організмі, який у нормі складає 1,2-2. Аналіз отриманих нами результатів засвідчує, що рівень А/Г-співвідношення знаходиться в межах 0,33-0,2 та є нижчим від значень контролю в 6 разів (таблиця 3.2.2). Таким чином, низькі значення цього показника вказують на зниження резерву легкодоступних амінокислот та зростання катаболізму протеїнів внаслідок деструктивних змін у печінці. Такі зміни могли викликати вживання гербіциду разом з питною водою (V група) та залишок гербіциду в насінні генетично модифікованої сої (IV група), про що свідчать результати лабораторних досліджень (додаток В), концентрація гліфосату перевищує норму і становила у термічно обробленій сої - 0,78 мг/кг і даний показник перевищує

норму по НД на продукт (термічно оброблене насіння сої) у 2,6 разу. Крім того, результати лабораторних дослідження показали, що термічно оброблена генетично модифікована соя, яку необробляли гербіцидом Roundup містить залишок гліфосату у насінні $<0,3$ мг/кг. Тобто досліджуваний зразок відповідає вимогам ДСанПіН 8.8.1.2.3.4-000-2001 “Допустимі дози, концентрації, кількості та рівні вмісту пестицидів у сільськогосподарській сировині, харчових продуктах, повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді водоймищ, ґрунті”.

Таблиця 3.2.2.

Співвідношення протеїнових фракцій у сироватці крові щурів F_0 , F_1 , F_2 поколінь за вживання традиційної, обробленої і необробленої трансгенної сої, та гербіциду «Roundup» у питній воді, ($M \pm m$, $n=10$)

Покоління	Показники		Група тварин				
			I група	II група	III група	IV група	V група
I покоління	Альбуміни, %		54 $\pm$ 2,8	32,4 $\pm$ 2,2*	27,5 $\pm$ 2,19***	25,25 $\pm$ 1,8***	19,6 $\pm$ 0,91***
	Глобуліни, %	α_1 -глобуліни	8,2 $\pm$ 0,84	6,97 $\pm$ 0,95*	19,3 $\pm$ 1,6***	13,89 $\pm$ 1,8*	13,45 $\pm$ 1,65*
		α_2 -глобуліни	7,8 $\pm$ 1,1	19,43 $\pm$ 1,2***	7,5 $\pm$ 1,5***	18,44 $\pm$ 1,75**	15,38 $\pm$ 1,5***
		β -глобуліни	6,8 $\pm$ 0,63	19,03 $\pm$ 1,96***	22,7 $\pm$ 1,8***	22,04 $\pm$ 1,9***	26,58 $\pm$ 1,8***
		γ -глобуліни	23,32 $\pm$ 1,9	22 $\pm$ 2,47	28 $\pm$ 2	18,29 $\pm$ 1,9	23,51 $\pm$ 1,7
	А/Г коефіцієнт		1,34	0,66	0,37	0,33	0,2
II покоління	Альбуміни, %		48 $\pm$ 1,5	38,7 $\pm$ 0,5***	23,5 $\pm$ 2,22***	21,58 $\pm$ 1***	17,2 $\pm$ 1***
	Глобуліни, %	α_1 -глобуліни	7 $\pm$ 0,78	11,1 $\pm$ 0,5***	13,5 $\pm$ 1,3*	10,9 $\pm$ 0,94*	10,6 $\pm$ 0,6*
		α_2 -глобуліни	7,15 $\pm$ 0,7	15,1 $\pm$ 0,94*	16,22 $\pm$ 1,2***	15,93 $\pm$ 1,5***	11,8 $\pm$ 1,1***
		β -глобуліни	12,3 $\pm$ 1	19,7 $\pm$ 1,2***	16,4 $\pm$ 1,7*	26,6 $\pm$ 1,2***	28,7 $\pm$ 1,3***
		γ -глобуліни	25,32 $\pm$ 1,1	15,62 $\pm$ 0,78***	29,5 $\pm$ 1,7	24,1 $\pm$ 1,2	31,33 $\pm$ 2,6**
	А/Г коефіцієнт		0,92	0,63	0,33	0,28	0,2
III покоління	Альбуміни, %		60,35 $\pm$ 3,4	41,42 $\pm$ 0,8***	26,36 $\pm$ 1,3***	18,6 $\pm$ 0,39***	17,69 $\pm$ 0,48**
	Глобуліни, %	α_1 -глобуліни	10,32 $\pm$ 1,7	5,8 $\pm$ 0,8	9,73 $\pm$ 0,61	13,47 $\pm$ 0,47	13,17 $\pm$ 0,62
		α_1 -глобуліни	6,08 $\pm$ 0,6	15,28 $\pm$ 1,1***	11,79 $\pm$ 1,3***	9,4 $\pm$ 0,7***	11,07 $\pm$ 0,8***
		β -глобуліни	8 $\pm$ 1	17,0 $\pm$ 1,6***	20,59 $\pm$ 1,5*	29,33 $\pm$ 1,74**	27,35 $\pm$ 1,1***
		γ -глобуліни	18,1 $\pm$ 2	20,48 $\pm$ 1,2	31,5 $\pm$ 2,4***	30,1 $\pm$ 1,2***	27,58 $\pm$ 1,37***
	А/Г коефіцієнт		1,5	0,7	0,36	0,23	0,2

Примітка. Тут і надалі: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.

Для виявлення впливу трансгенної сої та гербіциду на печінку щурів у сироватці крові визначали ензимну активність амінотрансфераз, які є внутрішньоклітинними ензимами та беруть участь в обміні амінокислот.

Результати проведених досліджень показали, що внаслідок додавання до дієти щурів як традиційної, так і генетично модифікованої сої у сироватці крові щурів F_0 покоління спостерігається підвищення ензимної активності АсАт у II групі – у 1,28 разу; у III групі – у 1,16 разу, IV групі – у 1,38 разу та у V групі – у 1,33 разу порівняно із показниками, характерними для контрольної групи щурів (рис.3.2.1). Водночас, у сироватці крові щурів покоління F_1 аспартатамінотрансферазна активність підвищується більш суттєво у II групі – у 1,37 разу; у III групі – у 1,29 разу, у IV групі – у 1,6 разу та у V групі – у 1,5 разу. У F_2 поколінні щурів ензимна активність АсАт у II групі – у 1,1 разу; у III групі – у 2,2 разу, у V групі – у 1,77 разу (рис.3.2.1).

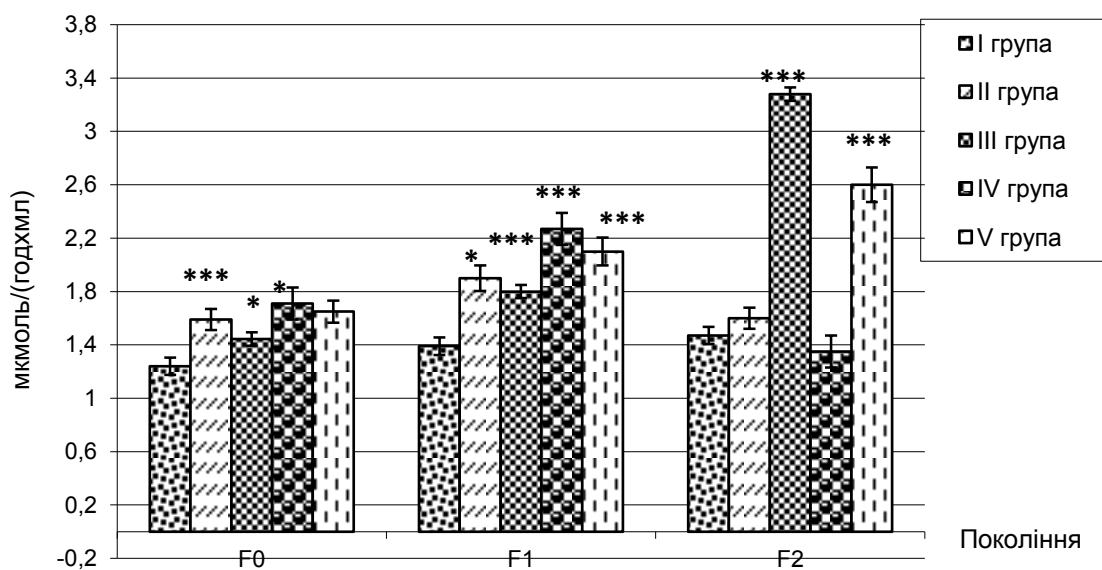


Рис.3.2.1 Аспартатамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів за дії гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої та гербіциду Roundup ($M \pm m$, $n=12$)

Оскільки одним із способів знищення бур'янів є їх обробка гербіцидом Roundup, то щоб перевірити чи може гербіцид накопичуватися у насінні сої

та негативно впливати на функціонування печінки досліджено амінотрансферазну активність та вміст молекул середньої маси у крові. У результаті досліджень встановлено, що у щурів, які отримували генетично модифіковану сою оброблену Roundup спостерігається найвища гіперенземія АсАт в F_1 поколінні. Виявлена гіперферментемія пов'язана саме із дією гербіциду, оскільки його додавання до раціону щурів різко підвищує аспартатамінотрансферазну активність у сироватці їх крові F_1 покоління (рис. 3.2.1). У II групі F_1 поколінні АсАт активність збільшується у 1,37 разу, а у III групі – у 1,29 разу, а у IV та V групах збільшується у 1,5 та 1,6 разу порівняно з контрольною групою. У IV та II групі F_2 покоління ензимна активність АсАт залишається без змін, а у III та V групах збільшується у 2,2 та 1,77 разу порівняно з контролем.

Стосовно ензимної активності АлАт у сироватці крові, то вона суттєво не відрізняється у груп тварин, до раціону яких додавали сою сорту Чернівецька 9 та необроблену генетично модифіковану сою в усіх поколіннях (рис. 3.2.2). Однак ензимна активність АлАт різко підвищується у тварин, які отримували генетично модифіковану сою оброблену цим гербіцидом, причому така тенденція виражена, як у F_1 , так і у F_2 поколіннях (рис. 3.2.1). Так, ензимна активність у IV та V групах підвищується найбільше у 2,5 та 2,3 разу у F_0 поколінні, у 2,1 та 1,95 разу – у F_1 поколінні, у 2,2 та 2,4 разу – у F_2 поколінні. Також у II та III групах спостерігається підвищення аланінамінотрансферазної активності у 1,4 разу в F_0 поколінні, у 1,3 та 1,2 разу в F_1 поколінні, у 1,2 та 1,85 разу в F_2 поколінні. У F_2 поколінні III групі також спостерігається значне підвищення ензимної активності АлАт у сироватці крові, що свідчить про пошкодження клітинних мембран печінки та вихід цього ензиму у кров.

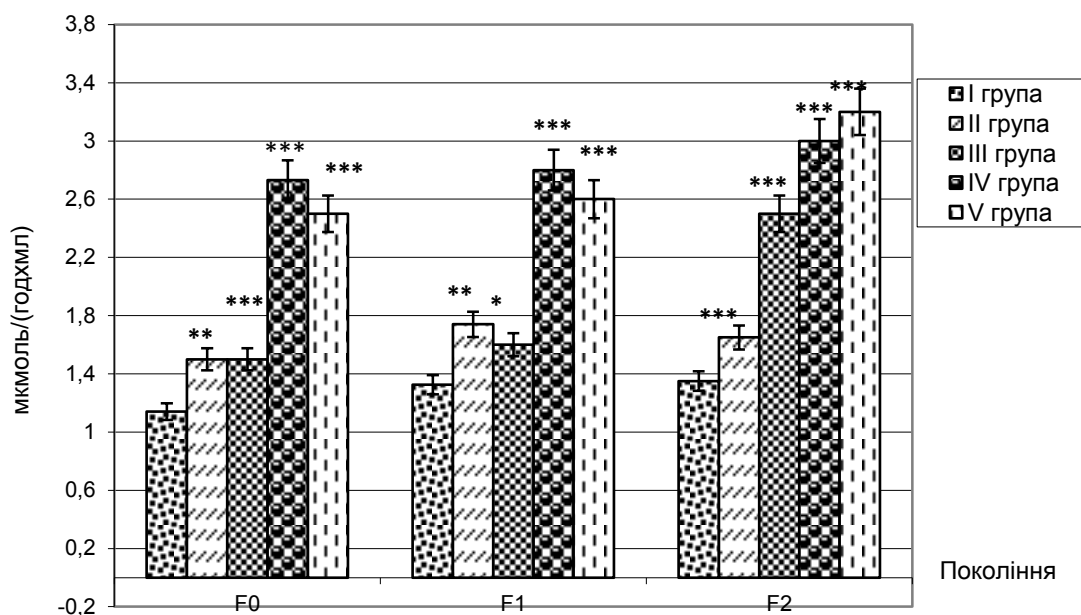


Рис.3.2.2. Аланінамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Ймовірно, що гербіцид Roundup, будучи ксенобіотиком, біотрансформується системою цитохрому Р450 печінки у потенційно токсичні метаболіти, які здатні викликати пошкодження клітинних мембран [14].

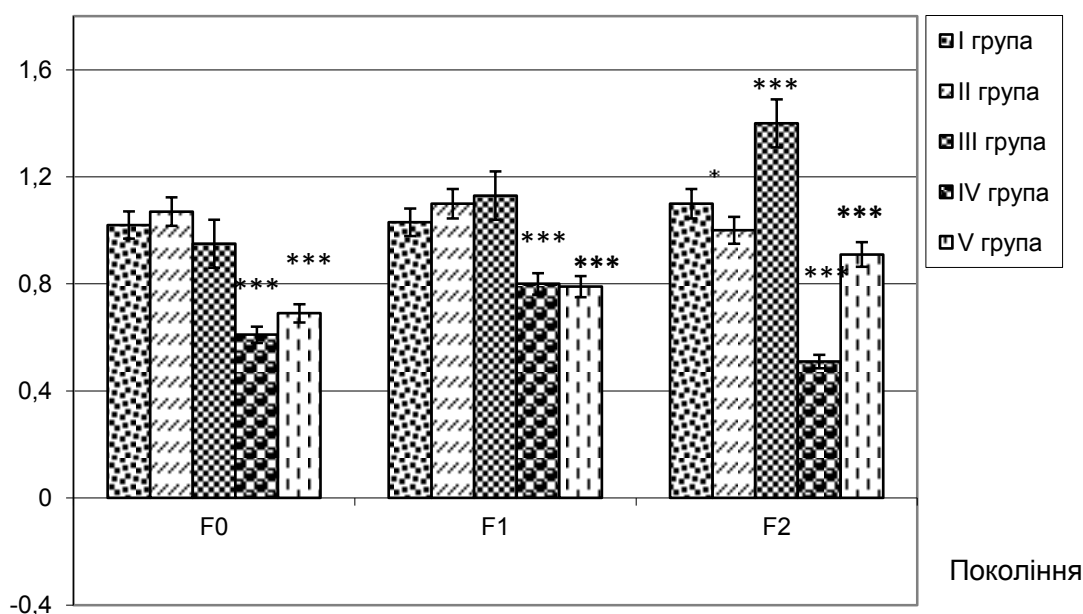


Рис.3.2.3. Співвідношення АСТ/АЛТ (коефіцієнт де Рітіса) у сироватці крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Один із механізмів такого пошкодження – ініціація ПОЛ мембран ендоплазматичного ретикулума, мітохондрій, плазматичної мембрани клітин

печінки [15]. Внаслідок пошкодження клітинних мембран або цитолізу гепатоцитів АсАт та АлАт потрапляють у кров, що проявляється збільшенням їх ензимної активності. Однак, підвищення ензимної активності АлАт, що перевищує підвищення АсАт, є більш характерним для пошкодження печінки. Якщо аспартатамінотрансферазна активність підвищується більше ніж аланінамінотрансферазна, то це, як правило, свідчить про порушення клітин міокарда [15].

Для того щоб перевірити, з якого саме органу супроводжується гіперенземія АсАт та АлАт ми розрахували співвідношення АсАт/АлАт, тобто визначили коефіцієнт де Рітіса [10]. Відомо що його значення менше 1 свідчить про пошкодження клітин печінки, а підвищення більше 1,3 свідчить у більшості випадків про порушення будови клітин серця і вихід амінотрансфераз у кров.

Аналіз результатів показав, що у щурів IV групи, які отримували сою оброблену Roundup, коефіцієнт де Рітіса залишався меншим 0,8 у F₁ поколінні, а у F₀ поколінні він дорівнював 0,61 (рис.3.2.3), що свідчить про вплив гербіциду на зміни функціонального стану печінки. У F₂ поколінні спостерігається ще більше зменшення значення коефіцієнту де Рітіса до 0,51 у IV групі, а у V групі до 0,91. У F₀ поколінні V групи це значення становило 0,61, а у другому 0,79.

Отже, застосування генетично модифікованої сої обробленої Roundup негативно впливає на функціонування печінки у F₀, F₂ та F₁ поколіннях, що виражається підвищенням амінотрансферазної активності у сироватці крові щурів. При чому гіперенземія більшою мірою спричинена дією гербіциду Roundup, а трансгенна соя лише підвищує його негативну дію [4].

Результати досліджень ще одного ензиму показали, що у батьківському поколінні (F₀) ензимна активність ГГТ в сироватці крові найбільше підвищується за умов дії гербіциду – у 2,2 разу та застосування дієти, збагаченої генномодифікованою соєю обробленою цим гербіцидом – у 1,8 разу порівняно з контролем (рис.3.2.4). У F₁ поколінні таке підвищення

виражене ще більшою мірою: за дії гербіциду Roundup ензимна активність ГГТ підвищується у 2,5 разу, за умов застосування трансгенної сої обробленої гербіцидом – у 2,1 разу порівняно з контролем (рис.3.2.4). У F₂ поколінні також відмічено зростання ензимної активності ГГТ у IV та V групі приблизно у 1,6 та 1,7 рази порівняно з контрольною групою, а у II та III групі у 1,3 та 1,2 разу, відповідно. У нормі ензимна активність ГГТ у сироватці крові незначна, основною причиною підвищення γ -глутамілтрансферазної активності в сироватці крові є печінкова недостатність [19].

Збільшення ензимної активності ГГТ у сироватці крові за дії гербіциду може бути зумовлено загальним посиленням вільнорадикальних процесів в організмі внаслідок інтенсивної генерації АФК.

Оскільки первинними мішенями АФК є ліпіди плазматичних мембран, то окиснення останніх може призвести до порушення їхньої структури і функцій внаслідок чого ензим виходить у кров'яне русло [6].

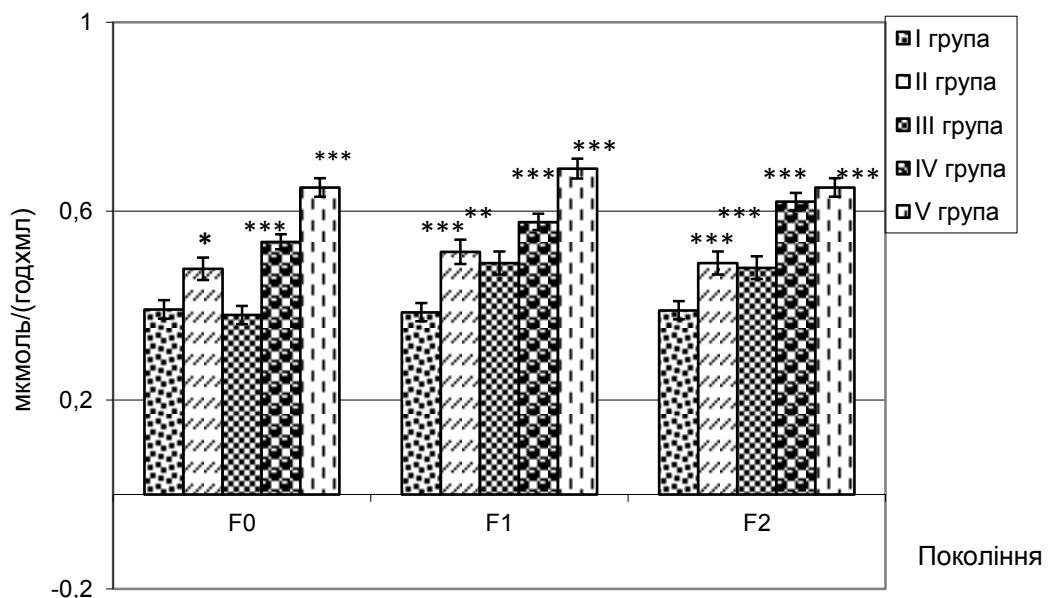


Рис.3.2.4. γ -Глутамілтрансферазна активність у сироватці крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

З іншого боку, застосування гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої може призвести до розвитку синдрому ендогенної інтоксикації, у результаті чого буде порушуватися не тільки структурно-

функціональний стан клітинних мембран і дискоординація метаболічних процесів, але й робота детоксикаційної системи печінки та екскреторної функції нирок [2, 14].

Синдром ендогенної інтоксикації супроводжується накопиченням у крові, фізіологічних рідинах і деяких тканинах МСМ – речовин молекулярною масою від 300 до 600 Да, які є продуктами порушеного обміну речовин у тканинах. Вважають [12], що до 80% МСМ – продукти порушеного протеїнового обміну в результаті активації протеаз в умовах аномального протеолізу. При пошкодженнях печінки рівень МСМ майже у всіх її фракціях має тенденцію до підвищення, що пов'язано, ймовірно, з деструкцією печінки і подальшим виходом пептидів у кров [12].

МСМ – вторинні ендогенні токсини пептидної природи, які можуть слугувати маркерами «метаболічної інтоксикації» організму при різних шкідливих впливах та при захворюваннях [12].

Встановлено, що застосування традиційної та генетично модифікованої сої необробленої гербіциду не призводить до змін вмісту молекул середньої маси у сироватці крові щурів у двох досліджуваних поколіннях порівняно з показниками, характерними для контрольної групи щурів (рис.3.2.5).

Аналіз результатів групи тварин, які отримували генетично модифіковану сою оброблену гербіцидом Roundup протягом дванадцяти місяців показав, що вміст ароматичних і аліфатичних середніх молекул в сироватці крові збільшувався в 1,7 і 1,6 разу відповідно в порівнянні з контрольною групою. У F_0 поколінні щурів уміст циклічних МСМ в IV і V групі підвищувався – в 1,26 та 1,3 разу. У F_1 поколінні щурів спостерігається ще більше підвищення вмісту МСМ: вміст МСМ, що містять у своїй структурі ароматичні кільця підвищується в 1,6 та 1,7 разу відповідно (рис.3.2.6).

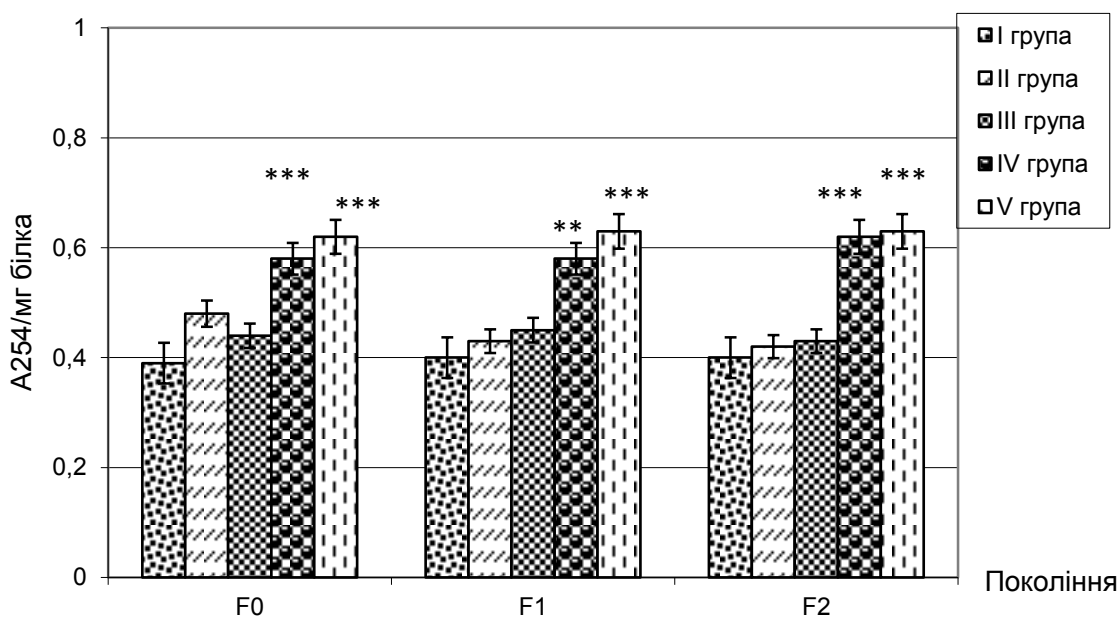


Рис.3.2.5. Вміст молекул середньої маси (аліфатичних) у сироватці крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

За споживання генетично модифікованої сої, обробленої гербіцидом, та вживання гербіциду разом з водою - в сироватці крові щурів F_2 покоління підвищується рівень ароматичних МСМ в 1,6 і 1,7 разу в порівнянні з контролем відповідно. Вміст МСМ у III та II групах залишається без суттєвих змін.

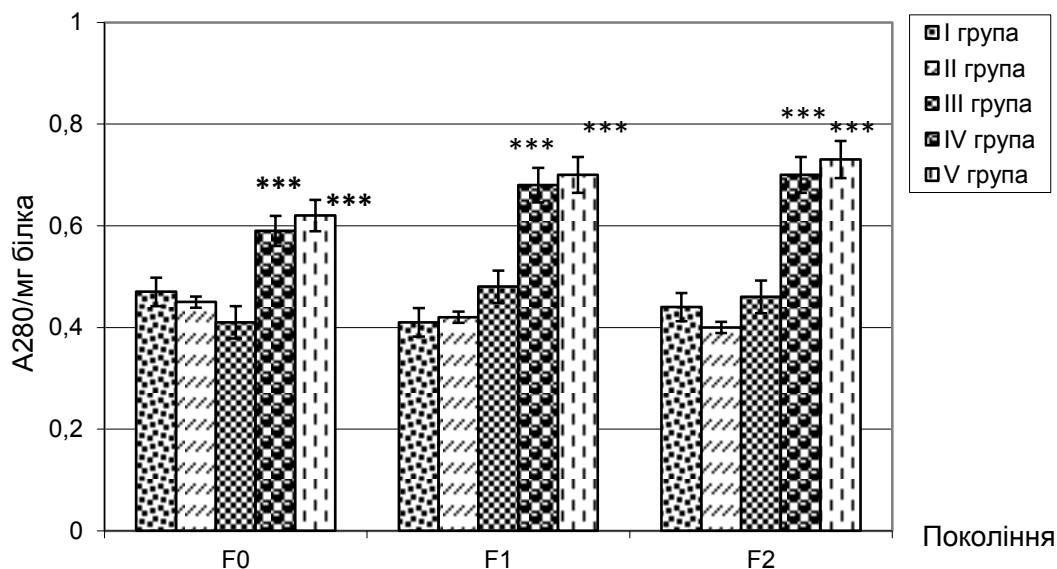


Рис.3.2.6. Вміст молекул середньої маси (ароматичних) у сироватці крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

У F_0 поколінні тенденція до підвищення вмісту аліфатичних МСМ у II групі у 1,2 разу збільшується. У F_1 та F_2 поколіннях в IV групі – у 1,5 разу (F_0 покоління); у 1,45 разу (F_1) та у 1,55 разу (F_2 покоління) та V групах вміст молекул середньої маси (аліфатичних) збільшується у 1,6 разу в усіх поколіннях.

Деякі автори вважають, що причиною підвищеного вмісту молекул середньої маси може бути скорочення тривалості життя окремих протеїнів як плазми крові, так і внутрішніх органів, в тому числі печінки і серця, і прискорення їх протеолізу [24]. Руйнування протеїнових молекул призводить до зростання вмісту азотовмісних сполук, а також інших метаболітів (фенольної й індольної природи), які накопичуються в печінці у вигляді колоїдних протеїнових комплексів і з якими може бути пов'язаний обмін серотоніну і дофаміну. Ще одним субстратом для утворення МСМ може бути гемоглобін, який надходить у плазму після руйнування еритроцитів.

Підвищення вмісту МСМ в сироватці крові виявляє патогенетичний вплив за рахунок пригнічення еритропоезу, розвитку вторинної імунодепресії, порушення мембран клітин. МСМ можуть відкладатися в стінках мікросудин альтеративним шляхом, сприяючи, тим самим, порушенню мікрогемодинаміки [136,138].

МСМ можуть відкладатися в стінках мікросудин альтеративним шляхом, сприяючи, тим самим, порушенню мікрогемодинаміки [136]. Під час визначення протеїну в гомогенаті нирок не спостерігалось суттєвої різниці між показниками у дослідних групах (рис.3.2.7).

Наші дослідження біохімічних показників у печінці та нирках в дослідних групах щурів трьох поколінь встановили порушення в роботі нирок та печінки. У щурів F_1 покоління всіх дослідних груп спостерігається тенденція до незначного збільшення амінотрансферазної активності та вмісту молекул середньої маси (рис.3.2.8 та рис.3.2.9).

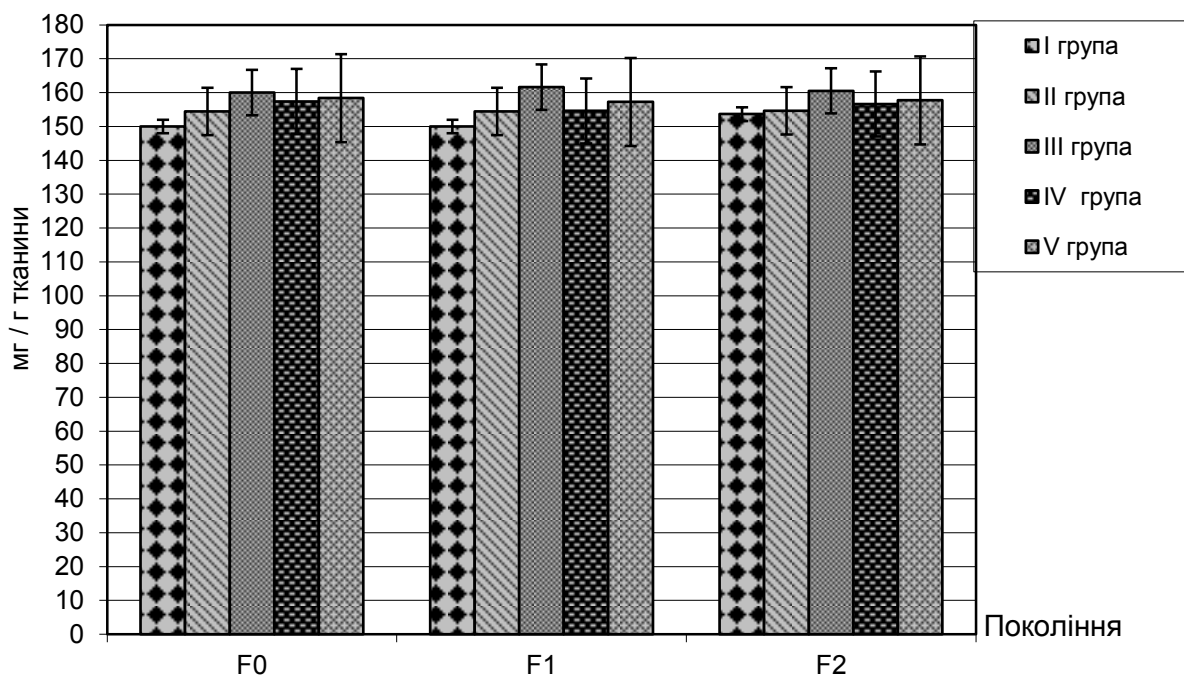


Рис.3.2.7. Вміст загального протеїну в гомогенаті нирків щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Дослідження активності амінотрансфераз (АлАт та АсАт) показали такі результати, так у II та III групах спостерігається незначне збільшення амінотрансферазної активності, лише у III групі АлАт збільшується у 1,5 рази порівняно з контролем у F_0 поколінні.

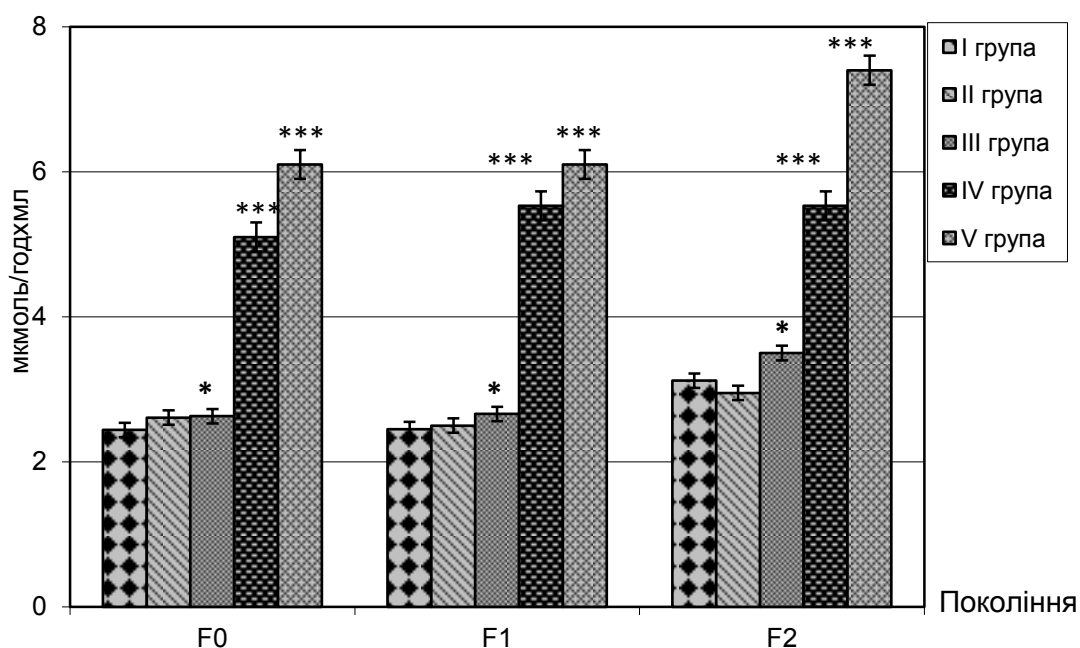


Рис.3.2.8. Аспартатамінотрансферазна активність у гомогенаті нирків щурів ($M \pm m$, $n=12$)

У IV та V групах спостерігається суттєве збільшення АЛат і АсАт. Так, у IV групі ензимна активність АЛат і АсАт збільшується у 3 та 2 рази, а у V групі у 3 та 2,5 разу порівняно з контрольною групою, відповідно.

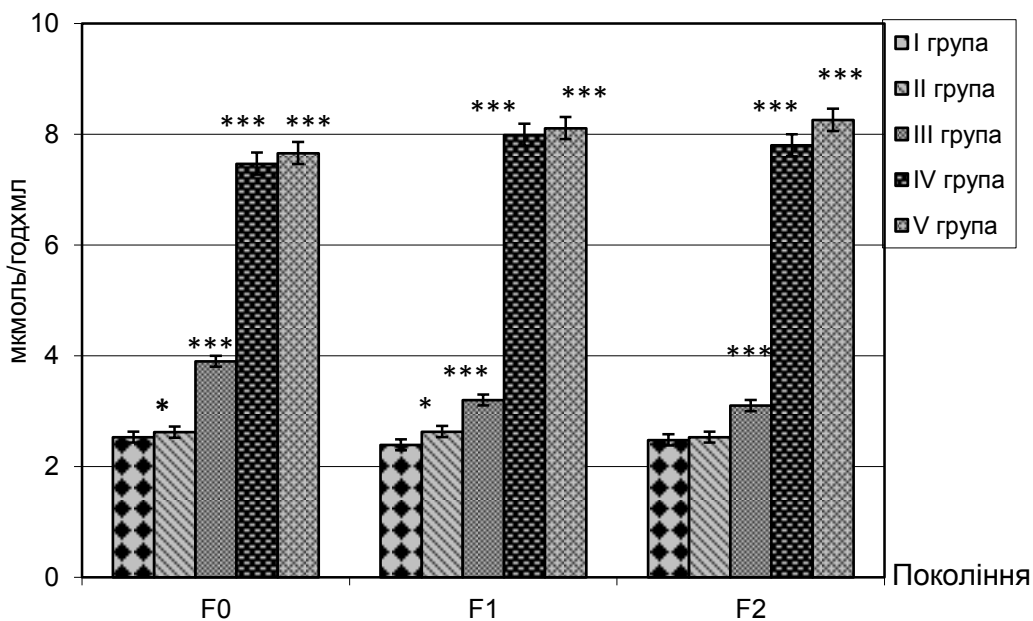


Рис.3.2.9. Аланінамінотрансферазна активність у гомогенаті нирок щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Окрім ензимної активності амінотрансфераз, також визначався вміст молекул середньої маси у гомогенаті нирок та печінки (рис. 3.2.10; рис.).

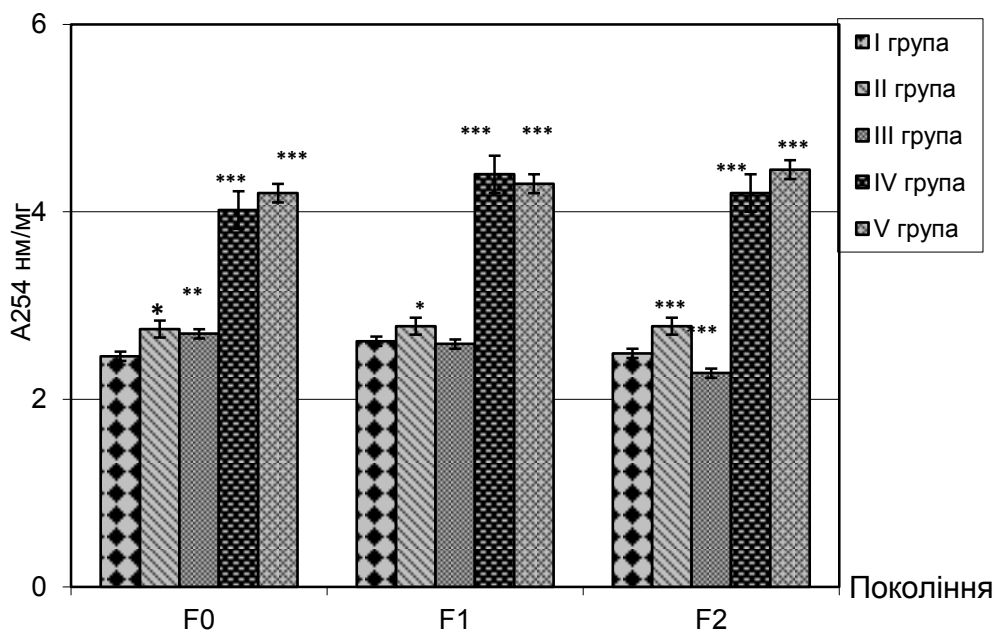


Рис.3.2.10. Вміст молекул середньої маси (аліфатичних) у гомогенаті нирків щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Застосування обробленої гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої може призвести до розвитку синдрому ендогенної інтоксикації, у результаті чого буде порушуватися не тільки структурно-функціональний стан клітинних мембран і дискоординація метаболічних процесів, але й робота детоксикаційної системи печінки та екскреторної функції нирок.

Збільшення вмісту молекул середньої маси у гомогенаті нирків може свідчити про ендогену інтоксикацію організму, що чітко виражено- у IV та V групі. Виявлено у IV групі вміст CM_1 та CM_2 збільшується приблизно у 1,7 разу, а у V групі – у 1,7 та 1,6 разу у трьох поколіннях щурів щодо контрольної групи.

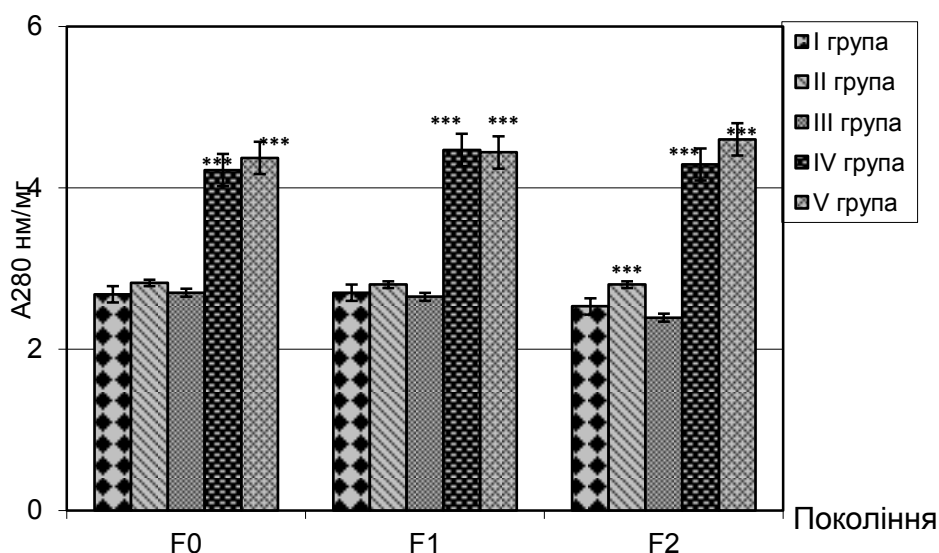


Рис.3.2.11. Вміст молекул середньої маси (ароматичних) у гомогенаті нирків ($M \pm m$, $n=12$)

Згодовування щурам генетично модифікованої сої обробленої гербіцидом та гербіциду разом з питною водою (0,1 мкг/л) також призводить до деструкційних змін у печінці (підвищенням амінотрансферазної активності). При цьому згодовування щурам генетично модифікованої сої призводить до підвищення аланінамінотрансферазної активності, тоді як аспаратамінотрансферазна не підвищується.

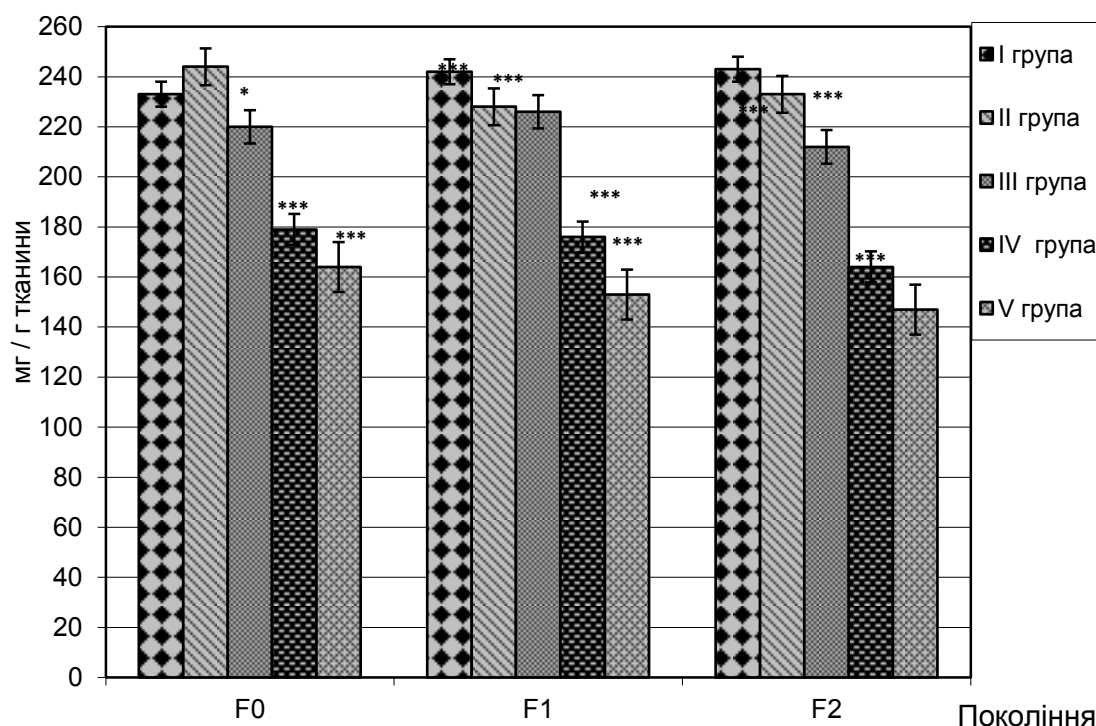


Рис.3.2.12. Вміст загального протеїну гомогенаті печінки щурів ($M \pm m$, $n=12$)

У гомогенаті печінки щурів F_0 покоління спостерігається зменшення загального протеїну в IV та V групі у 1,3 та 1,4 рази, при цьому в II та III групах практично не змінюється. Підвищується також ензимна активність АлАт і АсАт у IV групі – в 2,4 та 1,8 разу, а у V дослідній групі – в 2,7 та 2,2 разу (рис. 3.2.13; рис. 3.2.14). Вміст молекул середньої маси також збільшується у IV групі (CM_1 та CM_2) – у 2,3 разу, а у V групі збільшується приблизно у двічі у цьому ж поколінні. У F_1 поколінні рівень загального протеїну зменшується у IV та V групі – у 1,4 та 1,6 разу, при цьому ензимна активність АлАт і АсАт підвищується у IV групі – в 3 та 1,8 разу, а у V дослідній групі – в 2,7 та 2,4 разу. Вміст CM_1 та CM_2 підвищується у IV експериментальній групі – у 1,5 та 2,1 разу, а у V групі підвищується удвічі порівняно з контрольною групою (рис. 3.2.15; рис. 3.2.16.)

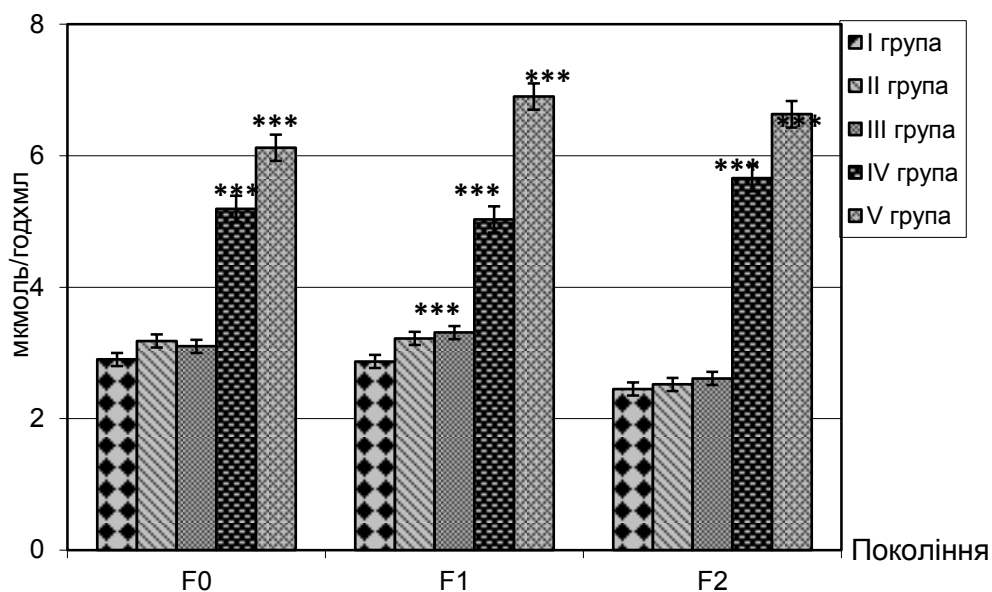


Рис.3.2.13. Аспартатамінотрансферазна активність у гомогенаті печінки щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Найбільше підвищення амінотрансферазної активності спостерігається у F_2 поколінні у IV групі, коли ензимна активність АлАт і АсАт збільшується у 2,3 разу та у V групі у 2,7 та 2,6 разу, відповідно. Поряд з цим спостерігається зниження рівня загального протеїну в гомогенаті печінки у IV та V групі – в 1,5 та 1,7 разу порівняно з контролем.

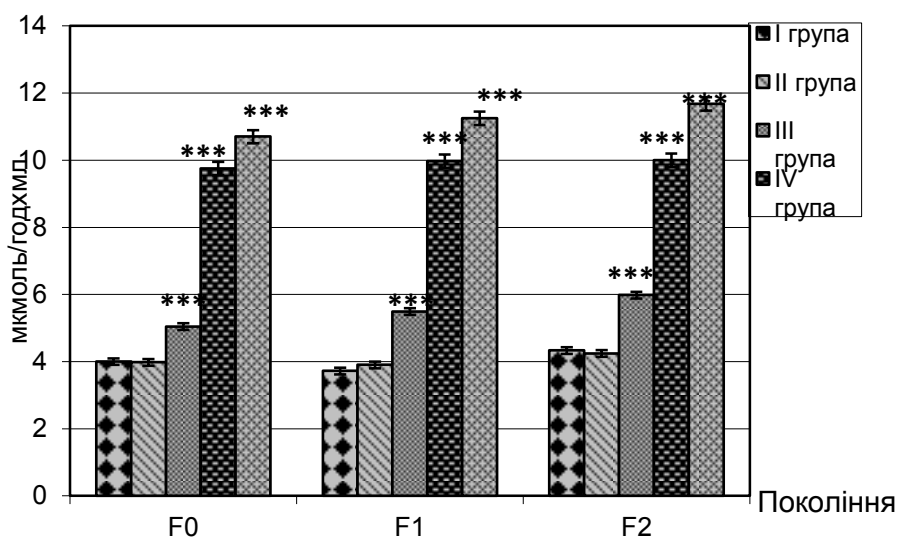


Рис.3.2.14. Аланіламінотрансферазна активність у гомогенаті печінки ($M \pm m$, $n=12$)

Вміст молекул середньої маси у F_2 поколінні (аліфатичних та ароматичних) також збільшується у IV групі у 2,6 та 2,5 разу, а у V групі у

2,4 та 2,3 разу. У III групі щурів, що споживали генетично модифіковану сою необроблену гербіцидом спостерігається підвищення лише ензимної активності АлАт в гомогенаті печінки усіх поколінь: в F_0 та F_1 поколіннях у 1,3 та 1,5, а у F_2 – у 1,4 разу порівняно з контрольною групою. Вміст МСМ збільшується не суттєво лише у F_2 поколіннях у 1,2 разу.

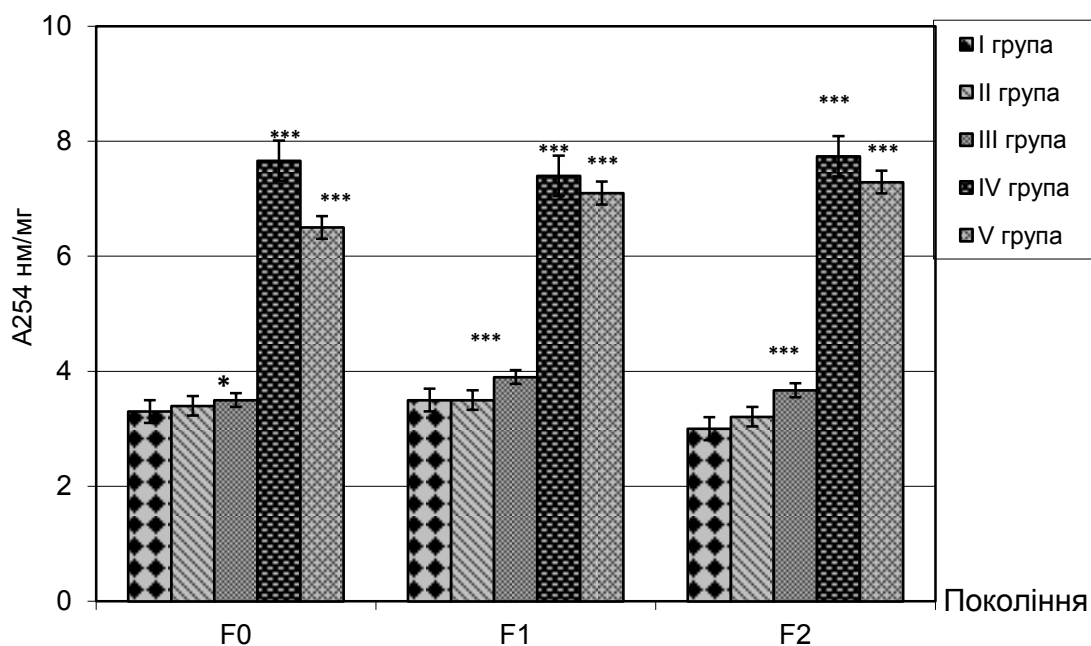


Рис.3.2.15. Вміст молекул середньої маси (аліфатичних) у гомогенаті печінки щурів під вживання традиційної, трансгенної сої не обробленої гербіцидом, трансгенної сої обробленої гербіцидом та гербіциду «Roundup» ($M \pm m$, $n=12$)

Вміст молекул середньої маси у F_2 поколінні (аліфатичних та ароматичних) також збільшується у IV групі у 2,6 та 2,5 разу, а у V групі у 2,4 та 2,3 разу.

У III групі щурів, що споживали генетично модифіковану сою необроблену гербіцидом спостерігається підвищення лише ензимної активності АлАт в гомогенаті печінки усіх поколінь: в F_0 та F_1 поколіннях у 1,3 та 1,5, а у F_2 – у 1,4 разу порівняно з контрольною групою. Вміст МСМ збільшується не суттєво лише у F_2 поколіннях у 1,2 разу.

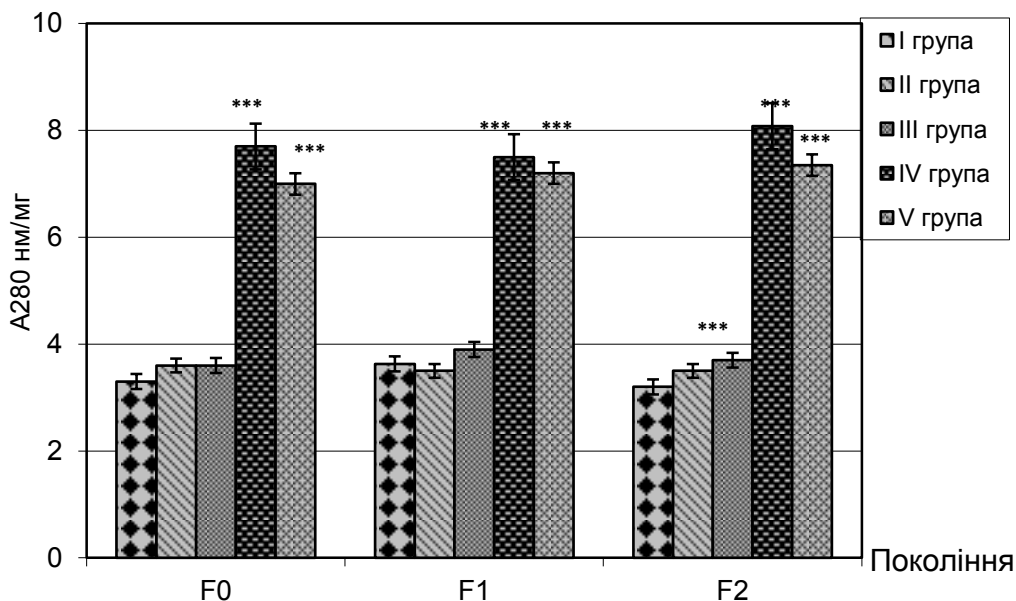


Рис.3.2.16. Вміст молекул середньої маси (ароматичних) у гомогенаті печінки щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Аналізуючи ензимну активність амінотрансфераз у печінці та нирках щурів, а також вміст молекул середньої маси у цих органах можна стверджувати, що визначальним на зміни біохімічних показників у органах щурів є вплив гербіциду, який вживали тварини разом з питною водою та гербіциду, що залишився у насінні сої після термічної обробки, про що свідчать результати лабораторних досліджень і показник залишку гліфосату перевищує у 2,6 разу норму по НД на продукт. Тобто досліджуваний зразок не відповідає вимогам ДСанПіН 8.8.1.2.3.4-000-2001 “Допустимі дози, концентрації, кількості та рівні вмісту пестицидів у сільськогосподарській сировині, харчових продуктах, повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді водоймищ, ґрунті”.

Таким чином, виявлена гіперенземія амінотрансфераз та γ -глутамілтрансферази більшою мірою виражена у щурів F_0 , F_1 , F_2 поколінь, які споживали генетично модифіковану сою, оброблену гербіцидом або які вживали гербіцид Roundup разом з питною водою. Встановлені зміни сприяють порушенню функціонального стану печінки, прогресуванню синдрому ендогенної інтоксикації за рахунок підвищення вмісту МСМ у сироватці крові.

Порушення функціонального стану печінки може виражатися некрозом гепатоцитів, фрагментацією печінкових дольок та супроводжуватися виходом ензимів у кров'яне русло за умов пошкодження цього органу.

3.3. Азотистий обмін щурів, за вживання трансгенної сої та гербіциду Roundup

Використання пестицидів та гербіцидів у великій кількості призводить до погіршення екологічного балансу та забруднення навколишнього середовища. [4, 8]. Дана речовина вважається малотоксичною та належить до третього класу токсичних речовин, існують дані, що він впливає на роботу нервової та серцево-судинної системи, а також на роботу печінки і нирок [1–3, 5]. Окрім того, до кінця не з'ясовано чи здатний гербіцид накопичуватися у насінні сої, також як сам гербіцид впливає на обмін речовин в організмі, зокрема на азотистий обмін [6, 7, 9].

За вживання традиційної та трансгенної сої спостерігається незначне збільшення вмісту протеїну в крові щурів – в 1,2 та 1,1 в рази як в F_0 поколінні щурів, так і в F_1 та F_2 поколіннях щурів (рис.3.3.1).

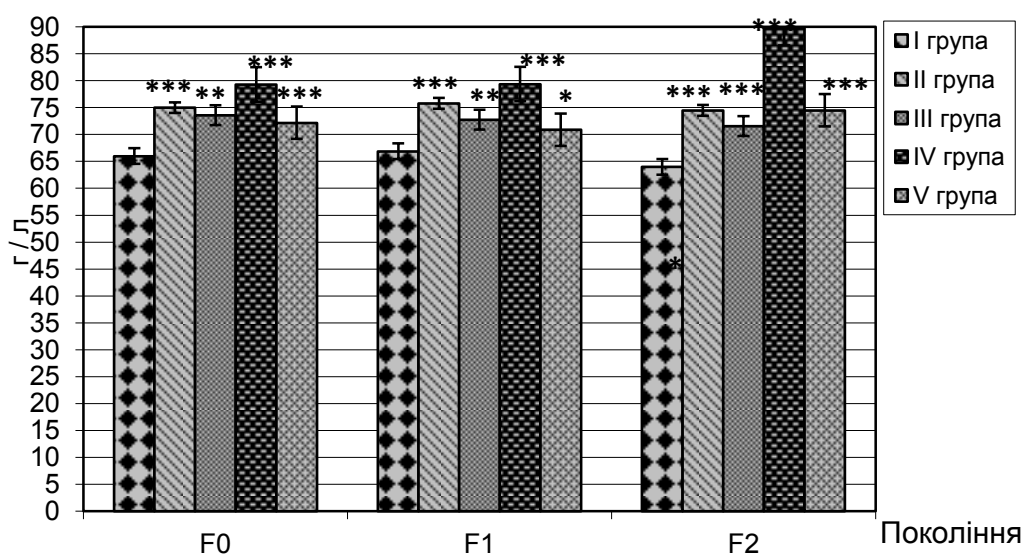


Рис.3.3.1. Концентрація протеїну у сироватці крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

У IV групі спостерігається підвищення вмісту протеїну в 1,2 рази як у (F_0 , F_1), хоча у IV групі F_2 покоління рівень загального протеїну збільшується у 1,4 рази (рис.3.3.1).

Результати досліджень креатиніну показали, що у крові щурів II групи його концентрація збільшився у 1,2 рази, а у III групі у 1,1 рази порівняно з

контролем ($p \geq 0,05$), у IV та V групах у 1,3 та 1,6 разу у F_0 поколінні (рис.3.3.2).

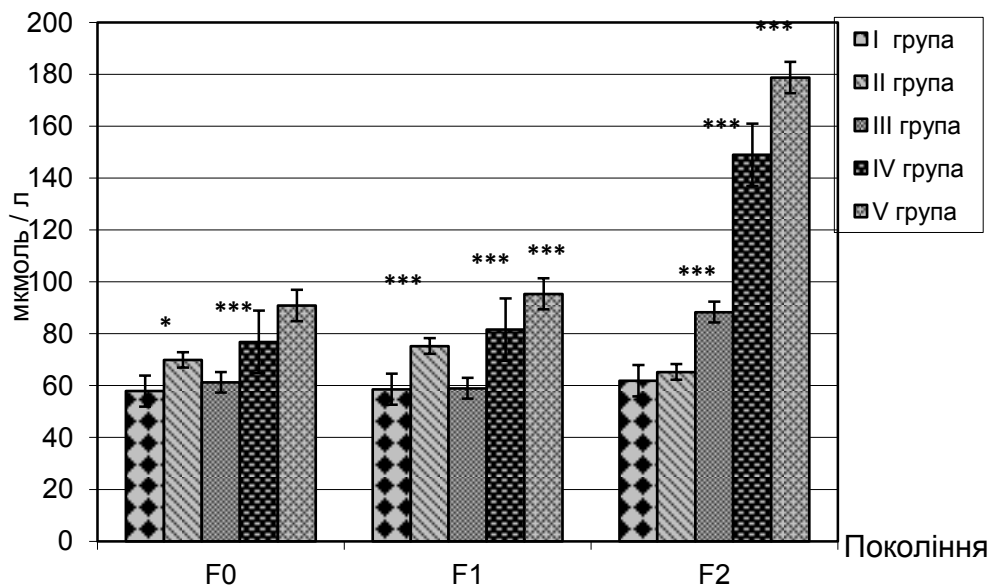


Рис.3.3.2. Концентрація креатиніну у сироватці крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

У F_1 поколінні також спостерігається збільшення концентрації креатиніну у сироватці крові щурів порівняно, щодо контрольної групи. Концентрація креатиніну в крові II групи підвищується у 1,3 разу порівняно з контролем, а у III групі щурів вона не змінюється, а у IV та V групах збільшується у 1,4 разу та 1,6 разу порівняно з контрольною групою. У другому поколінні концентрація креатиніну підвищилася у II та III дослідній групах у 1,1 та 1,4 разу, а у IV і V групах – у 2,4 та 2,8 разу відповідно.

Отримані результати показали, що у крові щурів II та III груп порівняно з контролем концентрація сечовини збільшився у 1,2 разу, а у IV групі у 1,6 разу в наступному поколінні (F_1) спостерігається така ж картина, а у F_2 поколінні концентрація підвищується у 1,4 разу. Все це свідчить про підвищення концентрації аміаку в печінці, а відповідно і підвищення інтенсивності синтезу сечовини. Особливо це спостерігається під час згодовування тваринам генетично модифікованої сої обробленої гербіцидом, а під час споживання самого гербіциду разом з питною водою спостерігається порушення синтезу сечовини в печінці, про що свідчить зменшення сечовини у V групі. Саме сечовина є кінцевим продуктом

метаболізму протеїнів в організмі, печінка є основним місце утворення сечовини, а виводиться вона через нирки. Тому зміна її концентрації сечовини у крові може свідчити про порушення роботи цих органів (рис.3.3.3).

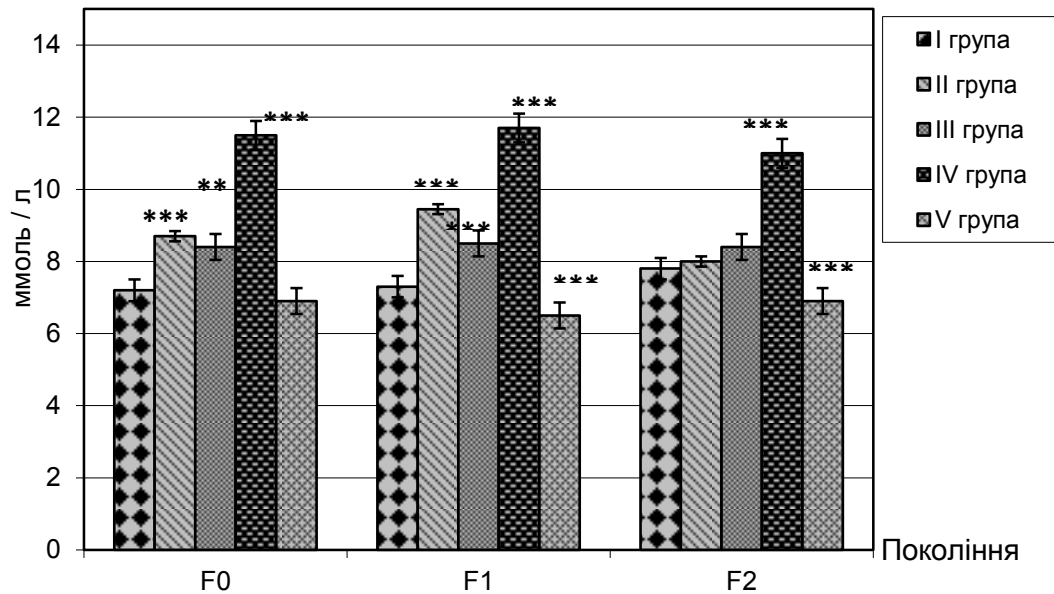


Рис.3.3.3. Концентрація сечовини у сироватці крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Показники концентрації сечової кислоти у крові щурів підвищуються в II та III групи: у 1,6 та у 2,2 разу порівняно з контролем, а в IV та V групах — у 2,5 і 2,8 разу відповідно у F_0 поколінні. У F_1 поколінні також спостерігається збільшення концентрації сечової кислоти в сироватці крові щурів. Концентрація сечової кислоти в крові II групи підвищується у 2,3 разу порівняно з контролем, а в III, IV та V групах щурів збільшується у 2,7, 2,8 та 3,5 разу порівняно з контрольною групою у F_1 поколінні. У F_2 поколінні концентрація сечової кислоти підвищується у II, III, IV та V групах — у 1,5 та 1,6 разу, а також у 2,9 та 3,2 разу. Сечова кислота являється продукт обміну пуринових нуклеотидів, що входять до складу нуклеїнових кислот. Вона може утворюватися як з продуктів, що надходять з їжею, так і в результаті розпаду власних нуклеїнових кислот організму. Сечова кислота з печінки транспортується плазмою крові в нирки, де фільтрується і виділяється з організму. Основними причинами накопичення сечової кислоти в організмі є:

надмірне руйнування нуклеїнових кислот, масова загибель клітин або її недостатнє виведення (нирками) з організму (рис.3.3.4).

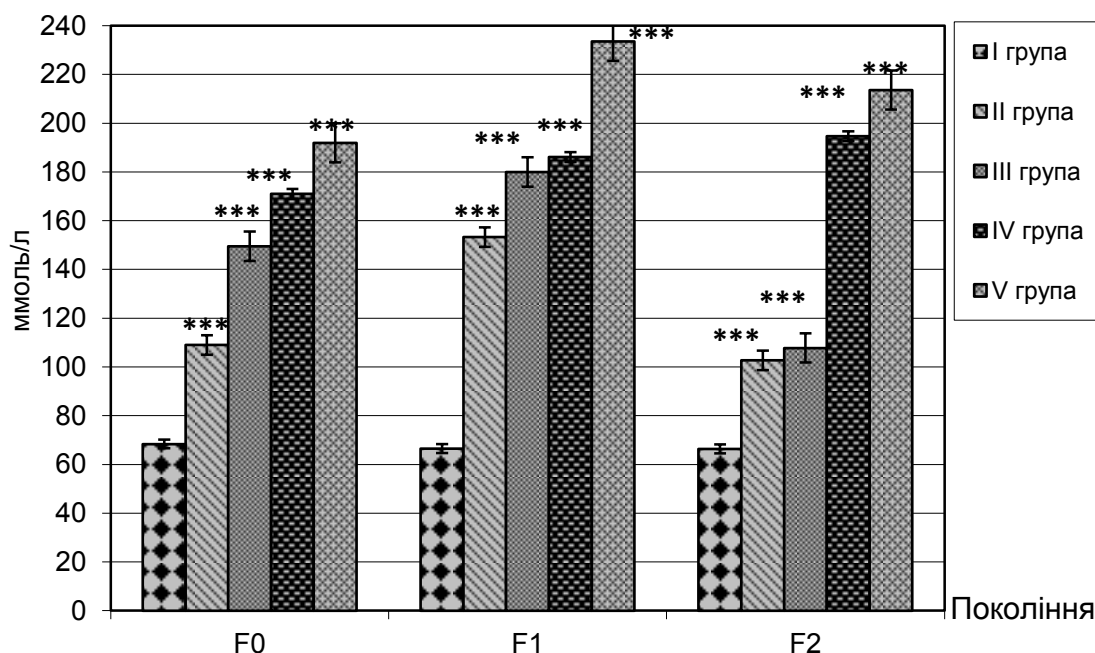


Рис.3.3.4. Концентрація сечової кислоти у сироватці крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Для того, щоб проаналізувати роботу нирок, було визначено концентрації азотистих сполук у сечі щурів. Результати експериментальних досліджень показали підвищення вмісту протеїну за вживання традиційної (II група) та трансгенної сої (III група) в 1,5 та 1,6 разу, а в IV групі збільшується у 1,8, а у V групі у 1,4 разу зменшується у F_0 поколінні (табл. 3.3.5.). У F_1 поколінні також спостерігається підвищення протеїну в сечі у II та III групах відповідно у 1,4 та у 1,6 разу, а у IV групі спостерігається також підвищення вмісту протеїну в 1,9 та у V групі зменшення у 1,2 разу. У F_2 поколінні у II та III групах рівень протеїну підвищується в 1,3 разу, у IV групі у два рази (рис.3.3.5).

Результати досліджень показали, що у сечі щурів II та III груп F_0 покоління концентрація креатиніну був вищим у 2,6 разу, а у IV та V групах – знизилася у 1,3 разу (таблиця 3.3.6).

У F_1 поколінні також спостерігаються зміни концентрації креатиніну в сечі щурів. Концентрація креатиніну в сечі II групи підвищується у 2 рази

порівняно з контролем, а в III групі щурів збільшується у 1,8 разу, у IV та V групах знижується у 1,7 разу порівняно з контрольною групою.

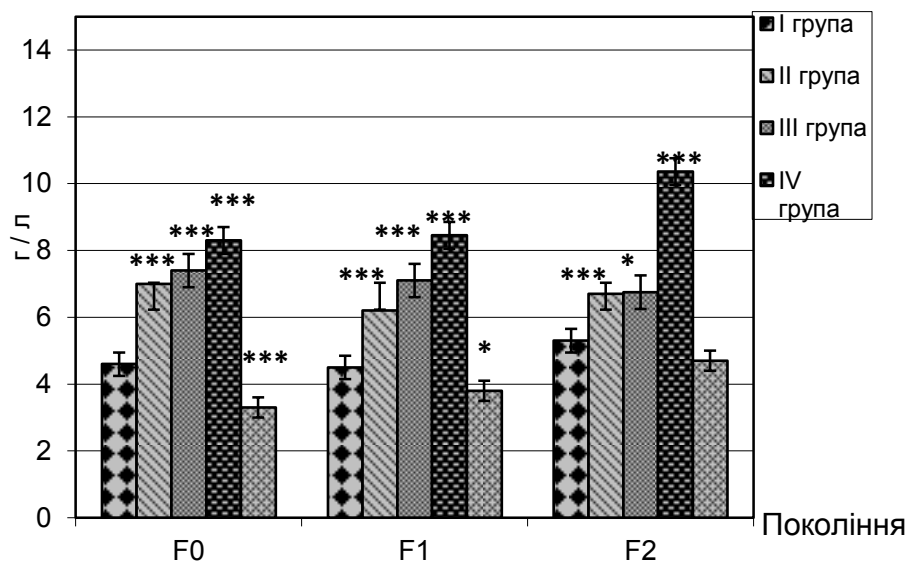


Рис.3.3.5. Концентрація загального протеїну у сечі щурів ($M \pm m$, $n=12$)

У F_2 поколінні також спостерігається підвищення креатиніну в 1,6 та 1,4 разу у сечі щурів II та III групи, та його зниження у 2,3 та 2 рази у сечі щурів, яким згодовували трансгенну сою, оброблену гербіцидом Roundup та щури, що вживали гербіцид разом із питною водою. Підвищення концентрації креатиніну в сечі може спостерігатися під час гормональних порушень, а зниження її у сечі може свідчити про порушення роботи нирок (таблиця 3.3.6).

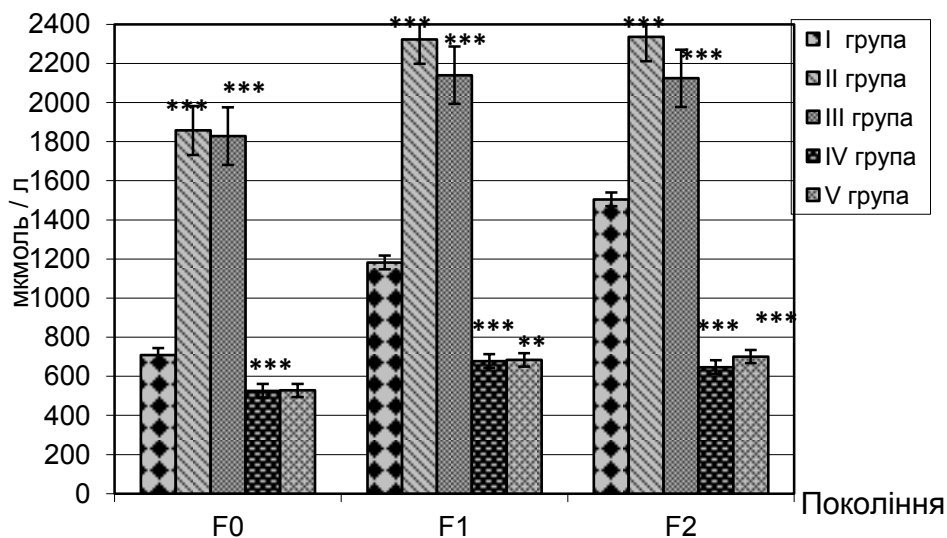


Рис.3.3.6. Концентрація креатиніну у сечі щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Концентрація сечовини у сечі щурів III групи була нижчою порівняно з контрольною групою у 1,2 разу, а в IV та V групах зменшилася у 1,3 разу у F_0 поколінні. В F_1 поколінні спостерігається збільшення концентрації сечовини в сечі щурів у II та III групах у 1,2 та 1,3 разу, а в IV та V групах – зменшення у 1,2 разу. Концентрація сечовини в сечі щурів F_2 покоління у II та III групах підвищується незначно у 1,3 та 1,2 разу порівняно з контролем, а IV та V групах знижується у 1,2 разу. Все це свідчить про інтенсивність синтезу аміаку в печінці, а відповідно, і підвищення синтезу сечовини, особливо яскраво це спостерігається за споживання тваринами обробленої генетично модифікованої сої при цьому також спостерігається порушення роботи нирок та печінки у IV та V групах про що свідчить зниження концентрації сечовини (таблиця 3.3.7).

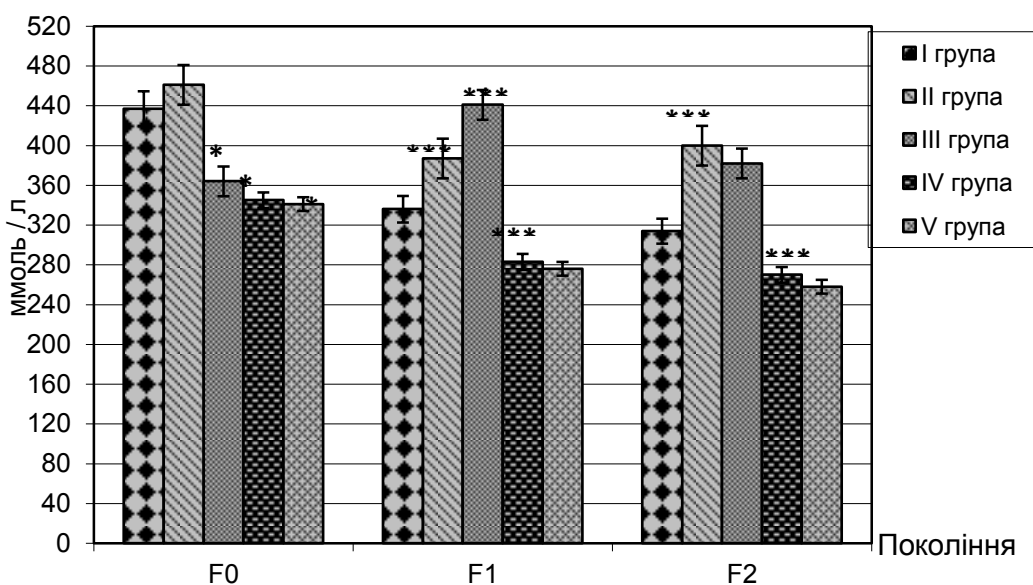


Рис.3.3.7. Концентрація сечовини у сечі щурів, яким згодовували традиційну, генетично модифіковану сою не оброблену гербіцидом Roundup та оброблену гербіцидом, і вживання самого гербіциду з питною водою ($M \pm m$, $n=12$)

Збільшення концентрації сечової кислоти у сечі свідчать про порушення протеїнового обміну, разом з тим у II та III групах вона збільшується у 1,2 та 1,4 разу, а у IV та V групах – у 2 та 2,2 разу. Концентрація сечової кислоти в сечі F_1 покоління II групи підвищується у 1,3

разу порівняно з контролем, а III групи щурів збільшується у 1,7 разу, також у IV та V групах концентрація підвищується відповідно у 2,6 та 3 разу. Подібний результат ми одержали і в F₂ поколінні: у II та III групах концентрація сечової кислоти в порівнянні з контролем збільшився у 1,6 та 1,8 разу, у IV та V групах – у 2,5 та 2,4 разу порівняно з контролем (табл.3.3.8).

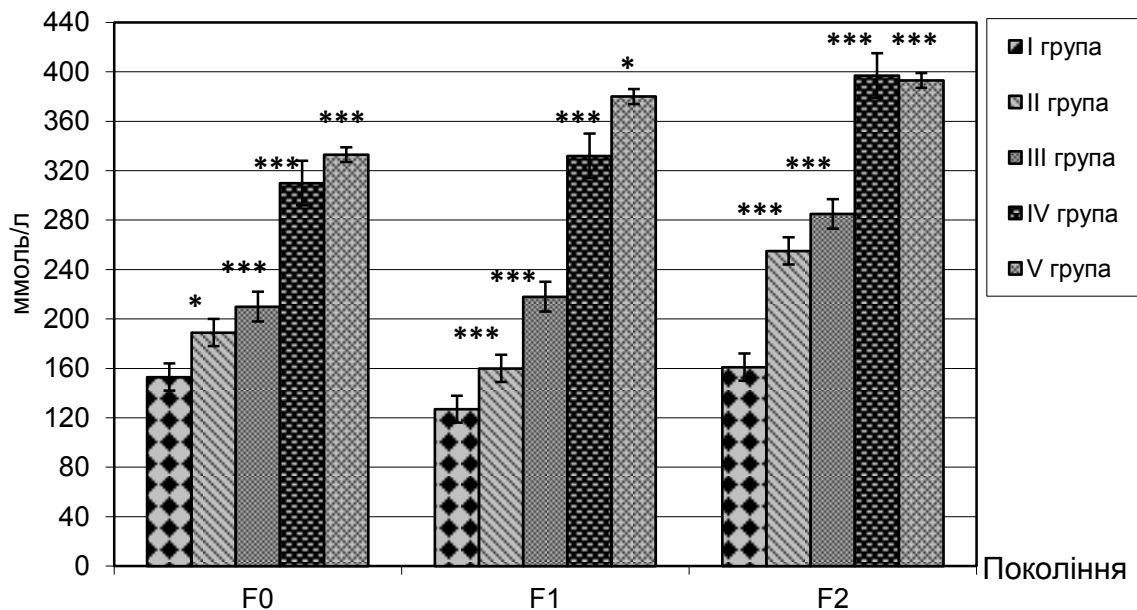


Рис.3.3.8. Концентрація сечової кислоти у сечі щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Таким чином, вживання генетично модифікованої сої, яку обробляли гербіцидом Roundup та гербіциду разом із питною водою призводить до збільшення концентрації сечової кислоти та збільшення вмісту протеїну в IV групі та незначного зниження у V групі, а також зменшення сечовини та креатиніну в цих дослідних групах у сечі щурів усіх поколінь. За вживання традиційної та трансгенної сої, необробленої гербіцидом, концентрація метаболітів азотистого обміну незначно підвищується. Такий висновок можна зробити за порівняння показників азотистого обміну (креатиніну, сечовини та сечової кислоти) усіх поколінь. Порівнюючи такі показники, як концентрацію сечовини, у II та III групах усіх поколінь щурів, нами встановлено збільшення її концентрації не більше ніж у 1,5 разу у сечі порівняно з інтактними тваринами. Окрім того, порівнюючи значення сечовини між II, III групами та IV, V групами, встановлено, що вони

знижуються і таке явище спостерігається в усіх поколіннях. Підвищена екскреція сечовини у сечі спостерігається за споживання їжі, збагаченої протеїнами, а також може бути пов'язана з порушенням обміну соєвих протеїнів. Концентрація креатиніну в сечі збільшується майже вдвічі порівняно з контролем у II та III групах, водночас у цих групах між собою не виявлено значної різниці. У дослідних групах, які споживали оброблену трансгенну сою та гербіцид, концентрація креатиніну зменшується у 1,3 рази у F₀ поколінні, а в наступних у 1,7 та 2,3 разу порівняно з контролем. Збільшення концентрації креатиніну пов'язано зі зменшенням діурезу. Дана дисфункція найбільше спостерігається у щурів II та III групи F₂ покоління, де найбільше виражена відмінність, а у щурів IV та V групи зменшення концентрації креатиніну в усіх поколіннях може бути пов'язано з порушенням роботи нирок та печінки. Креатинін синтезується переважно в м'язах – вивільняється з міоцитів і транспортується в нирки, звідки виводиться разом із сечовиною у складі сечі. Якщо здатність нирок виводити сечовину і креатинін порушується, вони починають накопичуватися у крові та їх концентрація у сечі знижується.

Основними причинами підвищення концентрації сечової кислоти в сечі є надходження з продуктами, які містять багато пуринів (м'ясо, бобові). Підвищення її в сечі, в першу чергу, виявляється у разі порушення фільтрації в нирках, зміна в роботі печінки, що найбільше спостерігається у IV та V групах. Проаналізувавши зміни показників у сечі усіх поколінь можна зробити висновок, що визначальним чинником у змінні показників азотистого обміну є дія гербіциду Roundup, що також міститься у насінні трансгенної сої за її обробки. Підвищення показників азотистого обміну, зокрема сечової кислоти, та зниження креатиніну і сечовини може свідчити про ниркову недостатність, адже рівень азотистих метаболітів значно підвищується у крові, що свідчить про порушення роботи печінки внаслідок дії токсичних речовин.

3.4. Гістологічна оцінка печінки та нирок щурів за споживання трансгенної сої і гербіциду

Результати гістологічних досліджень нирок та печінки щурів у F_0 , F_1 та F_2 поколінь за вживання обробленої гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої показали морфологічні зміни у цих дослідних групах.

Дослідження морфологічних змін печінки проводилися на F_0 , F_1 та F_2 поколіннях щурів лінії Вістар, F_1 та F_2 покоління були отримані після спаровування щурів покоління F_0 та F_1 . При дослідженні мікроструктури печінки щурів F_0 , F_1 та F_2 поколінь усіх експериментальних груп відзначали часточкову будову органу, де гепатоцити були переважно з базофільною цитоплазмою (рис. 3.4.1).

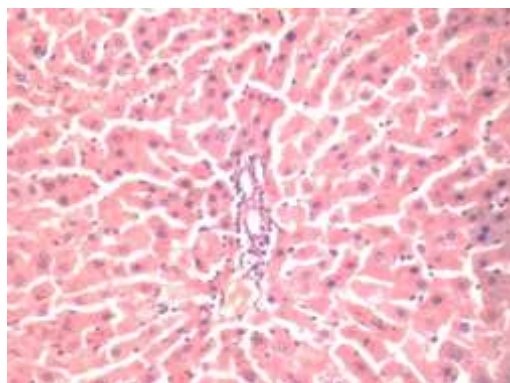


Рис. 3.4.1. Мікрофотографія фрагменту печінки інтактного щура

Примітка: Забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.20х. Ок.10х

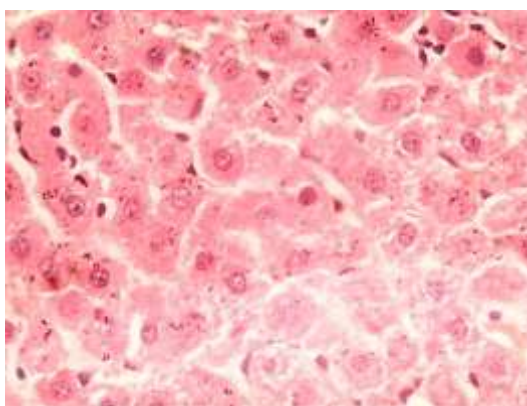


Рис. 3.4.2. Мікрофотографія фрагменту печінки інтактного щура

Примітка: Забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.40х. Ок.15х

Гістологічні дослідження печінки щурів контрольної групи та щурів, які вживали традиційну сою (II група), не виявлено патологічних змін, як у батьківському (F_0) так і у першому (F_1) та другому поколінні (F_2). Печінка використаних у експерименті щурів обох груп (I- контрольна та II- група, які вживали традиційну сою) (рис. 3.4.3. та рис. 3.4.4) має типову для цього виду тварин будову (рис. 3.4.2).

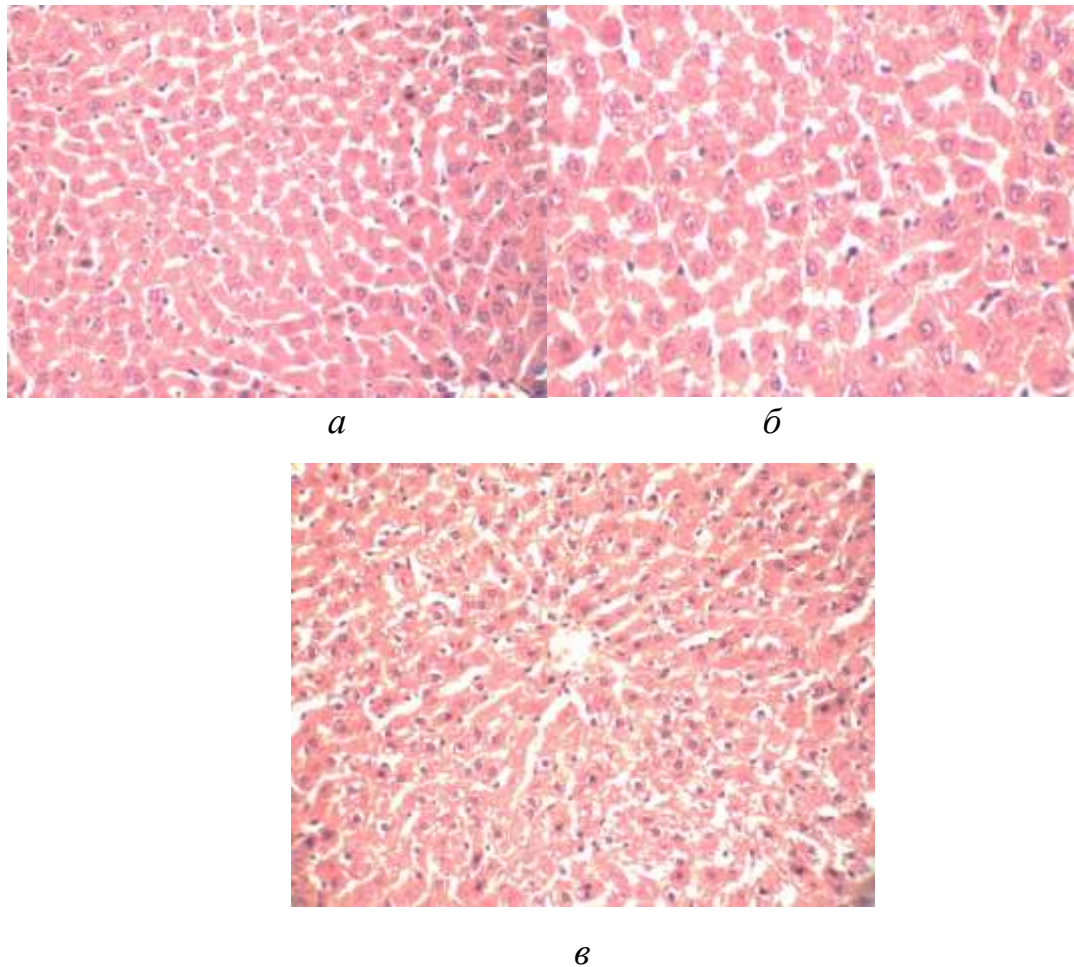


Рис 3.4.3. Мікрофотографія фрагменту печінки щурів за вживання традиційної сої покоління F_0 (а), F_1 (б) та покоління F_2 (в) (Об.20х. Ок.10х)

Гепатоцити мають округлу полігональну форму, з чітко окресленими ядрами округлої форми, з ядерцями, однорідною цитоплазмою. Центральні вени і судини триад мають нормальний просвіт.

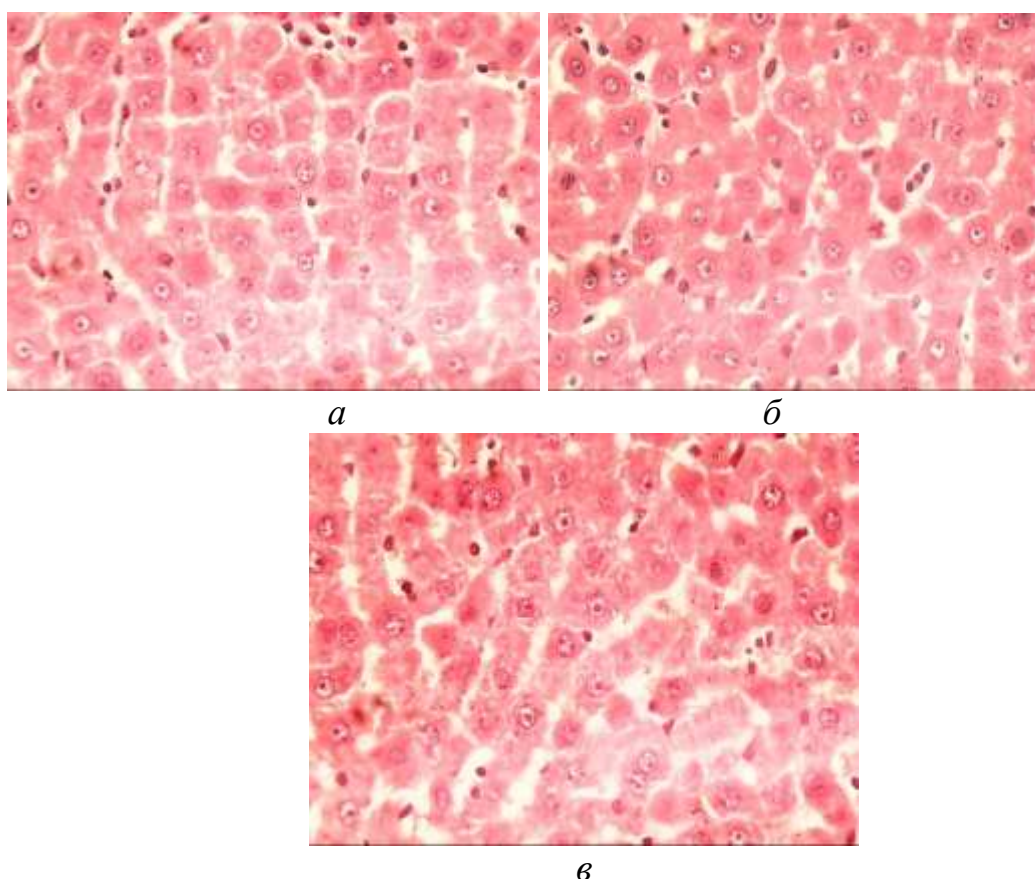
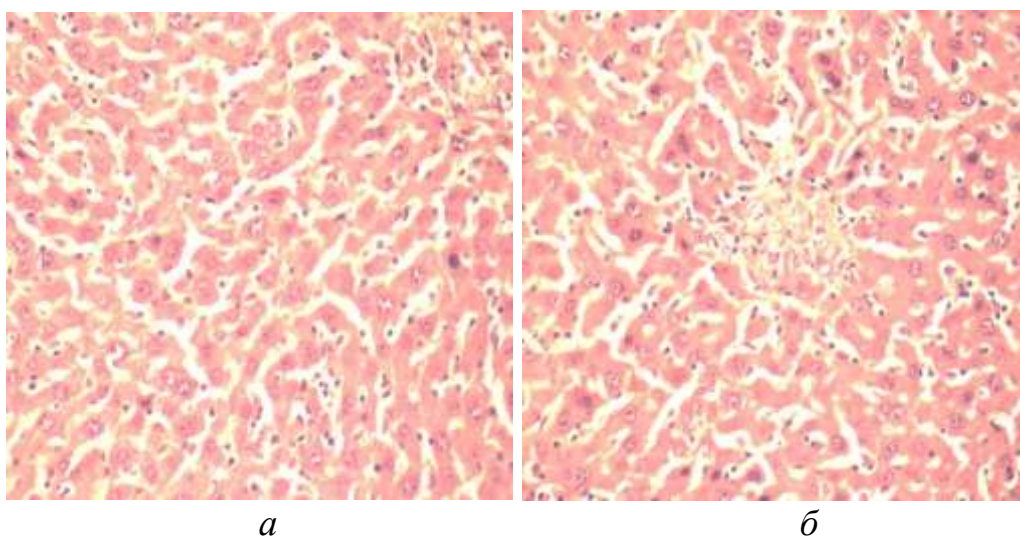
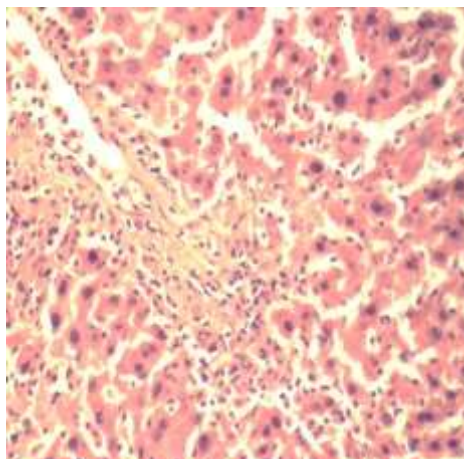


Рис 3.4.4. Мікрофотографія фрагменту печінки щурів за вживання традиційної сої покоління F_0 (а), F_1 (б) та покоління F_2 (в) (Об.40х. Ок.15х)

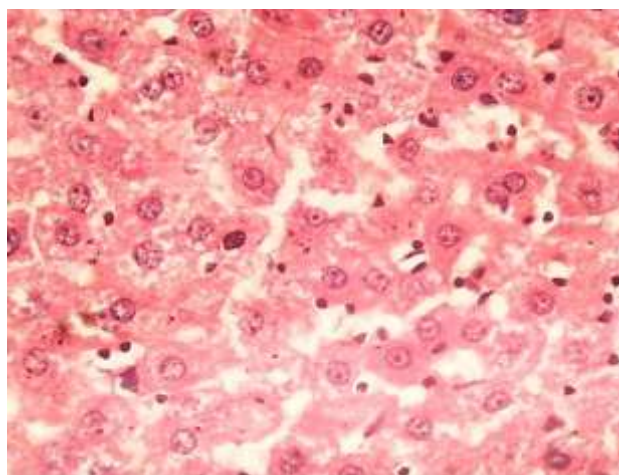
У щурів III-ї групи помітні слабо виражені зміни в гепатоцитах, зокрема, у цитоплазмі поодинокі виявляли невеличкі ліпідні краплі, така ж картина спостерігається і у F_0 поколінні. Цитоплазма у деяких гепатоцитів нерівномірно зміщена від ядра до периферії клітин. Така ж картина спостерігається і у F_1 та F_2 поколінні (рис.3.4.5 та рис.3.4.6).



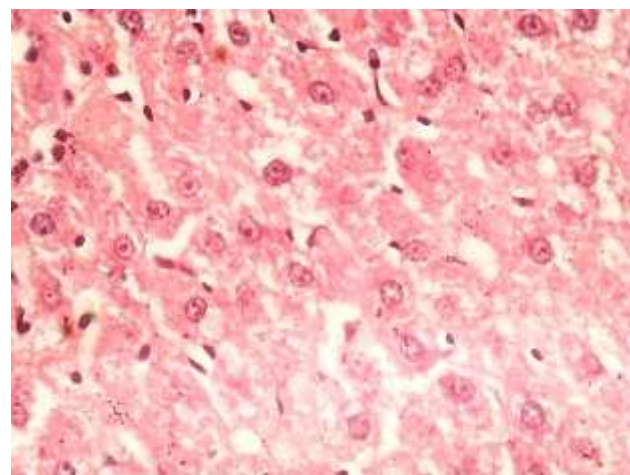


в

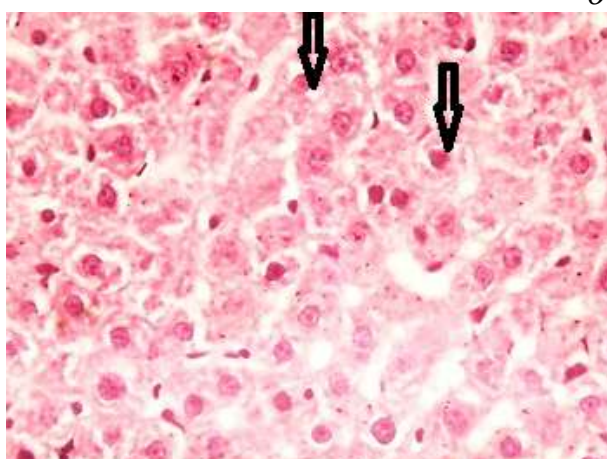
Рис 3.4.5. Мікрофотографія фрагменту печінки щурів за вживання трансгенної сої необробленої гербіцидом покоління F₀ (а), F₁ (б) та покоління F₂ (в) (Об.20х. Ок.10х)



а



б



в

Рис 3.4.6. Мікрофотографія фрагменту печінки щурів за вживання трансгенної сої необробленої гербіцидом покоління F₀ (а), F₁ (б) та покоління F₂ (в) (Об.40х. Ок.15х)

Дослідження тканин печінки щурів IV та V груп вказує на пошкодження цього органа. При цьому у тварин IV групи, які вживали генетично модифіковану сою оброблену гербіцидом Roundup спостерігаються більш виражені морфологічні зміни (зворотне набухання у вигляді зернистої та гідропічної дистрофії), ніж у щурів V групи. Це може свідчити про наявність залишків гербіциду в насінні сої та підсилення впливу двох факторів на організм тварини (рис. 3.4.7 та рис.3.4.8, рис. 3.4.9 та рис. 3.4.10).

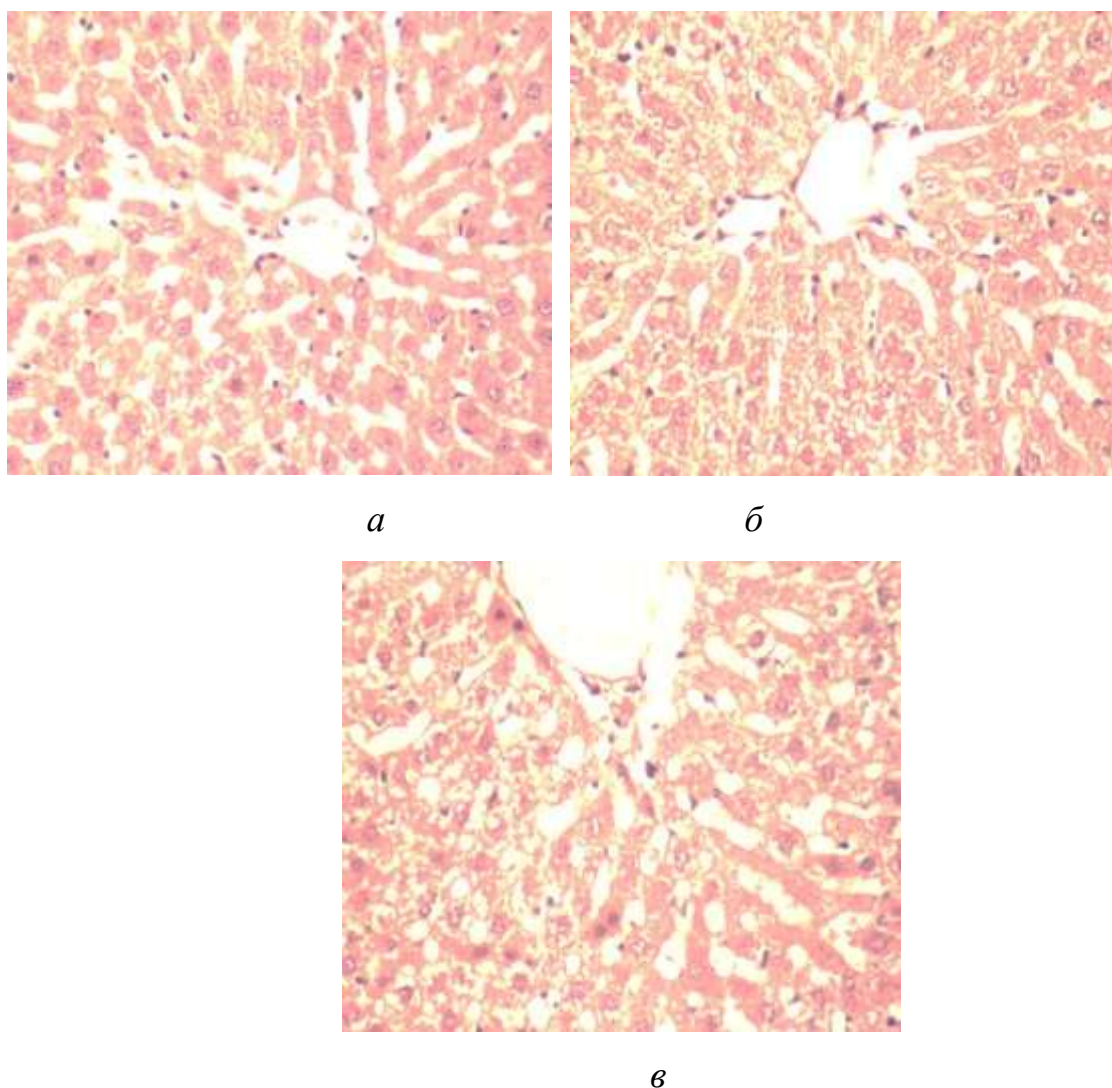
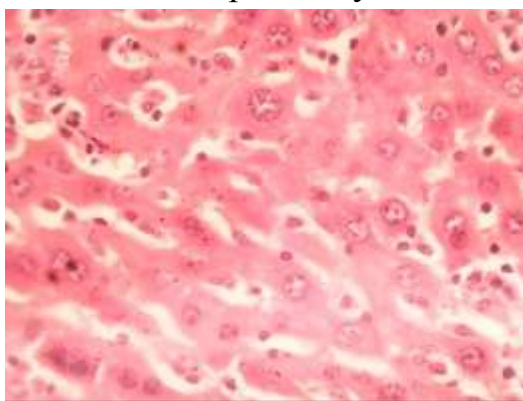


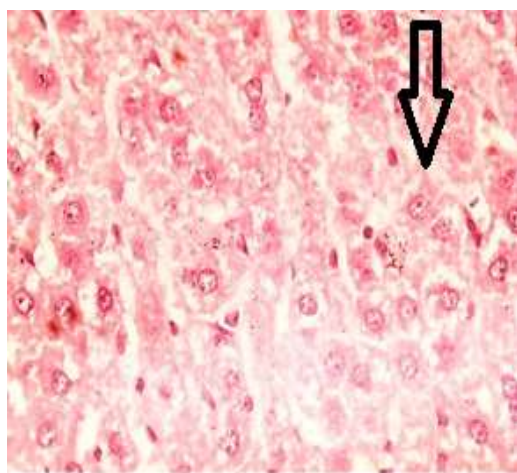
Рис. 3.4.7. Мікрофотографія фрагменту печінки щурів за вживання трансгенної сої обробленої гербіцидом покоління F₀ (а), F₁ (б) та покоління F₂ (в) (Об.20х. Ок.10х)

Цитоплазма у деяких гепатоцитів нерівномірно зміщена від ядра до периферії клітин. Цитоплазма має більші та темніші гранули в порівнянні з контролем. У більшості гепатоцити мають дрібнозернисту цитоплазму, яка рівномірно заповнює клітину. Ядро також зазнає певних структурних змін – більшість ядер збільшені, є ядра, що мають неправильну, амебоподібну форму. Частина ядер містить більш конденсовані ядерця, а у деяких, навпаки, – ядерця відсутні. Зустрічаються ядра, вміст яких розміщено по периферії.

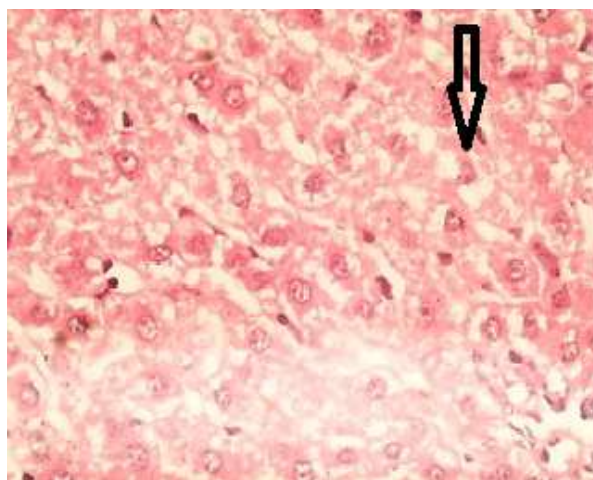
У F_1 та F_2 поколіннях у IV та V груп вплив трансгенної сої обробленої гербіцидом та самого гербіциду підсилюється: виявлено зворотне набухання гепатоцитів у IV групі, яке більше виражене у F_1 та F_2 поколіннях (рис. 3.4.8).



a



б



в

Рис. 3.4.8. Мікрофотографія фрагменту печінки щурів за вживання трансгенної сої обробленої гербіцидом покоління F_0 (а), F_1 (б) та покоління F_2 (в) (Об.40х. Ок.15х)

Цитоплазма гепатоцитів має більші та темніші включення в порівнянні з контролем, збільшуються просвіти між ними. Деякі ядра містять більш

конденсовані ядерця в порівнянні з контролем та ядра, що мають неправильну форму.

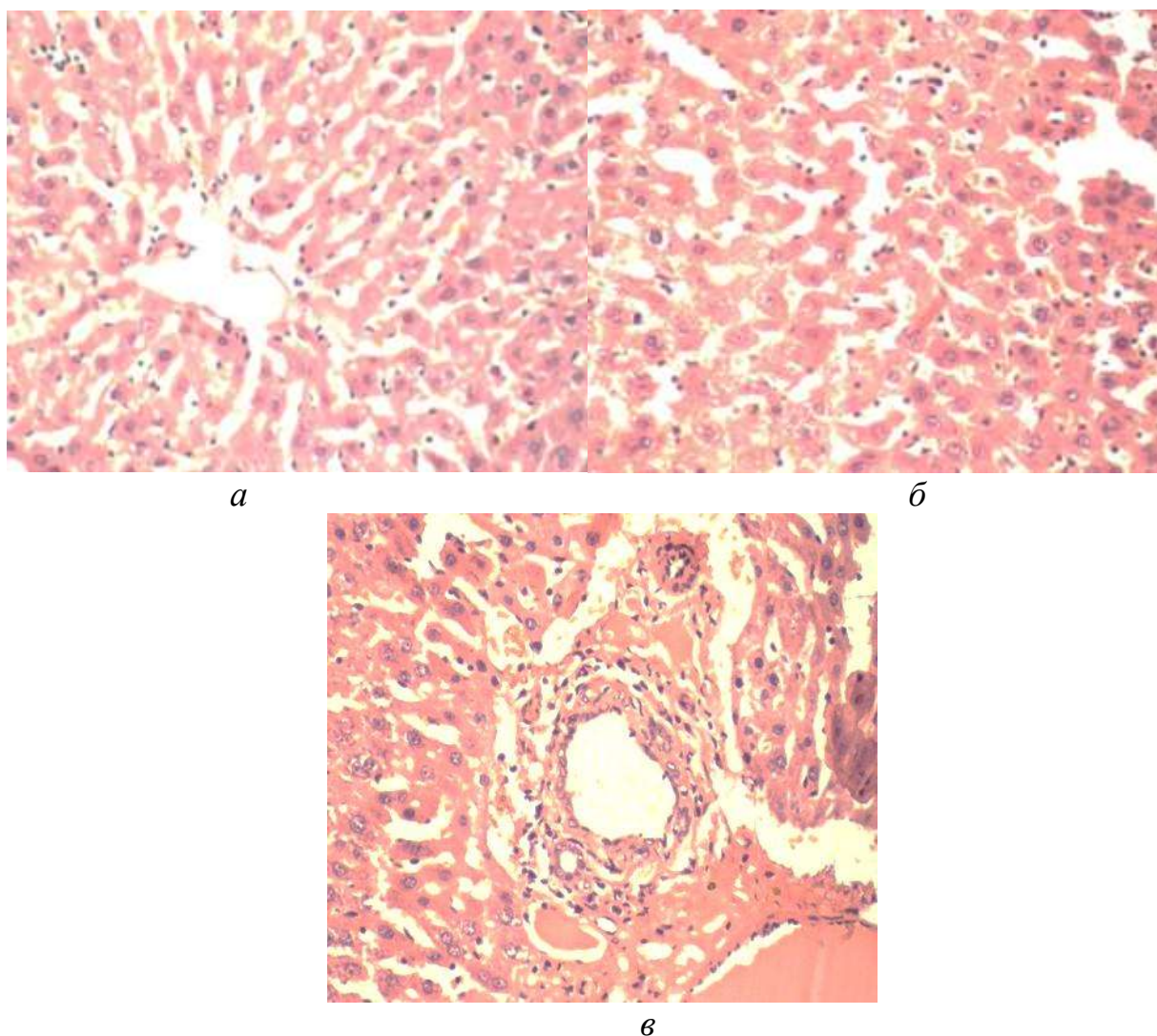
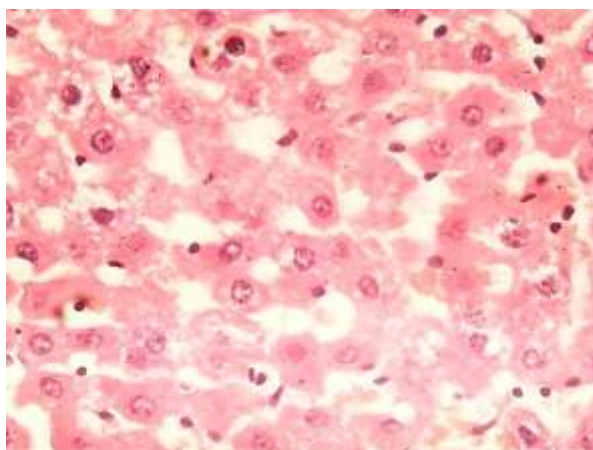


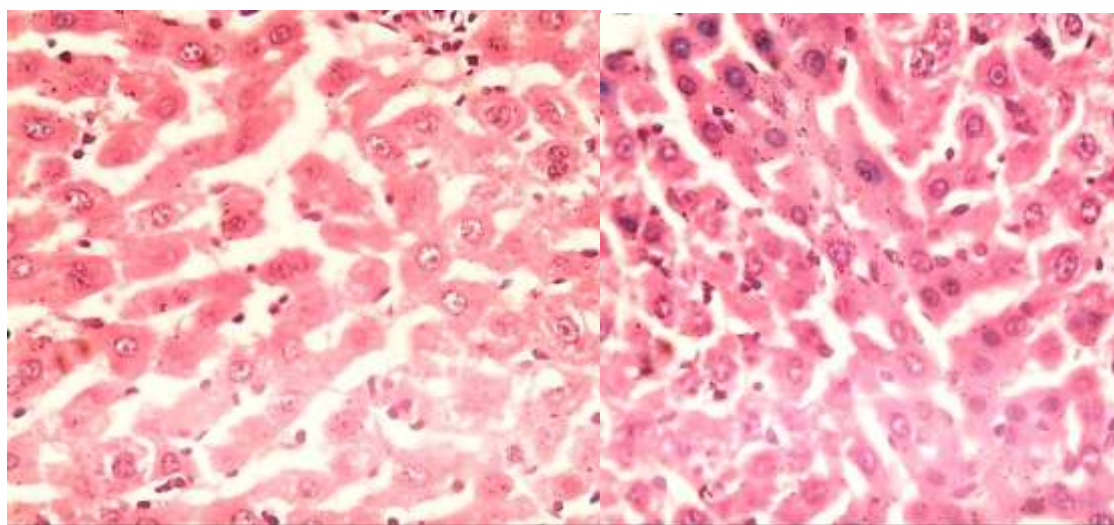
Рис. 3.4.9. Мікрофотографія фрагменту печінки щура за вживання з питною водою гербіцида Roundup у поколіннях F_0 (а), F_1 (а) та F_2 (в) (Об.20х. Ок.10х)

У щурів IV та V групи (рис. 3.4.9; рис. 3.4.10) додатково до описаних змін були виявлені некротичні зміни в окремих гепатоцитах у вигляді зморщування клітинного ядра (каріопікноз). Таким чином, вживання генетично модифікованої сої, обробленої гербіцидом Roundup та гербіциду разом з питною водою (0,1 мкг/л) призводить до морфологічних змін у гепатоцитах і до некротичних змін окремих клітин, і одночасно це в свою чергу веде до порушення функції печінки. Такі зміни можуть бути пов'язані не лише зі зворотним набуханням у вигляді зернистої та гідропічної

дистрофії, але й із змінами у будові окремих органел. Як свідчать літературні джерела, це проявляється у вигляді гіперхромного деформованого або фрагментованого ядра з наявністю двох і більше ядерців [23, 31]; гепатоцити, які розташовані біля некротичних клітин мають виражені ознаки внутрішньоклітинної регенерації та адаптації, що проявляється гіпертрофією та поліплоїдією [3, 25]



a



б

в

Рис. 3.4.10. Мікрофотографія фрагменту печінки щура за вживання з питною водою гербіцида Roundup у поколіннях F_0 (а), F_1 (а) та F_2 (в) (Об.40х. Ок.15х)

Рядом авторів виявлено, що при довготривалому вживанні трансгенної сої щурами у наступних поколіннях спостерігаються зміни у мітохондріях більшості гепатоцитів (набряку мітохондрій і руйнування крист) та

збільшення числа первинних лізосоми та мітохондрій у перинуклеарній зоні [5]. Крім того, втрачається гетерогенність клітин печінки щурів, що добре було виражено на мікрофотографіях гістологічних зрізів контрольної групи. Все це може бути ознакою функціональної напруги та зменшення адаптаційних резервів печінки.

Таким чином, при вживанні генетично модифікованої сої обробленої гербіцидом та гербіциду разом з питною водою печінка, як орган детоксикації і метаболізму багатьох ксенобіотиків, зазнає значних морфофункціональних змін, які яскраво виражені як при візуальному аналізі: змінюється структура цитоплазми гепатоцитів та їх ядер, вміст цитоплазми гепатоцитів зміщується до периферії клітини, окремі гепатоцити мають дрібнозернисту цитоплазму, яка рівномірно заповнює клітину. Спостерігається потовщення ендотелію центральних вен та стінок всіх судин портальних трактів, у портальних трактах є осередки запалення. Гепатоцити та їх ядра достовірно збільшуються, що є свідченням значного підвищення роботи клітин печінки у зв'язку з активацією метаболічних процесів, пов'язаних з деградацією гербіцидом гепатоцитів.

Наші дослідження структури нирок щурів батьківського та наступних двох поколінь, які вживали оброблену генетично модифіковану сою та гербіцид Roundup виявили також морфологічні зміни у кірковій та мозковій речовині нирок. Мікроскопічне дослідження нирок інтактних тварин усіх поколінь показало, що вони мають типову морфологічну організацію тканини нирок. Так, у кірковій речовині (рис. 3.4.11) ниркові клубочки звичайної будови, без змін також епітелій проксимальних та дистальних каналців в усіх поколіннях щурів. У контрольної групи тварин (інтактна група) на мікрофотографіях видно ниркове тільце яке утворено судинними клубочками, що покриває двошаровою капсулою клубочок. Ниркові тільця округлої форми, також видно проксимальний та дистальний каналець. У мозковій речовині епітелій збиральних трубочок без змін, це ж саме спостерігається і у нирках щурів II групи (рис. 3.4.12), які вживали

традиційну сою. На рис. 3.4.13 помітний набряк в канальцях, простору в канальцях майже немає у нирках щурів F_1 покоління та спостерігаються незначні зміни у F_2 поколінні.

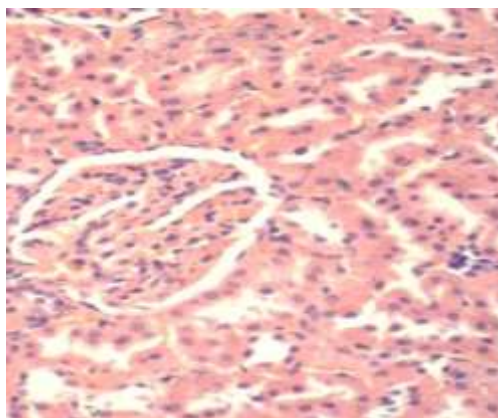


Рис. 3.4.11. Мікрофотографія гістологічного препарату нирки інтактного щура

Примітка: забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.20х. Ок.10х.

Проведені нами гістологічні дослідження використовуючи збільшення у 600 разів нирок щурів контрольних групи, показали чітку диференціацію органа на кіркову та мозкову речовину.

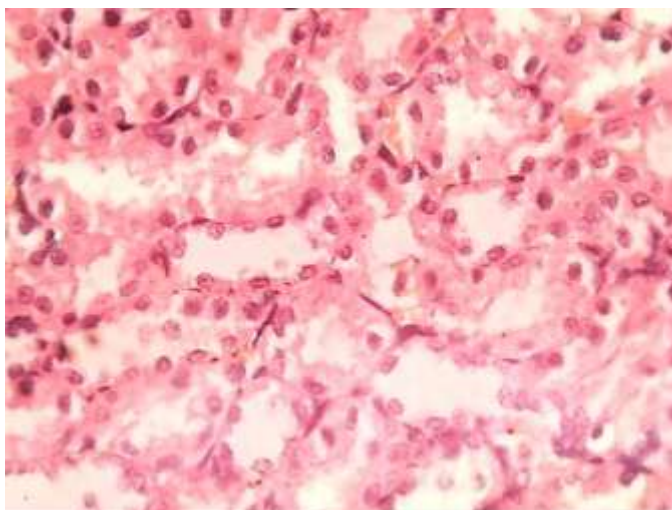
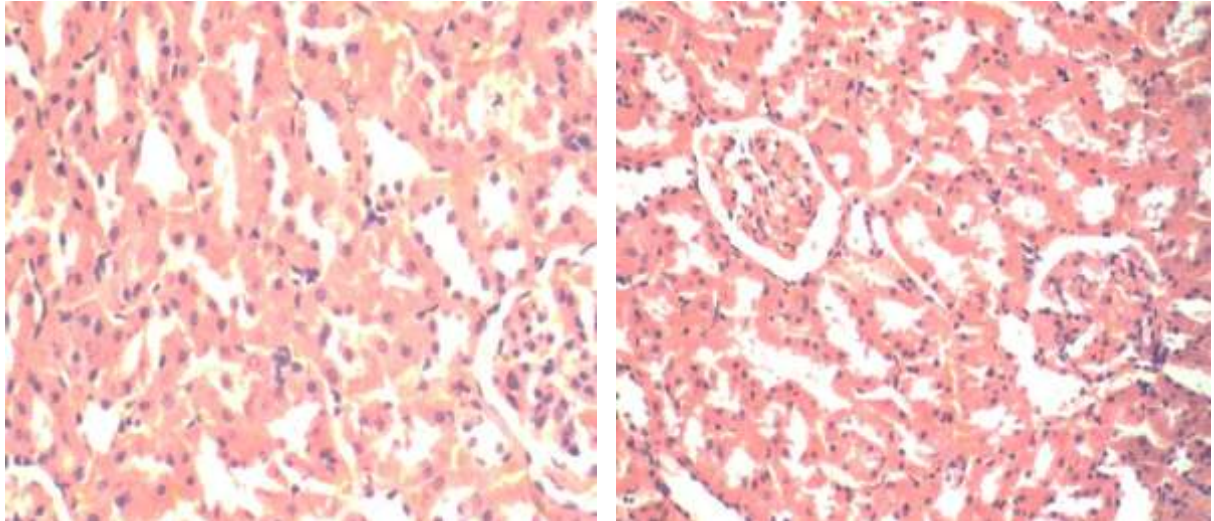


Рис. 3.4.12. Мікрофотографія гістологічного препарату нирки інтактного щура

Примітка: забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.40х. Ок.15х.

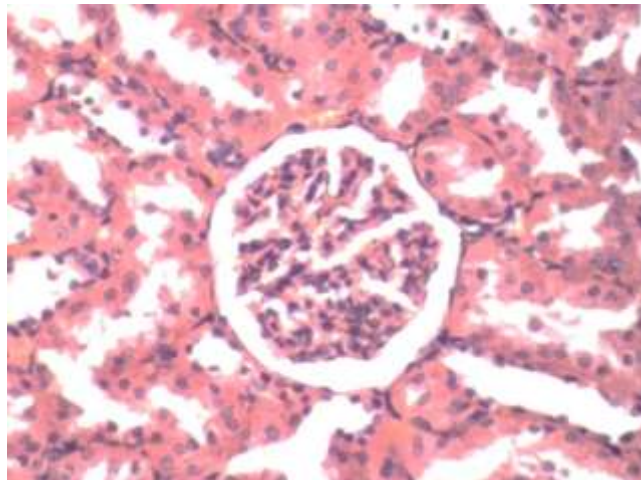
На рис. 3.4.13 (б) та (в) видно капсулу Шумлянського-Боумена, що складається із подвійного шару епітеліальних клітин, всередині капсули знаходиться порожнина — сечовий простір (боумеровий простір), в якому

фільтрується сеча. Помітно також, що зовнішній шар капсули клубочка утворений одним шаром клітин плоскої форми, що лежать на базальній мембрані. Внутрішній шар капсули нефрона утворений великими епітеліальними клітинами.



a

б



в

Рис. 3.4.13. Мікрофотографії гістологічних препаратів нирок щурів, яким 26 % стандартного раціону замінено на традиційну сою у F₀ поколінні (а), F₁ (б) та F₂ (в) поколінні

Примітка: забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.20х. Ок.10х

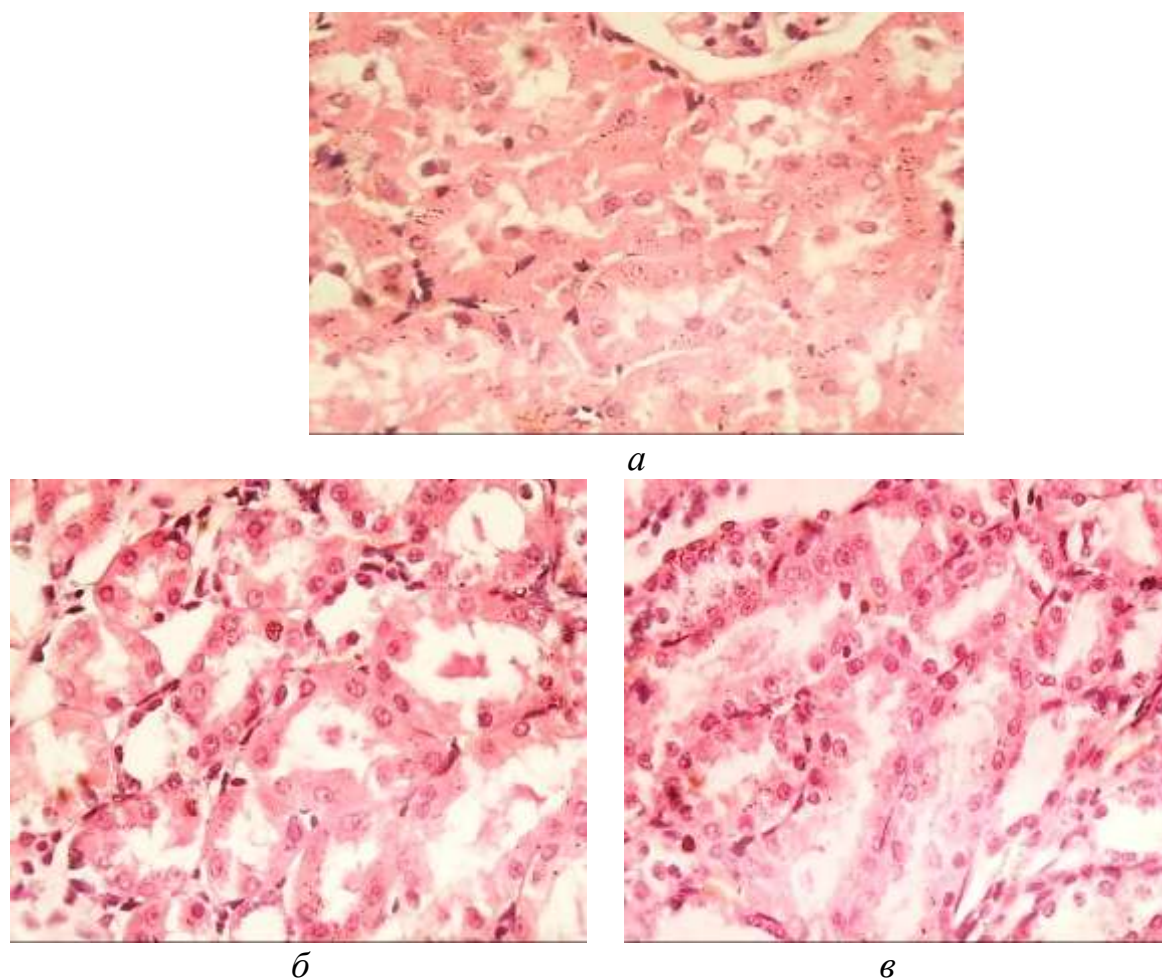


Рис. 3.4.14. Мікрофотографії гістологічних препаратів нирок щурів, яким 26 % стандартного раціону замінено на традиційну сою у F_0 поколінні (а), F_1 (б) та F_2 (в) поколінні

Примітка: забарвлення гематоксилином і еозином. Об.40х. Ок.15х

Спостерігаються незначні морфологічні зміни у нирках щурів, які вживали генетично модифіковану сою не оброблену гербіцидом (III група) як в батьківському так і в двох наступних поколіннях (рис. 3.4.14). У мозковій речовині будова інтерстицію та мозкових променів аналогічна інтактним тваринам. Морфологічна будова збірних трубочок сосочку нирок, а також інтерстиція та кровоносні судини мають характерні для інтактних щурів ознаки, також спостерігається втрата структури у деяких ниркових клубочків, а просвіт каналців заповнені вмістом, що свідчить про порушення у них фільтрації. (рис. 3.4.15 та рис. 3.4.16).

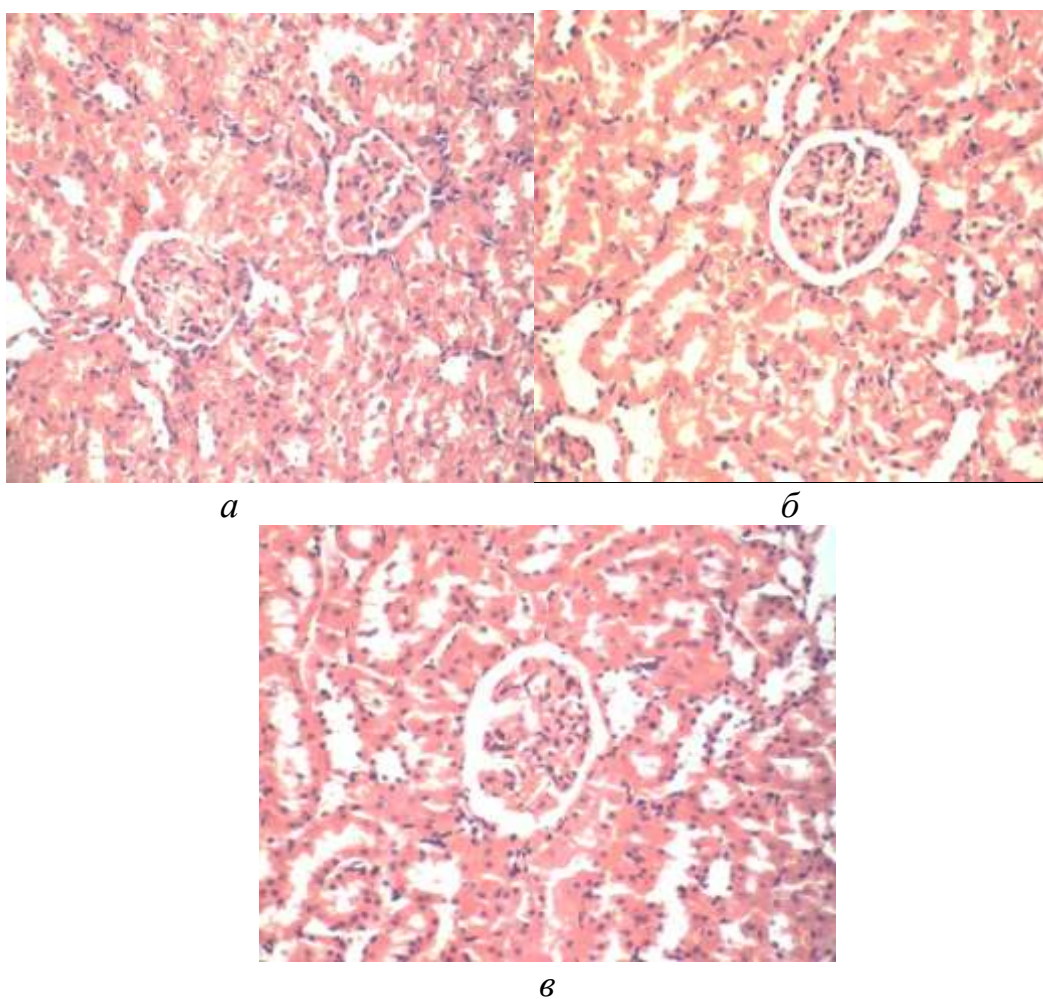
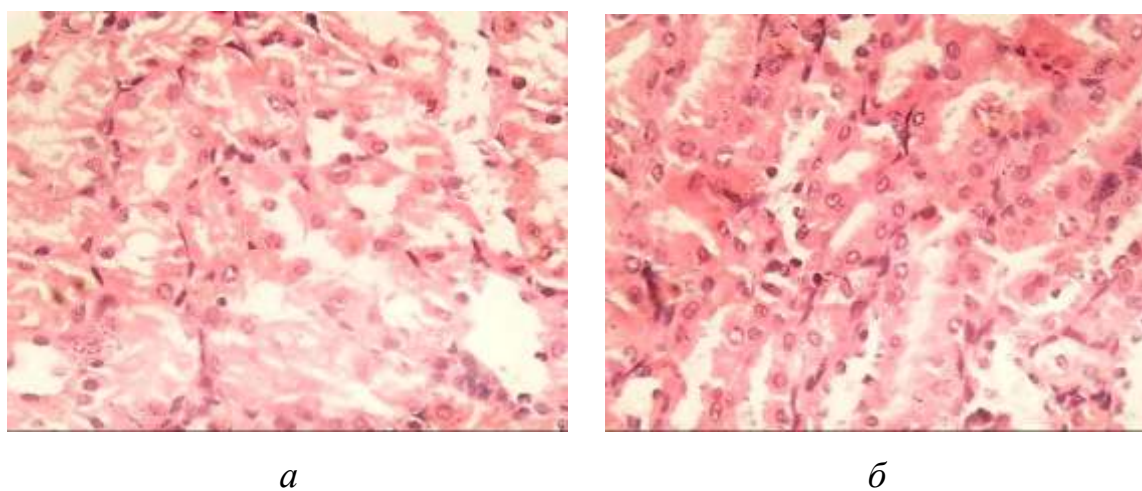
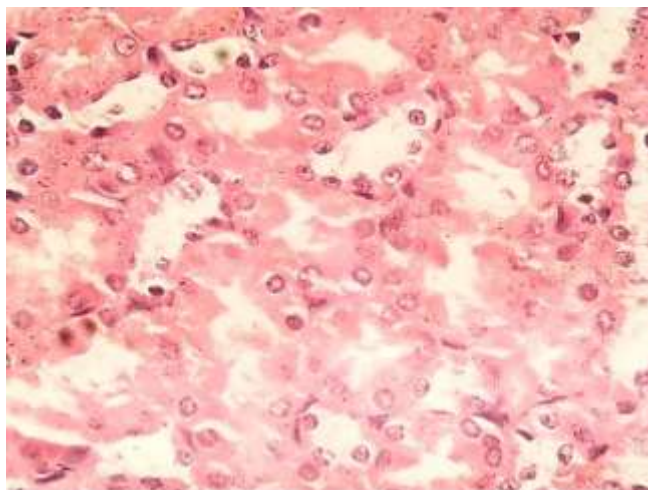


Рис. 3.4.15. Мікрофотографії гістологічних препаратів нирок щурів, яким 26 % стандартного раціону замінено на трансгенну сою у F₀ (а), F₁ (б) та F₂ (в) поколінні

Примітка: забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.20х. Ок.10х



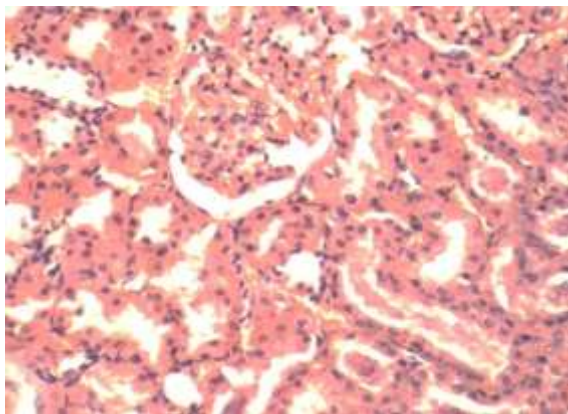


в

Рис. 3.4.16. Мікрофотографії гістологічних препаратів нирок щурів, яким 26 % стандартного раціону замінено на трансгенну сою у F₀ поколінні (а), F₁ (б) та F₂ (в) поколінні

Примітка: забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.40х. Ок.15х

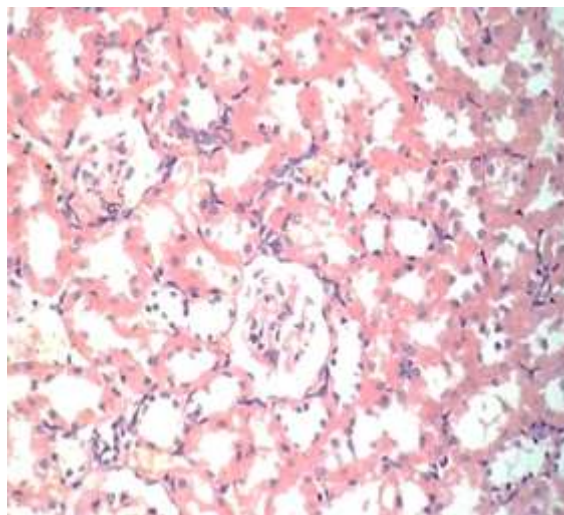
Виявлені, патоморфологічні зміни у структурі нирок щурів, які вживали гербіцид Roundup: ниркові клубочки в кірковій речовині мають ознаки інтеркапілярного набряку, а епітелій звивистих канальців з ознаками зворотного набряку клітини. Деякі епітеліоцити проксимальних канальців з ознаками некрозу (каріопікноз та ущільнення цитоплазми), деякі епітеліоцити, з ознаками гідропічного набряку, просвіт цих канальців звужений, що спостерігається в V групі (рис. 3.4.17 а), а на рис. 3.4.17 (б) спостерігається атрофія епітелію канальців і капсул.



а



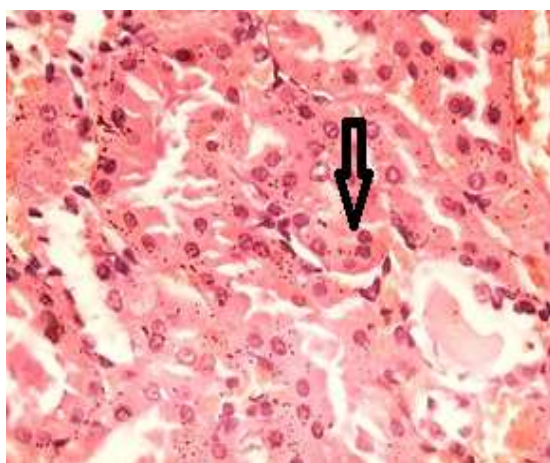
б



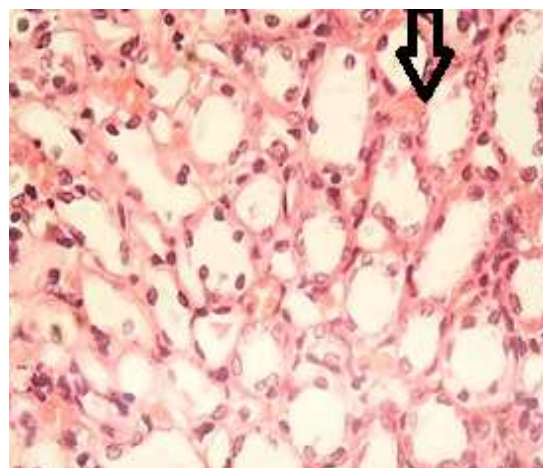
в

Рис. 3.4.17. Мікрофотографії гістологічних препаратів нирок щурів, які отримували разом з питною водою гербіцид Roundup у F₀ поколінні (а), F₁ (б) та F₂ (в) поколінні

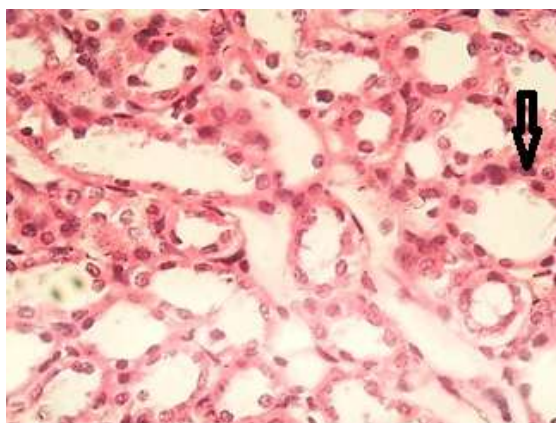
Примітка: забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.20х. Ок.10х



а



б



в

Рис. 3.4.18. Мікрофотографії гістологічних препаратів нирок щурів, які отримували разом з питною водою гербіцид Roundup у F₀ поколінні (а), F₁ (б) та F₂ (в) поколінні

Примітка: забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.40х. Ок.15х.

На рис. 3.4.17. (в) чітко помітно потоншення епітелію каналців – клітини плоскі та їх ядра оголені через руйнування клітин. Така картина не відповідає нормі, і свідчить про некроз клітин нирок щурів в усіх поколіннях при вживанні гербіциду разом з питною водою.

У нирках щурів F_0 покоління при вживанні гербіциду разом з питною водою у порівнянні із інтактними тваринами (рис. 3.4.18 а) виявлено закупорку міоглобіновими циліндрами просвітів звивистих каналців кіркової речовини та вивідних трубочок мозкової речовин (рис. 3.4.18 а). При цьому у F_1 та F_2 поколіннях при вживанні гербіциду разом з питною водою спостерігається розширення каналців нирок, а також потоншення їх стінок (рис. 3.4.18 б, рис. 3.4.18 в), що показано на рисунку.

Набільше гідропічний набряк виражений у каналцях нирок щурів F_1 та F_2 покоління, які вживали оброблену гербіцидом сою (рис. 3.4.17 та рис. 3.4.19) та гербіцид Roundup разом з питною водою, вплив цих факторів підтверджують дослідження, що проводилися раніше [26, 35], хоча сумісний вплив даних чинників не вивчався. На мікрофотографіях видно, що клітини епітелію збірних трубочок з ознаками гідропічної вакуолізації, спостерігається набряк клітин епітелію проксимальних каналців. У щурів, які вживали генетично модифіковану сою, оброблену гербіцидом Roundup, також спостерігається набряк клітин нирок, що свідчить про виражені ознаки некрозу окремих клітин. У дистальних каналцях епітеліоцити з ознаками гідропічного набряку, просвіти каналців заповнені вмістом, що свідчить про порушення у них фільтрації (рис. 3.4.19). Дані результати вказують на структурні зміни та порушення роботи нирок у IV та V групах.

На рис. 3.4.19 (в) чітко помітна нейтрофільна інфільтрація – ознака початку запалення. Просвіти каналців заповнені вмістом, отже фільтрація в них порушена. Крім того, ниркові клубочки втратили свою структуру, що свідчить про глибокі порушення у нирках щурів F_2 покоління, які вживали генетично модифіковану сою оброблену гербіцидом Roundup.

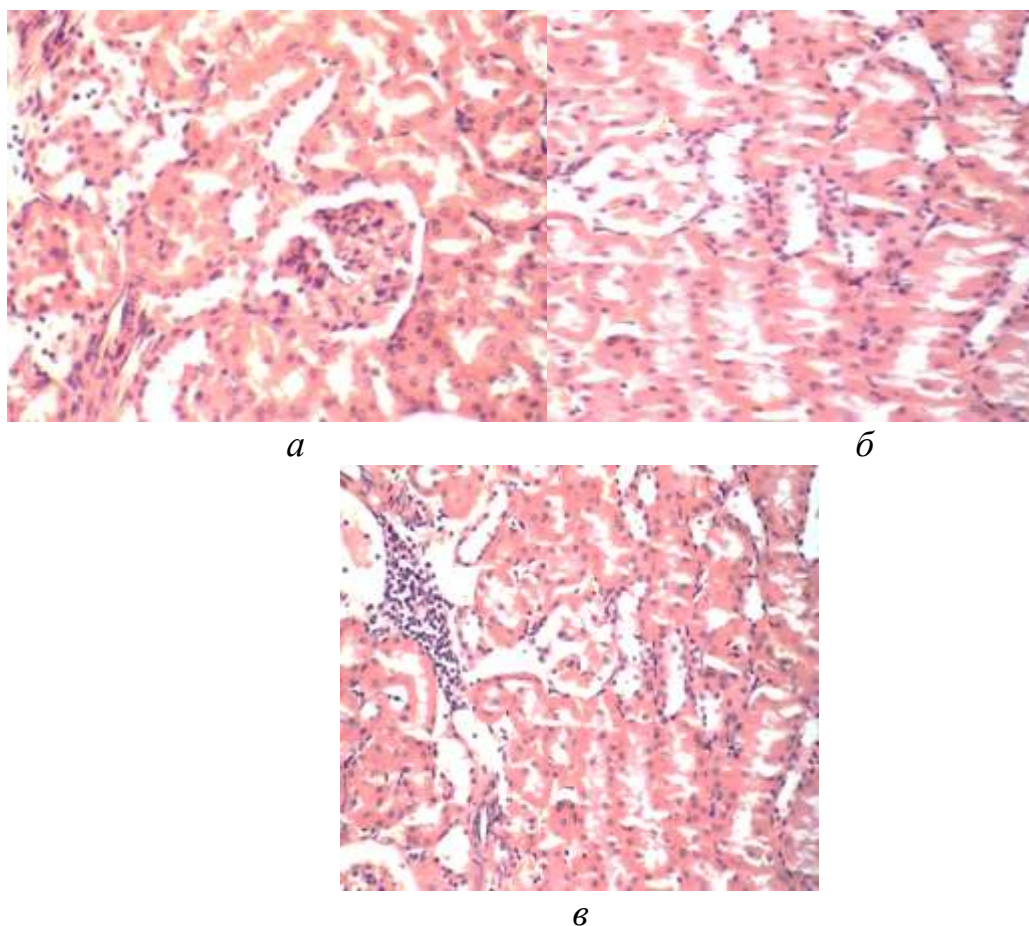
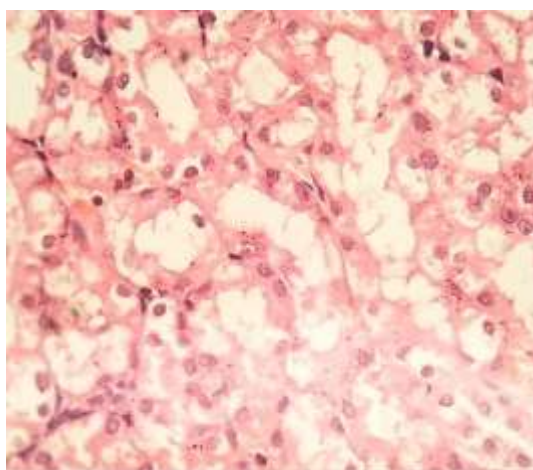
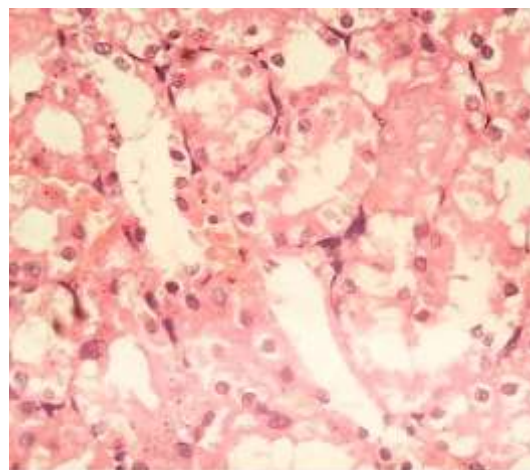


Рис. 3.4.19. Мікрофотографії гістологічних препаратів нирок щурів, раціон яких містив до 26% генетично модифікованої сої, обробленої гербіцидом Roundup у F₀ поколінні (а), F₁ (б) та F₂ (в) поколінні

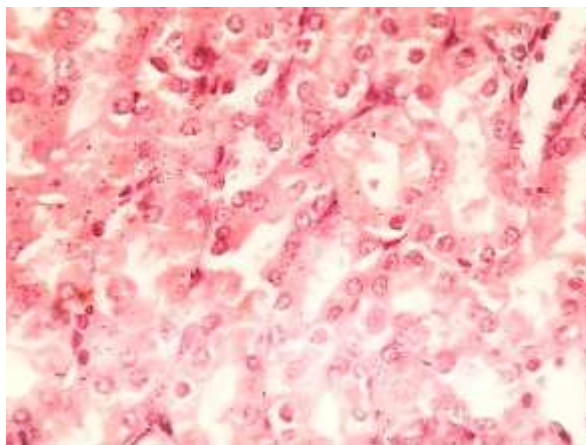
Примітка: забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.20х. Ок.10х.



а



б



б

Рис. 3.4.20. Мікрофотографії гістологічних препаратів нирок щурів, раціон яких містив до 26% генетично модифікованої сої, обробленої гербіцидом Roundup у F₀ поколінні (а), F₁ (б) та F₂ (в) поколінні

Примітка: забарвлення гематоксилином і еозином. Об.20х. Ок.10х.

Встановлені морфологічні особливості можуть бути підґрунтям для подальших біохімічних досліджень змін функціонального стану нирок при вживанні гліфосат-резистентної сої, обробленої гербіцидом Roundup і вплив самого гербіциду. Результати досліджень показали, що найбільші гістопатологічні зміни піддослідних тварин спостерігаються у IV та V групах, що може бути зумовлене дією гербіциду Roundup. Структура ниркових клубочків цих дослідних груп порушена, у канальцях спостерігається руйнування клітин, а просвіти їх заповнені рідиною, що призводить до порушення фільтрації у нирках.

Таким чином, у піддослідних тварин, що вживали традиційну та трансгенну сою не спостерігалися структурні зміни та порушення у функціонуванні нирок щурів F₀, F₁ та F₂ покоління. У тварин, що вживали генетично модифіковану сою, оброблену гербіцидом Roundup спостерігається втрата структури у деяких ниркових клубочків, а просвіт канальців заповнений вмістом рідини, що свідчить про незначні порушення у будові клітин. Крім того, під час вживання гербіциду Roundup разом з питною водою були виявлені структурні зміни у нирках щурів F₀, F₁ та F₂

поколінь в яких спостерігається гідропічний набряк епітеліоцитів дистальних канальців, просвіт цих канальців звужений, спостерігається некроз окремих клітин.

Вживання щурами трансгенної сої, обробленої гербіцидом Roundup призводить до порушення структури ниркових клубочків, у канальцях ще спостерігається і руйнування клітин, а просвіти канальців заповнені вмістом рідини як у F_0 так і F_1 поколінні, що призводить до порушення фільтрації у нирках.

Отже, під час вживання гербіциду Roundup у дозі 0,1 мкг/л виявлені патоморфологічні зміни як у нирках так і у печінці (зворотне набухання гепатоцитів та некротичні зміни в окремих гепатоцитах) у щурів F_0 , F_1 та F_2 поколіннях. У F_1 та F_2 поколінні у більшій кількості гепатоцитів виявлені некротичні зміни у вигляді зморщування клітинного ядра (каріопікноз), що може бути причиною тривалішої дії гербіциду та посилення його впливу в F_1 поколінні. Довготривале згодовування щурам трансгенної сої, обробленої гербіцидом Roundup призводить до зворотного набухання клітин нирок та печінки, як у F_0 , так і F_1 поколінні, у F_2 набухання клітин печінки найбільше виражено. Також у окремих клітинах спостерігається явище каріопікнозу, як прояв некротичних змін цих клітин, при цьому цей процес більше виражений у щурів F_1 та F_2 покоління.

3.5. Гістохімічні та біохімічні особливості окиснювальної модифікації протеїнів у нирках та печінці щурів, яким згодовували генномодифіковану та гербіциду Roundup

В результаті дослідження виявлено, що барвник бромфеноловий синій спричинив забарвлення протеїнів (за Mikel Calvo) тканин нирок та печінки щурів, ті що містили кислі групи – у червоний колір, а які містили основні групи – у синій колір. Відношення інтенсивності червоного кольору до синього характеризує перевагу кислих протеїнів над основними у тканині і свідчить про ступінь окиснювальної модифікації протеїнів. Якщо величина показника дорівнює “1”, то співвідношення між основними та кислими протеїнів рівне, якщо величина показника вище “1” – переважають кислі протеїни [96].

Вживання традиційної сої призводить до незначного підвищення кислих протеїнів у епітеліальних клітинах проксимальних каналців, хоча у наступних поколіннях (F_1 та F_2) вміст кислих та основних протеїнів однаковий (лише спостерігається підвищення у F_0) (див. таблицю 3.5.1), це може свідчити про незначне підвищення вільних радикалів у клітинах нирок щурів батьківського покоління.

Виявлено посилення окисної модифікації протеїнів за зростанням показника R/B у проксимальних каналцях, мозкових товстих висхідних частинах петлі нефрону, збірних каналцях сосочка нирок у IV та V групах. У мезангіоцитах ниркових клубочків вміст кислих та основних протеїнів у F_2 поколінні збільшується не значно у II та III групах. Інша картина спостерігається у нирках щурів за вживання генетично модифікованої сої, обробленої гербіцидом (IV група) та гербіциду Roundup (V група).

Так, коефіцієнт R/B у епітеліальних клітинах проксимальних каналців IV групи збільшується у 1,22 разу, а у F_1 поколінні – у 1,36, у F_2 поколінні – у 1,38 разу. Також підвищується вміст кислих протеїнів у епітеліальних

клітинах проксимальних каналців у V групі як в F₀, F₁ та F₂ поколінні (табл.3.5.1).

Таблиця 3.5.1.

Ступінь окиснювальної модифікації протеїнів за коефіцієнтом R/B під час гістологічного аналізу зрізів нирок щурів двох поколінь, які вживали традиційну та гліфосат-резистентну генетично модифіковану сою, оброблену гербіцидом, (M±m, n=10).

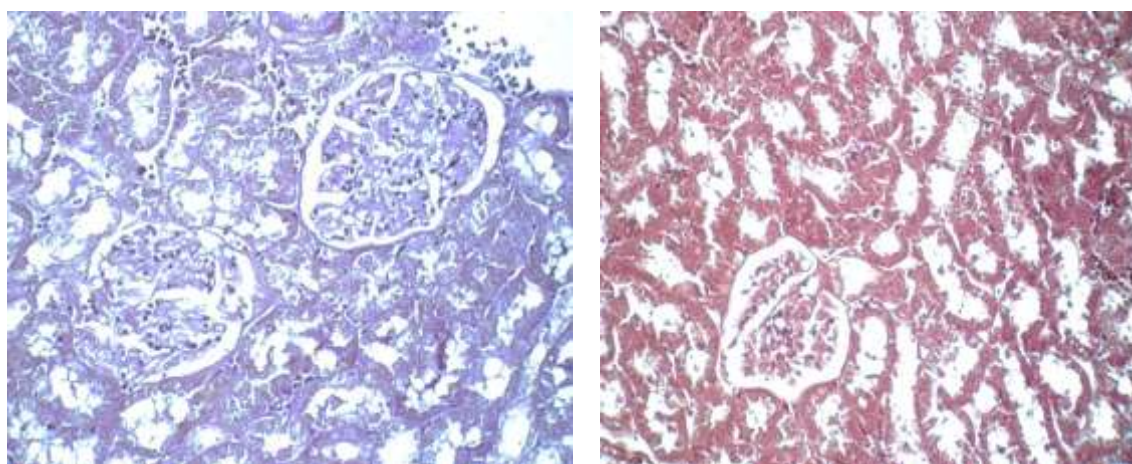
Групи	Відсоток епітеліальних клітин проксимальних каналців у стані зернистої або гідропічної дистрофії	Відсоток епітеліальних клітин проксимальних каналців у стані гіаліново-крапельної дистрофії	Відсоток ниркових клубочків з ознаками повнокров'я капілярів	Коефіцієнт R/B при забарвленні бромфеноловим синім за Mikel Calvo в епітеліальних клітинах проксимальних каналців	Коефіцієнт R/B при забарвленні бромфеноловим синім за Mikel Calvo в мезангіоцитах ниркових клубочків
F₀ покоління					
I група	4±0,039	0	0	1,05±0,004	1,02±0,005
II група	6±0,058**	48±0,6	0	1,21±0,005***	1,05±0,008*
III група	8±0,057***	0	0	1,09±0,005***	1,08±0,008***
IV група	24±1,005***	4±0,039	12±0,062	1,28±0,015***	1,26±0,009***
V група	41±0,9***	0	98±0,67	1,28±0,015***	1,27±0,009***
F₁ покоління					
I група	4±0,43	0	0	1,04±0,008	1,02±0,004
II група	7±0,36***	43±0,73	0	1,08±0,018	1,05±0,011
III група	6±0,48**	0	0	1,05±0,013	1,08±0,013***
IV група	67±0,69***	8±0,67	64±0,53	1,41±0,015***	1,34±0,098***
V група	64±0,61***	0	81±0,48	1,39±0,006***	1,31±0,007***
F₂ покоління					
I група	4±0,41	0	0	1,07±0,008	1,04±0,008
II група	12±0,45***	28±0,78	0	1,08±0,004	1,04±0,008
III група	24±0,58***	0	0	1,15±0,009***	1,18±0,01***
IV група	69±0,8***	88±0,54	12±0,53	1,48±0,005***	1,46±0,007***
V група	66±0,4***	38±0,21	84±0,73	1,40±0,005***	1,44±0,005***

Примітка: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.

Підвищується вміст кислих протеїнів у IV групі F₀, F₁ покоління спостерігається і у мезангіоцитах ниркових клубочків – в 1,2 та 1,3 разу відповідно, а у F₂ поколінні в 1,4 разу. Такий результат може свідчити про

здатність гербіциду Roundup накопичуватися у насінні сої та підвищувати вільнорадикальні процеси у клітинах нирок, саме це призводить до підвищення вмісту ОМП у нирках. Вживання гербіциду Roundup разом з питною водою у концентрації 0,1 мкг/л (V група) у щурів F_0 , F_1 покоління в мезангіоцитах ниркових клубочків коефіцієнт R/B підвищуються у 1,2 та 1,3 разу. У F_2 поколінні V групи показник коефіцієнту R/B підвищується в 1,4 разу порівняно з контролем. При цьому ступінь ОМП у епітеліальних клітинах проксимальних каналців та у мезангіоцитах ниркових клубочків найбільше виражений у F_2 поколінні, також більша кількість клітин у стані гідропічної дистрофії та гіаліново-крапельної дистрофії, як у V, так і IV групі та збільшення відсотку епітеліальних клітин проксимальних каналців в стані зернистості у 17 разів (табл. 3.5.1.).

Розглянувши мікрофотографії нирок щурів, які вживали традиційну сою значних відмінностей у будові органу не виявлено, лише виявлено незначне зростання коефіцієнта R/B у епітеліальних клітинах проксимальних каналців та у мезангіоцитах ниркових клубочків.

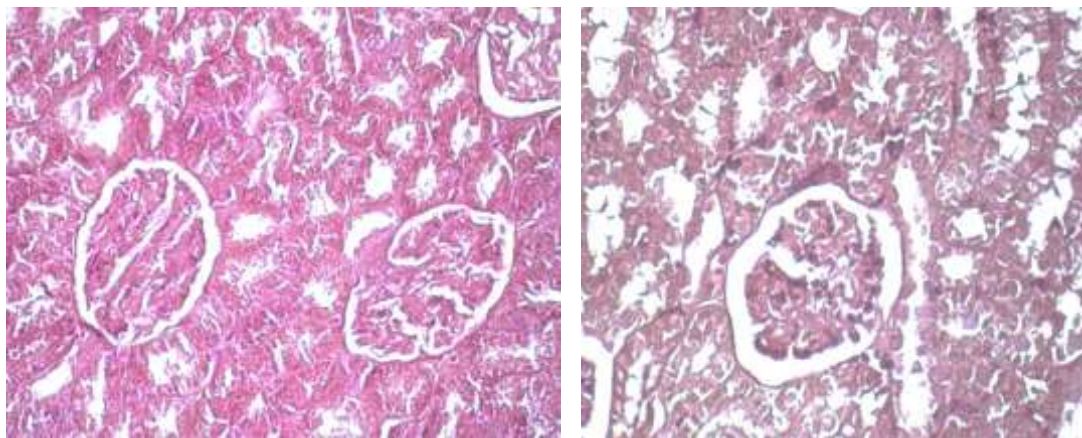


a

б

Рис 3.5.1. Кіркова речовина нирки щура при гістохімічному забарвленні протеїнів бромфеноловим синім за Мікель-Кальво у контрольній групі (а) та за вживанні традиційної сої (б) у F_0 поколінні щурів.

Примітка: Об. 20^x. Ок. 10^x. Загальне оптичне збільшення – 200^x.



а

б

Рис 3.5.2. Кіркова речовина нирки щура при гістохімічному забарвленні протеїнів бромфеноловим синім за Мікель-Кальво за вживання генетично модифікованої сої не обробленої (а) та обробленої гербіцидом «Roundup» (б) у F0 поколінні щурів

Примітка: Об. 20^x. Ок. 10^x. Загальне оптичне збільшення – 200^x.

Споживання генномодифікованої сої необробленої гербіцидом Roundup призводить до звуження просвіту проксимальних канальців, у нирках щурів спостерігаються незначні морфологічні зміни, втрата структури у деяких ниркових клубочків, що свідчить про порушення у них фільтрації. Морфологічна будова збірних трубочок сосочку нирок має характерні для інтактних щурів ознаки.

Патоморфологічні зміни спостерігаються у структурі нирок щурів, які вживали трансгенну сою оброблену гербіцидом та гербіцид Roundup з питною водою: епітелій звивистих канальців з ознаками набряку клітини.

Вживання геномодифікованої сої обробленої гербіцидом Roundup та гербіциду разом з питною водою призводить до посилення окисної модифікації протеїнів за зростанням показника R/V по відношенню до контролю (інтактних тварин). Мікрофотографії гістохімічних змін у нирках III, IV та V груп наведені на рис. 3.5.2. та рис. 3.5.3., як видно з рисунків гідропічна дистрофія найбільш виражена у V групі. Також виявлені зміни у самій будові нирок, деякі ниркові клубочки збільшені, гіперцелюлярні,

капілярні петлі їх розширені. Підвищення ОМП є результатом порушення рівноваги між процесами, що регулюють синтез та оксидацію протеїнів, і зменшення протезної активності [15].

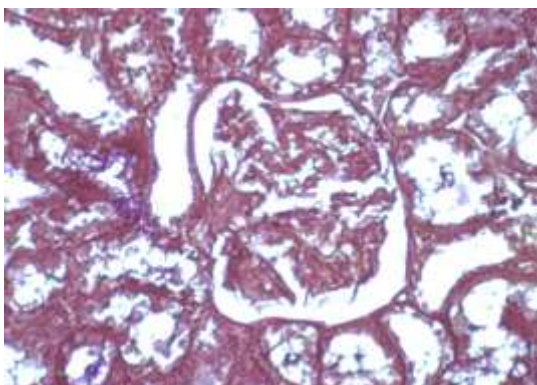
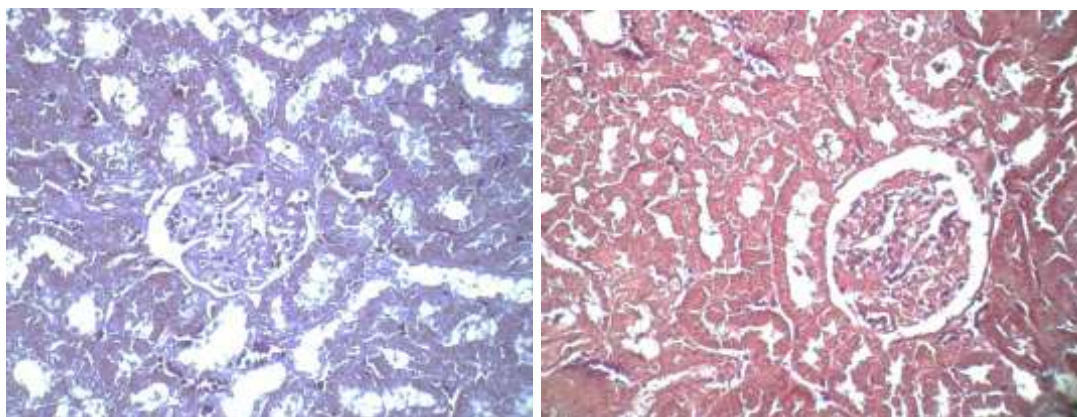


Рис 3.5.3. Кіркова речовина нирки щура при гістохімічному забарвленні протеїнів бромфеноловим синім за Мікель-Кальво за вживання гербіциду Roundup у F₀ поколінні щурів

Примітка: Об. 20^x. Ок. 10^x. Загальне оптичне збільшення – 200^x.

У F₀ поколінні у I та II групі не виявлено значних відмінностей з такими ж групами першого покоління, лише спостерігається збільшення просвітів проксимальних каналців.



а

б

Рис 3.5.4. Кіркова речовина нирки щура при гістохімічному забарвленні протеїнів бромфеноловим синім за Мікель-Кальво у контрольній групі (а) та за вживання традиційної сої (б) у F₁ поколінні щурів

Примітка: Об. 20^x. Ок. 10^x. Загальне оптичне збільшення – 200^x.

У III групі F_0 покоління щурів спостерігається звуження просвіту як проксимальних, так і дистальних канальців, також видно порушення структури деяких клітин.

Вживання генномодифікованої сої обробленої гербіцидом Roundup та гербіциду разом з питною водою призводить як до посилення окисної модифікації протеїнів так і до порушення будови клітин нирок. В епітелії більшості канальців визначається гідропічна дистрофія; в окремих ділянках виражена атрофія; в інтерстиції явища набряку, з вираженим протеїновим просоченням (рис. 3.5.4 та рис.3.5.5).

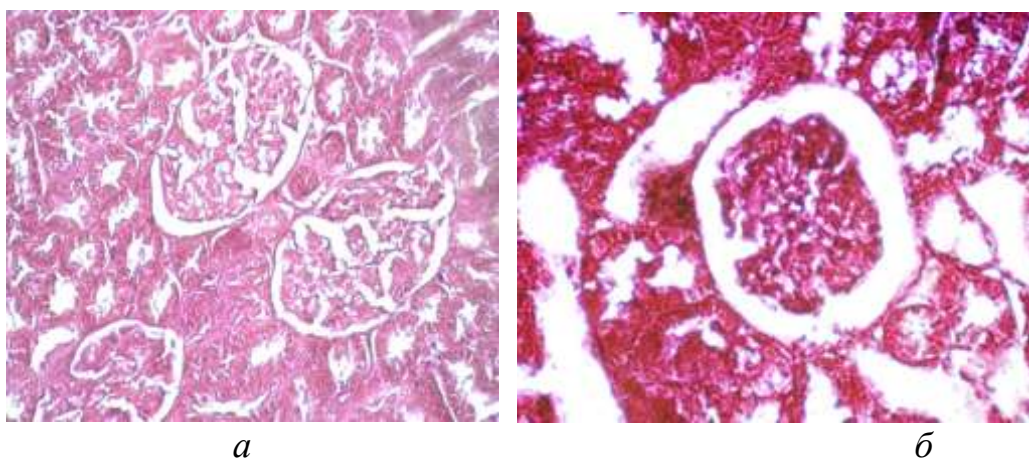
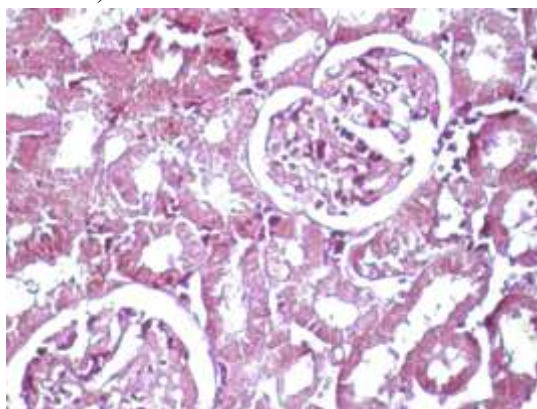


Рис 3.5.5. Кіркова речовина нирки щура при гістохімічному забарвленні протеїнів бромфеноловим синім за Мікель-Кальво за вживання генетично модифікованої сої необробленої (а) та обробленої гербіцидом Roundup (б) у F_1 поколінні щурів

Примітка (тут і на рис.3.5.6): Об. $20\times$. Ок. $10\times$. Загальне оптичне збільшення – $200\times$.



в

Рис 3.5.6. Кіркова речовина нирки щура при гістохімічному забарвленні протеїнів бромфеноловим синім за Мікель-Кальво за вживання гербіциду Roundup у F_1 поколінні щурів.

У I групі щурів F_0 , F_1 , F_2 покоління, не виявлено значних порушень у будові нирки та незначне зростання коефіцієнта R/B у епітеліальних клітинах проксимальних каналців та у мезангіоцитах ниркових клубочків.

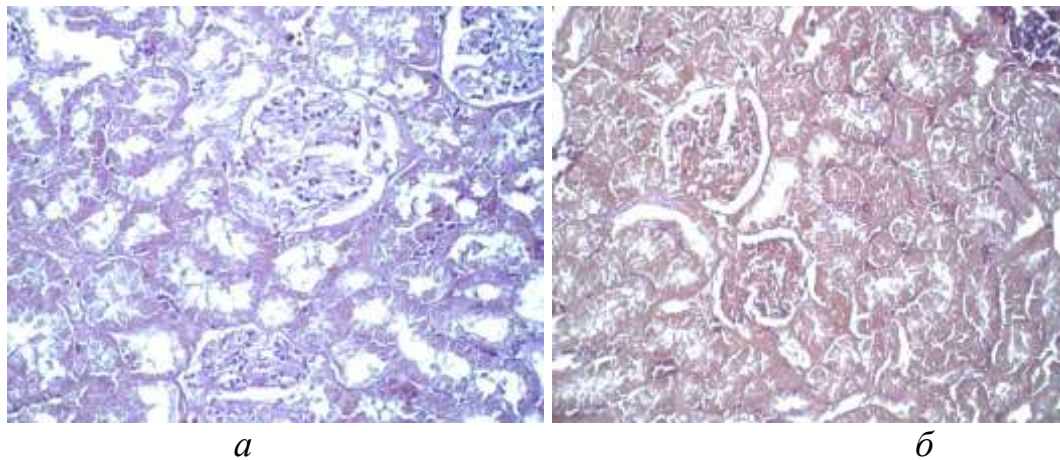


Рис 3.5.7. Кіркова речовина нирки щура при гістохімічному забарвленні протеїнів бромфеноловим синім за Мікель-Кальво у контрольній групі (а) та за вживання традиційної сої (б) у F_2 поколінні щурів

Примітка (тут і на рис. 3.5.8): Об. 20 $\times$. Ок. 10 $\times$. Загальне оптичне збільшення – 200 $\times$.

У II та III групі щурів F_1 та F_2 покоління спостерігаються звуження просвіту проксимальних та дистальних каналців, при цьому більше це виражено у III групі.

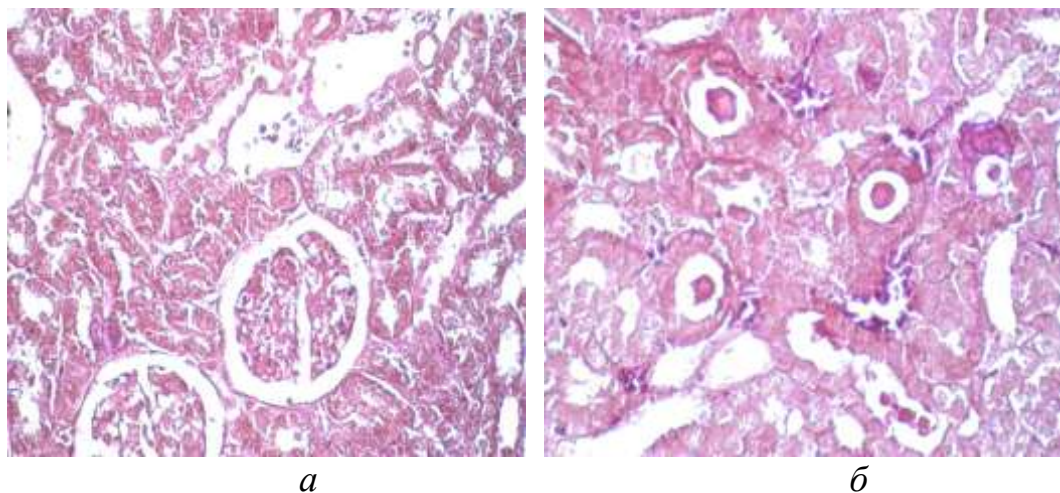


Рис 3.5.8. Кіркова речовина нирки щура при гістохімічному забарвленні протеїнів бромфеноловим синім за Мікель-Кальво за вживання генетично модифікованої сої необробленої (а) та обробленої гербіцидом Roundup (б) у F_2 поколінні щурів

Гістохімічний аналіз нирок IV групи щурів виявив такі ж зміни, як і у V групі тварин (F_1 та F_0 покоління), проте ці зміни більше виражені. Спостерігається збільшення деяких ниркових клубочків, при цьому гіперцелюлярні та капілярні петлі їх розширені, переповнені еритроцитами. В окремих клубочках подекуди спостерігається проліферація мезангіоцитів. Сечовий простір більшості ниркових тілець звужений [12, 15]. Спостерігається підвищення коефіцієнта R/B у епітеліальних клітинах проксимальних каналців та у мезангіоцитах ниркових клубочків, що свідчить про зростання окисної модифікації протеїну в клітинах.

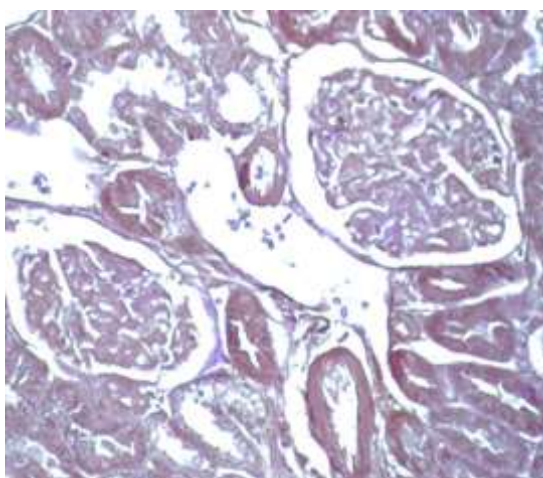


Рис 3.5.9. Кіркова речовина нирки щура при гістохімічному забарвленні протеїни бромфеноловим синім за Мікель-Кальво внаслідок вживання гербіциду Roundup в дозі 0,003 мкг/кг маси тварини у F_2 поколінні щурі

Примітка: Об.20^x. Ок. 10^x. Загальне оптичне збільшення – 200^x.

Ймовірно, що гербіцид Roundup, будучи ксенобіотиком, біотрансформується системою цитохрому P450 у потенційно токсичні метаболіти, які здатні викликати пошкодження клітинних мембран [170]. Цитохром 450 ензимна система здатна метаболізувати ксенобіотики, синтез ензимів відбувається переважно в печінці, в меншій мірі у кишечнику (що може знижувати біодоступність ліків), легенях, плаценті, нирках. Під дією АФК утворюються альдегідо- та кетогрупи, що є однією з адаптаційних систем і стимулюють активацію протеолітичних ензимів, що вибірково

руйнують окиснені протеїни. За оксидативного стресу АФК утворюються у надлишку внаслідок чого утворюються кислі групи, що свідчать про порушення рівноваги про/антиоксидантної системи. Саме тому гербіцид Roundup призводить до підвищення коефіцієнту R/B у гістохімічних зразках нирок щурів IV групи та V групи.

Оскільки, одними з основних маркерів окиснювальної модифікації протеїнів є підвищення кількості карбонільних похідних та зниження вмісту вільних сульфгідрильних груп, то нами було досліджено їх рівень у гомогенаті нирків (рис.3.5.10 та 3.5.11).

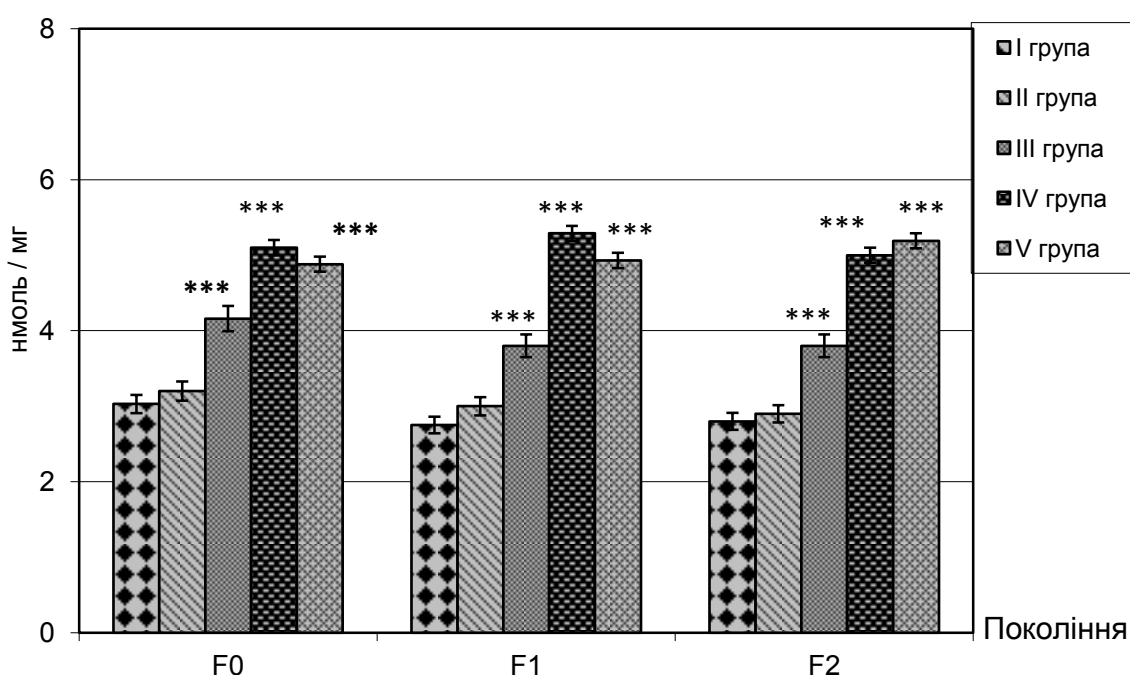


Рис.3.5.10. Рівень карбонілювання протеїнів в гомогенаті печінки щурів F₀, F₁, F₂ поколінь за вживання традиційної, трансгенної сої необробленої гербіцидом, трансгенної сої обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup (M±m, n=12)

*Примітка. Тут і надалі: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.*

Нами було встановлено, що вживання трансгенної сої обробленої гербіцидом Roundup та гербіциду разом з питною водою призводить до зростання карбонільних похідних у гомогенаті нирків у F₀ поколінні – у 1,7 та 1,6 разу, у F₁ – у 1,9 та 1,8 разу, а у F₂ – 1,8 та 1,9 разу. Вживання традиційної

сої не призводить до збільшення карбонільних похідних у гомогенаті нирків, а вживання трансгенної сої необробленої гербіцидом призводить до зростання карбонільних похідних у 1,4 разу в усіх поколіннях.

Пошкоджуючий вплив вільних радикалів на протеїни реалізується не лише за рахунок взаємодії з NH_2 -, але і SH -групами. Враховуючи це, ми проводили дослідження рівня вільних SH -груп протеїнів у гомогенаті нирок всіх поколінь щурів за вживання традиційної, трансгенної сої обробленої та необробленої гербіцидом, а також за вживання самого гербіциду з питною водою. Нами відмічено зниження вільних сульфгідрильних груп протеїнів за даних умов. Знижений вміст SH -груп протеїнів, який, переважно, зумовлюється їх окисненням вільними радикалами, найбільше спостерігається у IV та в V групі усіх поколінь (рис.3.5.11).

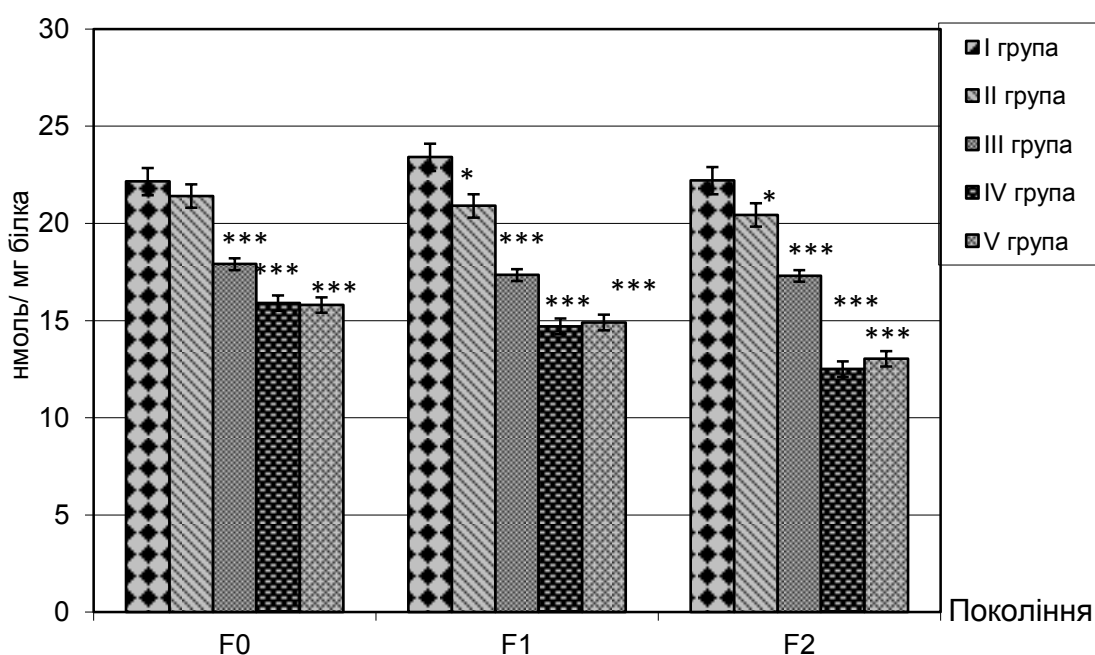


Рис.3.5.11. Вміст протеїнових SH -груп у гомогенаті нирки щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Вміст сульфгідрильних груп змінюється у щурів II групи в F_1 та F_2 поколінні незначно у 1,1 разу ($p \geq 0,05$) з інтактною групою, а у III групі – в 1,2 разу у F_0 поколінні та в 1,3 разу у двох наступних поколіннях. Відмічено значне зниження SH -груп у клітинах щурів IV та V групи – у 1,4 разу в

F₀ поколінні, та у 1,6 разу в наступному поколінні. У F₂ поколінні рівень сульфгідрильних груп знижується у IV та V групі – 1,8 та 1,7 разу.

SH-групи володіють антиоксидантними властивостями, значною реакційною здатністю в окисно-відновних реакціях, тому їх кількість зменшується при оксидативному стресі, який виникає в результаті порушення балансу між продукцією вільних радикалів і механізмами антиоксидантного контролю.

Підвищення окиснювальної модифікації протеїнів в клітинах нирок може призвести до їх фрагментації або до утворення протеїнових агрегатів. Фрагментація протеїнових молекул може відбуватися в результаті безпосередньої дії активних форм кисню або в результаті підвищення їх чутливості до протеолізу [52], тому доцільно було визначити активність протеолітичних ензимів в гомогенаті нирок щурів під час вживання традиційної, генетично модифікованої сої обробленої та необробленої гербіцидом, та вживання самого гербіциду Roundup разом з питною водою.

Аналіз результатів проведених досліджень показав, що вживання трансгенної сої обробленої гербіцидом і самого гербіциду призводить до зниження протеолітичної активності ензимів нирок щурів порівняно з групою інтактних тварин. Імовірно, вживання обробленої гербіцидом трансгенної сої та гербіциду призводить до посилення вільнорадикальних процесів, що може призводити до окиснювальної модифікації і самих ензимів. У F₀ поколінні протеолітична активність ензимів у IV та V групі зменшується у 1,3 та 1,2 разу, у F₁ поколінні – у 1,6 та 1,3 разу, а у F₂ в 1,9 та 1,6 разу, відповідно (рис.3.5.12).

Згодовування шурам IV групи генномодифікованої сої обробленої гербіцидом Roundup призводить до підвищення окисної модифікації протеїнів у трьох поколіннях, саме це може свідчити про те, що гербіцид накопичується у насінні сої та сприяє підвищенню утворення активних форм кисню. Вживання гербіциду разом з питною водою у дозі 0,1 мкг/л також призводить до підвищення ОМП у клітинах нирок. Гербіцид Roundup,

будучи ксенобіотиком, біотрансформується системою цитохрому Р450 у потенційно токсичні метаболіти, які здатні викликати пошкодження клітинних мембран [7, 8].

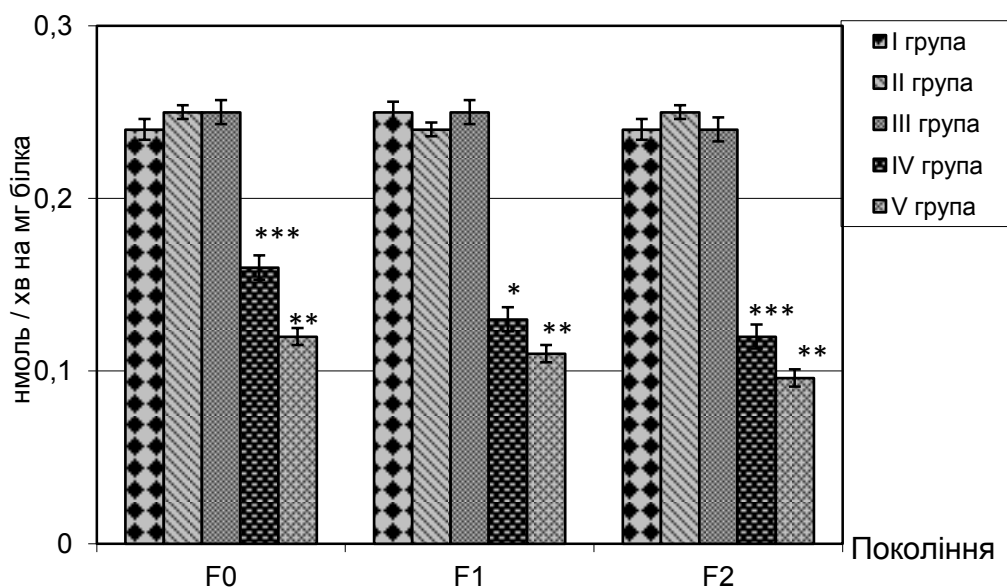


Рис.3.5.12. Протелітична активність ензимів в гомогенаті нирки щурів за вживання традиційної, трансгенної сої необробленої гербіцидом, трансгенної сої обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup ($M \pm m$, $n=12$)

Отже, зниження протеазної активності може бути пов'язано з тим, що вони піддаватися дії вільних радикалів, які виникають в організмі під час різних порушеннях. Вміст сульфгідрильних груп також зменшується у цих групах, що свідчить про вплив вільних радикалів на протеїни за рахунок взаємодії як з NH_2 -, так і SH-групами. Таким чином, отримані результати свідчать, що вживання генномодифікованої сої обробленої гербіцидом та самого гербіциду Roundup разом з питною водою призводить до посилення вільнорадикальних процесів в клітинах нирок тварин та порушення рівноваги про- та антиоксидантної системи у всіх поколіннях щурів.

Внаслідок вивчення гістохімічного забарвлення тканин печінки бромфеноловим синім за Mikel Calvo, можна стверджувати про переважання у печінці щурів IV та V груп кислих протеїнів у поколінні F_0 .

Таблиця 3.5.2.

Ступінь окиснювальної модифікації протеїнів під час використання гістохімічного забарвлення бром феноловим синім на “кислі” та “основні” протеїнів за методом Mikel Calvo за коефіцієнтом R/B (ум. од.) внаслідок гістологічного аналізу зрізів печінки трьох поколінь щурів, ($M \pm m$, $n=12$).

Групи дослідження	Показники			
	Відсоток гепатоцитів у стані зернистої або гідропічної дистрофії	Відсоток гепатоцитів у стані жирової дистрофії	Коефіцієнт R/B при забарвленні бромфеноловим синім за Mikel Calvo в гепатоцитах	Гетерогенність гепатоцитів при забарвленні бромфеноловим синім за Mikel Calvo
F₀ покоління				
I група	3±0,32	0	1,06±0,013	+
II група	2±0,33	0	1,05±0,005	+
III група	4±0,42*	0	1,16±0,009***	-
IV група	5±0,55**	0	1,19±0,009***	-
V група	4±0,34**	0	1,19±0,005***	-
F₁ покоління				
I група	3±0,036	0	1,06±0,007	+
II група	5±0,58**	0	1,19±0,008***	+
III група	8±0,72***	0	1,18±0,007***	-
IV група	19±0,72	0	1,24±0,006***	-
V група	14±0,48***	0	1,22±0,005***	-
F₂ покоління				
I група	3±0,03	0	1,07±0,005	+
II група	4±0,36*	0	1,18±0,01***	+
III група	14±0,48***	0	1,22±0,004***	-
IV група	19±1,03***	0	1,26±0,009***	-
V група	18±0,67***	0	1,28±0,016***	+/-

Примітка: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.

Як видно з таблиці 3.5.2, окиснювальна модифікація протеїнів в клітинах печінки у поколіннях F_1 та F_2 посилюється враховуючи коефіцієнт R/B за вживання трансгенної сої, обробленої гербіцидом та за вживання гербіциду разом з питною водою.

Рисунок з мікрофотографією дає уявлення про те, як забарвлюються структури печінки бромфеноловим синім за методикою Mikel Calvo.

На гістологічних зрізах печінки інтактного щура спостерігається гетерогенність гепатоцитів (світлі та темні гепатоцити), структура органу збережена, а гепатоцити багатогранної форми. У печінці щурів інтактної групи всіх трьох поколінь не спостерігається підвищення ОМП у клітинах.

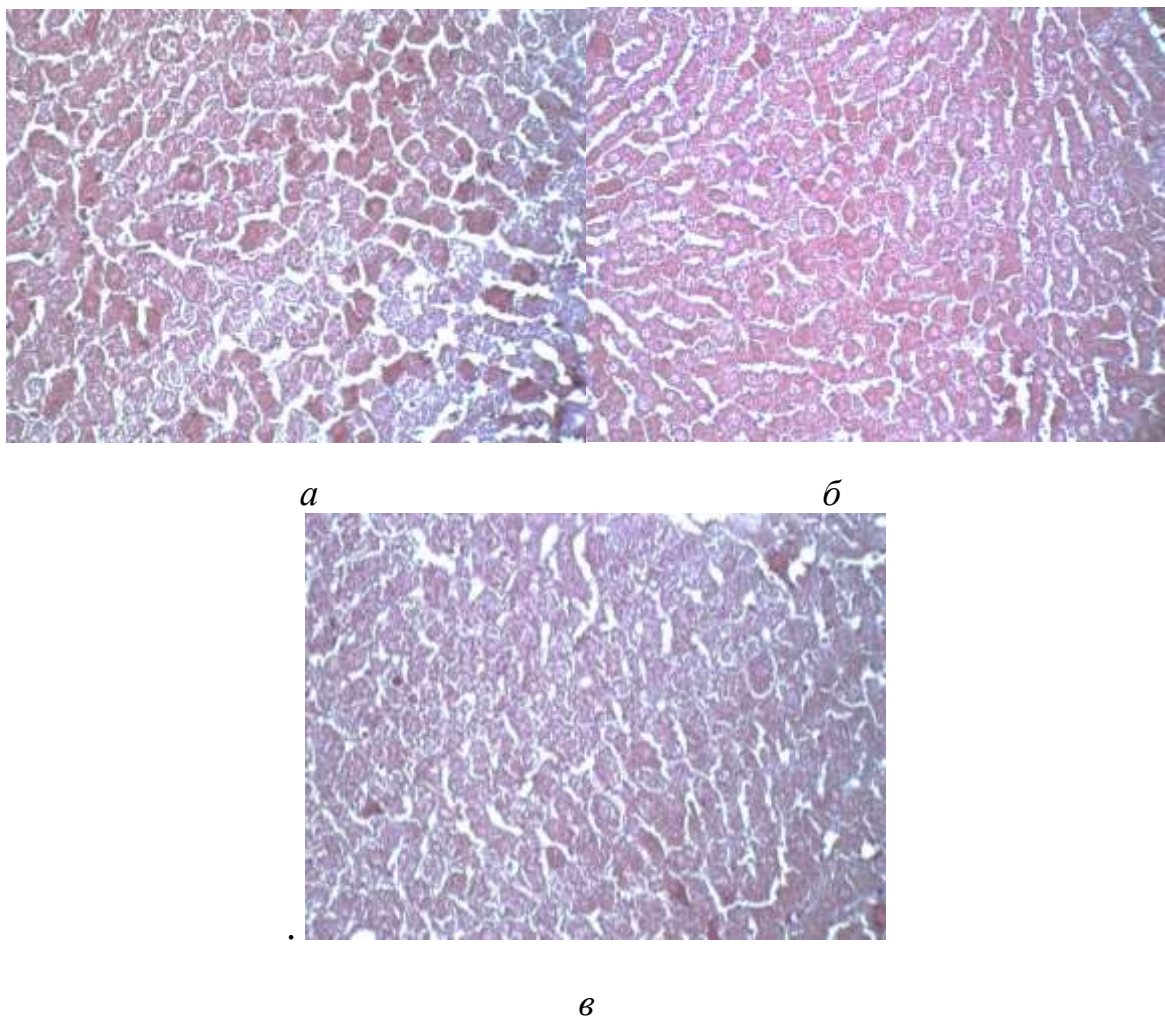


Рис. 3.5.13. Фрагмент печінки інтактного щура покоління F_0 (а) та F_1 (б), F_2 (в) покоління

Примітка: Гістохімічне забарвлення бромфеноловим синім на “кислі” та “основні” протеїни за методом Mikel Calvo. Об. 20х; Ок. 10х.

На мікрофотографіях печінки щурів, які вживали традиційну сою, також чітко виражена гетерогенність гепатоцитів при забарвленні бромфеноловим синім за Mikel Calvo.

Вживання традиційної сої призводить до незначного посилення окисної модифікації протеїнів у F_1 та F_2 поколінні за зростанням показника R/B (рис. 3.5.14).

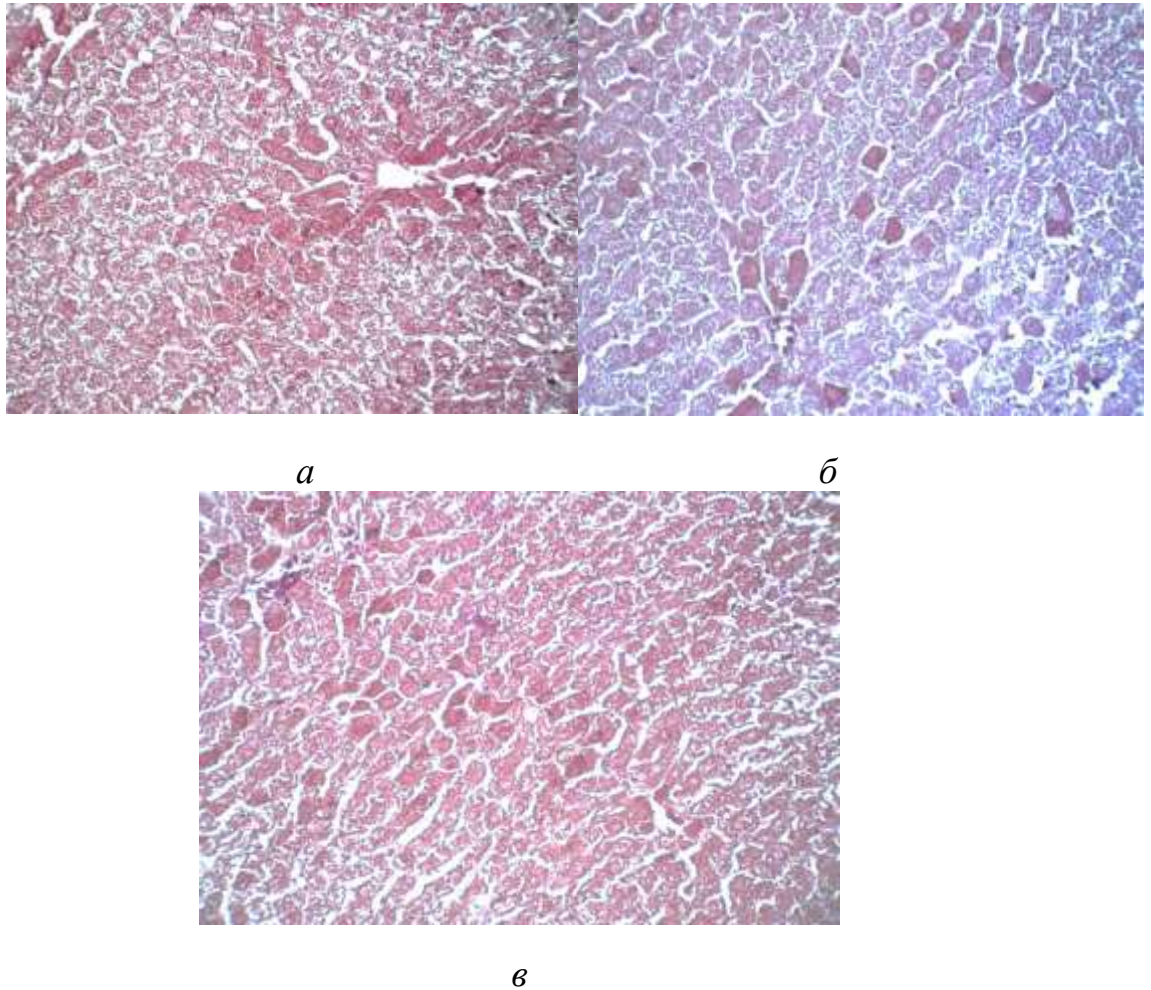


Рис. 3.5.14. Фрагменти печінки щурів, які вживали традиційну сою у F_0 (а) та F_1 (б), F_2 поколінні (в)

Примітка: гістохімічне забарвлення бромфеноловим синім на “кислі” та “основні” протеїни за методом Mikel Calvo. Об. 20х; Ок. 10х.

Вживання генетично модифікованої сої необробленої гербіцидом Roundup призводить до посилення окисної модифікації протеїнів за зростанням показника R/B у двох наступних поколіннях, також у щурів цих

двох поколінь спостерігається морфологічні зміни у печінці щурів, що чітко видно на мікрофотографіях (рис. 3.5.15).

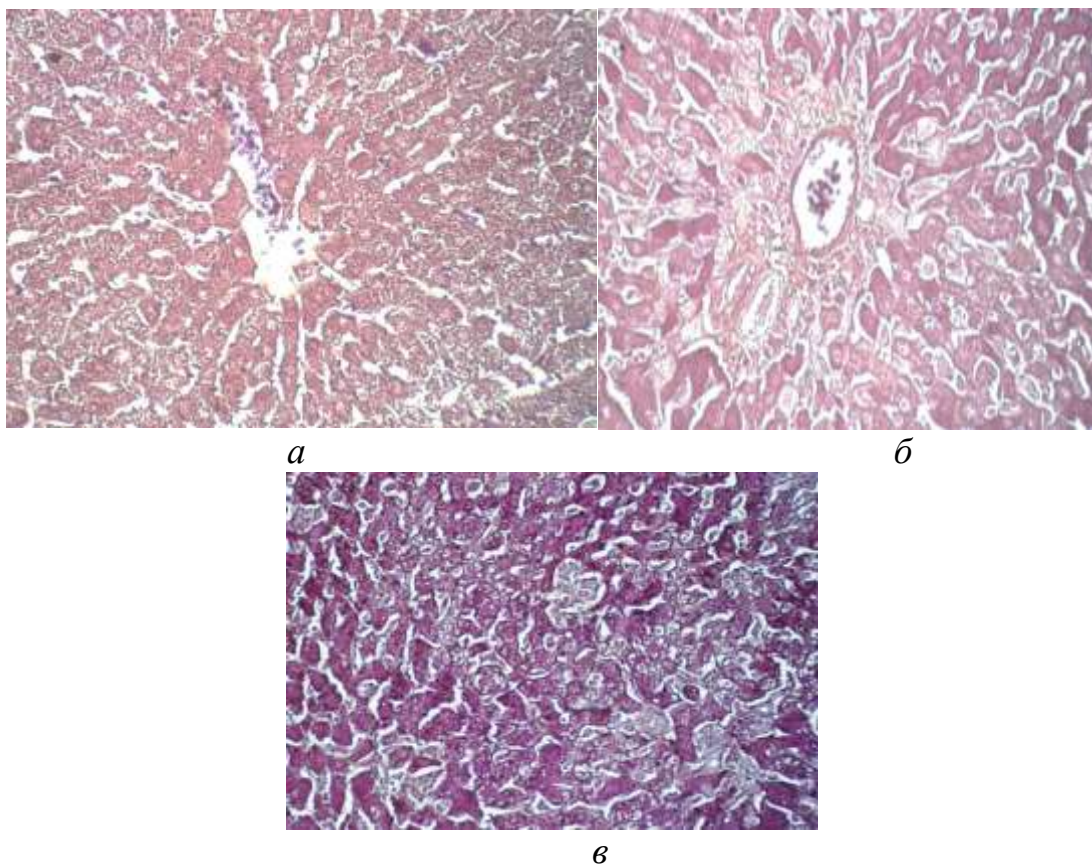
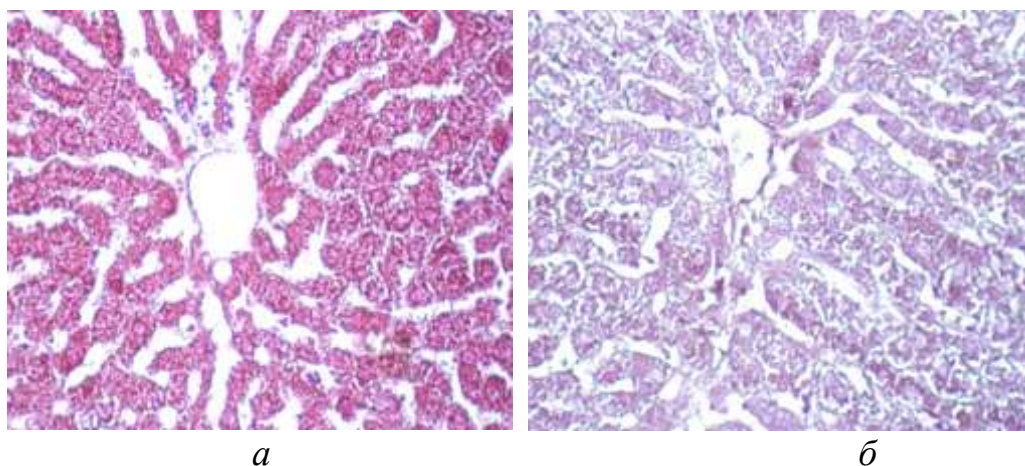
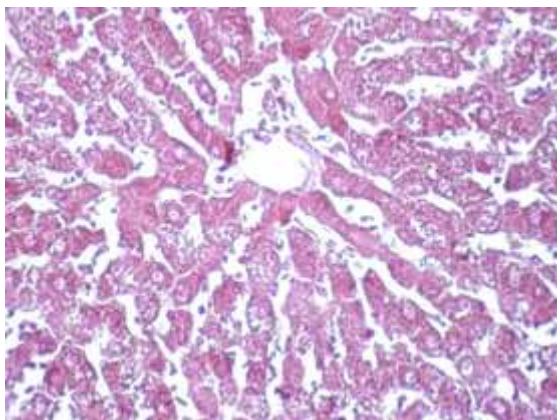


Рис. 3.5.15. Фрагменти печінки щурів, які вживали генетично модифіковану сою необроблену гербіцидом Roundup у F_0 (а) та F_1 (б), F_2 покоління (в)

Примітка: гістохімічне забарвлення бромфеноловим синім на “кислі” та “основні” протеїни за методом Mikel Calvo. Об. 20х; Ок. 10х.





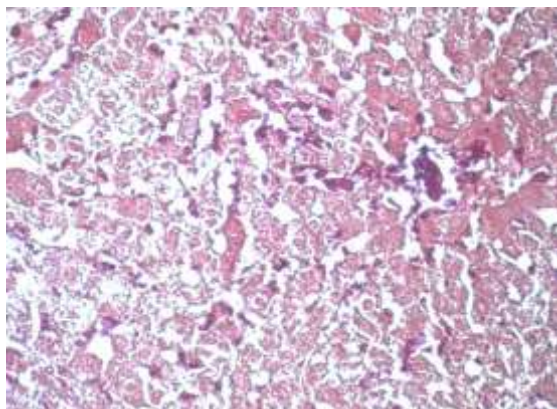
б

Рис. 3.5.16. Фрагменти печінки щурів, які вживали генетично модифіковану сою оброблену гербіцидом Roundup у F₀ (а), F₁ (б) та F₂ покоління (в)

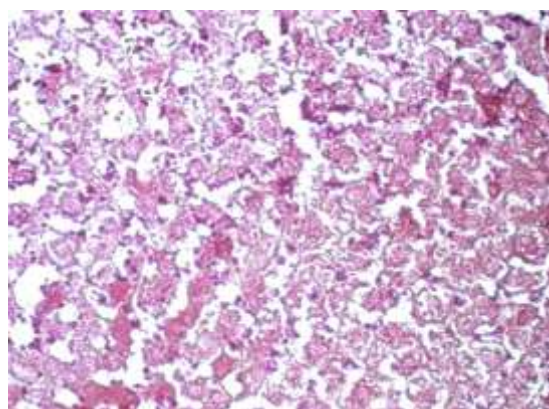
Примітка: гістохімічне забарвлення бромфеноловим синім на “кислі” та “основні” протеїни за методом Mikel Calvo. Об. 20х; Ок. 10х.

Вживання генетично модифікованої сої обробленої гербіцидом Roundup та гербіциду разом з питною водою призводить до посилення окисної модифікації протеїнів за зростанням показника R/B у 1,2 разу в клітинах печінки усіх поколінь щурів при цьому спостерігається збільшення числа гепатоцитів у стані гідропічної дистрофії, про що свідчать мікрофотографії тканини печінки.

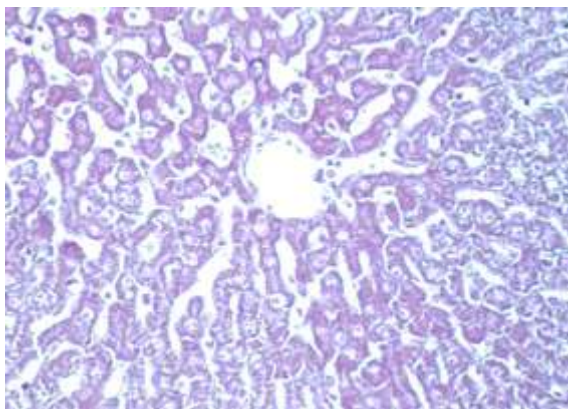
Структурні зміни у клітинах печінки IV групи, як у F₀ покоління, так і F₁ та F₂ покоління щурів, свідчити про накопичення гербіциду в насінні сої. Ймовірно, що гербіцид Roundup здатний порушувати функцію та структуру гепатоцитів, а також призводити до посилення вільнорадикальних процесів.



а



б



б

Рис. 3.5.17. Фрагменти печінки щурів, які вживали гербіцид Roundup разом з питною водою (у дозі 0,1 мкг/л) у F₀ (а), F₁ (б) поколінні та F₂ (в) поколінні

Примітка: гістохімічне забарвлення бромфеноловим синім на “кислі” та “основні” протеїни за методом Mikel Calvo. Об. 20х; Ок. 10х

Отже, вживання гербіциду Roundup разом з питною водою у дозі 0,1 мкг/л призводить до зростання показника R/V, що може свідчити про деструкцію протеїнових структур клітини, яка може відбуватися за рахунок окислення аміногруп та сульфгідрильних груп.

Для перевірки цього припущення було також досліджено, вміст карбонільних похідних та SH-груп.

Ступінь ОМП визначався по вмісту карбонільних похідних у гепатоцитах. Результати проведених досліджень показали, що вживання традиційної сої не призводить до підвищення рівня карбонільних похідних у гомогенаті печінки в усіх поколіннях. При цьому згодовування щурам генетично модифікованої сої необробленої гербіцидом призводить до незначного зростання у 1,2 разу у F₂ поколінні їх рівня, у субклітинних фракціях печінки у F₀ не змінюється, а у F₁ поколінні рівень карбонільних похідних у гомогенаті печінки знижується.

Вживання генетично модифікованої сої обробленої гербіцидом та гербіциду разом з питною водою призводить до підвищення окиснювальної модифікації протеїнів у всіх поколіннях. Збільшення кількості протеїнових карбонільних похідних, як у батьківському, так і в наступних поколіннях може бути зумовлено загальним посиленням вільнорадикальних процесів в

організмі внаслідок інтенсивної генерації активних форм кисню. Так, вміст карбонільних похідних у F_0 поколінні збільшується у 1,4 рази в IV групі та у 1,5 рази в V групі порівняно з інтактною групою.

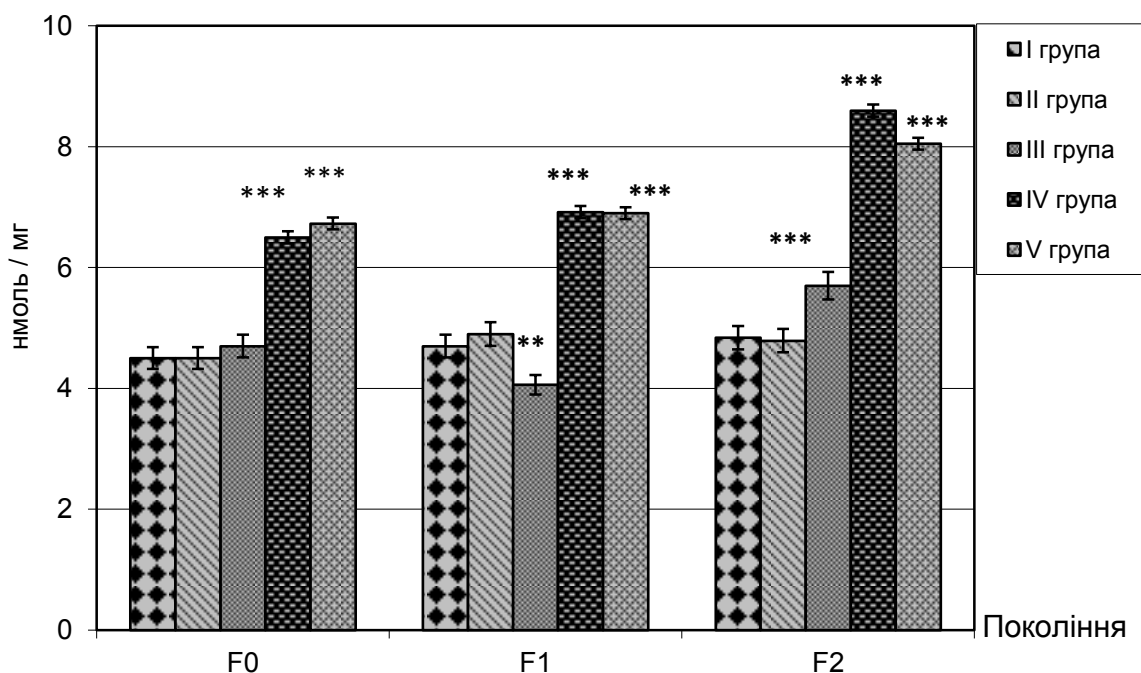


Рис.3.5.18. Вміст карбонільних похідних протеїнів гомогенаті печінки щурів поколінь ($M \pm m$, $n=12$)

Примітка. Тут і надалі: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.

У F_1 поколінні кількості протеїнових карбонільних похідних збільшується у 1,5 разу у IV групі та V групі. Посилення процесів ОМП спостерігається у F_2 поколінні та в IV групі – у 1,8 разу та в V групі – у 1,7 разу порівняно з інтактною групою (рис.3.5.18).

Пошкоджуючий вплив вільних радикалів на протеїни реалізується не лише за рахунок взаємодії з NH_2 -, але і SH-групами. Враховуючи це, ми проводили дослідження рівня вільних SH-груп протеїнів у гомогенаті печінки усіх поколінь щурів за вживання традиційної, трансгенної сої обробленої та необробленої гербіцидом, а також за вживання самого гербіциду з питною водою. Нами відмічено зниження вільних сульфгідрильних груп протеїнів за даних умов. Знижений вміст SH-груп протеїнів, який, переважно,

зумовлюється їх окисненням вільними радикалами, спостерігається у IV та в V групі усіх поколінь (рис.3.5.19).

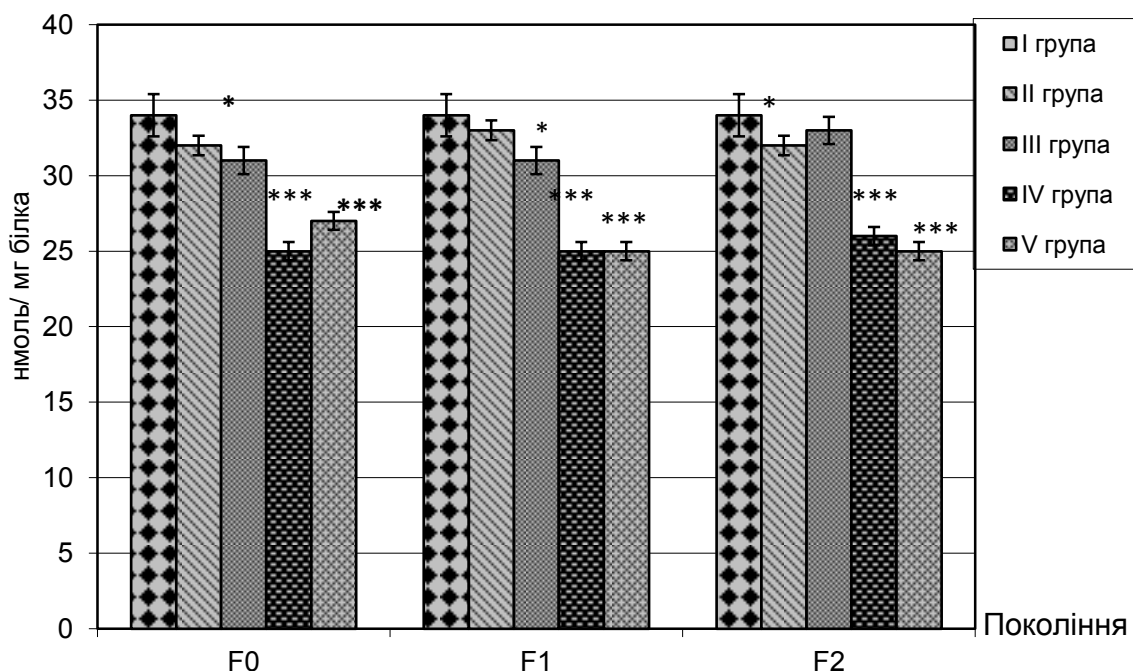


Рис.3.5.19. Вміст протеїнових SH-груп у гомогенаті печінки щурів за вживання традиційної, трансгенної сої необробленої та обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup ($M \pm m$, $n=12$)

Так, вміст сульфгідрильних груп не змінюється у щурів II та III групи всіх поколінь порівняно з інтактною групою. При цьому відмічено зниження SH-груп у гепатоцитах щурів IV та V групи – у 1,4 та 1,3 разу в батьківському поколінні, та у 1,4 разу – у F₁ поколінні. У F₂ поколінні рівень сульфгідрильних груп знижується у IV та V групі – у 1,3 та 1,4 разу відповідно. SH-групи володіють антиоксидантними властивостями, значною реакційною здатністю в окисно-відновних реакціях, тому їх кількість зменшується при оксидативному стресі, який виникає в результаті порушення балансу між продукцією вільних радикалів і механізмами антиоксидантного контролю.

Окиснені протеїни легко піддаються дії протеаз, тому ми визначали протеолітичну активність ензимів у гомогенаті печінки всіх трьох поколінь щурів.

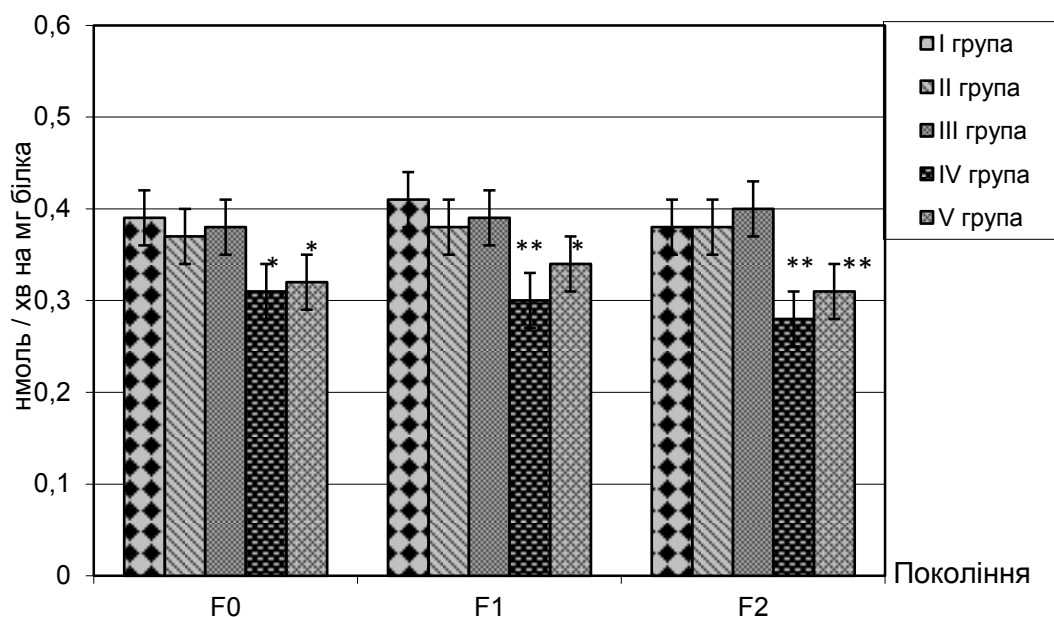


Рис.3.5.20. Протеазна активність ензимів в гомогенаті печінки щурів за вживання традиційної, трансгенної сої необробленої та обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup ($M \pm m$, $n=12$)

Аналіз результатів проведених досліджень показав, що вживання традиційної сої та генномодифікованої сої необробленої гербіцидом (II та III група) не призводить до підвищення протеолітичної активності ензимів у F_0 та F_1 поколінні. Вживання трансгенної сої обробленої гербіцидом (IV група) усіх поколінь призводить до зниження протеолітичної активності ензимів печінки щурів – у 1,3 (F_0 поколінні) та 1,4 разу (F_1 та F_2) порівняно з показниками інтактної групи щурів (рис.3.6.20). Що, імовірно, пов'язано з інактивацією протеаз вільними радикалами. Така ж картина спостерігається і у щурів V групи, у яких протеолітична активність ензимів знижується у 1,2 разу в усіх поколіннях.

Окиснення протеїнів під дією активних форм кисню з утворенням карбонільних похідних є однією з адаптаційних систем і стимулює активацію протеолітичних ензимів на перших етапах, що вибірково руйнують окиснені протеїни. При цьому модифікації піддаються і самі протеази внаслідок надмірного утворення активних форм кисню за оксидативного стресу, саме тому їх активність в наступних поколіннях знижується.

Отже, підвищення ОМП за вживання генетично модифікованої сої обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup разом з питною водою у гомогенаті печінці всіх поколінь за коефіцієнтом R/V та біохімічними даними є результатом порушення рівноваги між процесами, що регулюють синтез та окисдацію протеїнів, та зменшення активності протеаз, які селективно розщеплюють окиснювальні форми протеїнів. Вміст сульфгідрильних груп також зменшується в гепатоцитах у цих групах, що свідчить про вплив вільних радикалів на протеїни за рахунок взаємодії як з NH_2 -, так і SH-групами. Таким чином, отримані результати свідчать про те, що вживання генномодифікованої сої обробленої гербіцидом та самого гербіциду Roundup разом з питною водою призводить до посилення вільнорадикальних процесів в клітинах печінки тварин та порушення рівноваги про- та антиоксидантної системи у всіх поколіннях щурів [24].

3.6. Вплив генетично модифікованої сої та гербіциду Roundup на ензимну активність антиоксидантного захисту

Головна роль в антиоксидантному захисті клітин відводиться супероксиддисмутази, яка, дисмутуючи супероксидний аніон-радикал, перетворює його в менш реакційноспроможний пероксид гідрогену. СОД безпосередньо забезпечує обрив вільнорадикальних реакцій у клітинах аеробних організмів на так званій «нульовій» стадії вільнорадикального окислення [8, 12]. Відомо, що активність антиоксидантних ензимів за умов довготривалого вживання ксенобіотиків може знижуватися [8, 12], як у крові так і в органах, що свідчить про виснаження антиоксидантної системи.

Дані наших досліджень свідчать про вірогідне зниження СОД активності при довготривалому згодовуванні трансгенної сої та гербіциду Roundup усіх трьох поколіннях щурів. СОД активність знижується у IV та V групах в 2 та 2,5 разу у нирках щурів батьківського покоління, при цьому його ензимна активність не змінюється у II та III групах порівняно з контрольною групою (рис. 3.6.1).

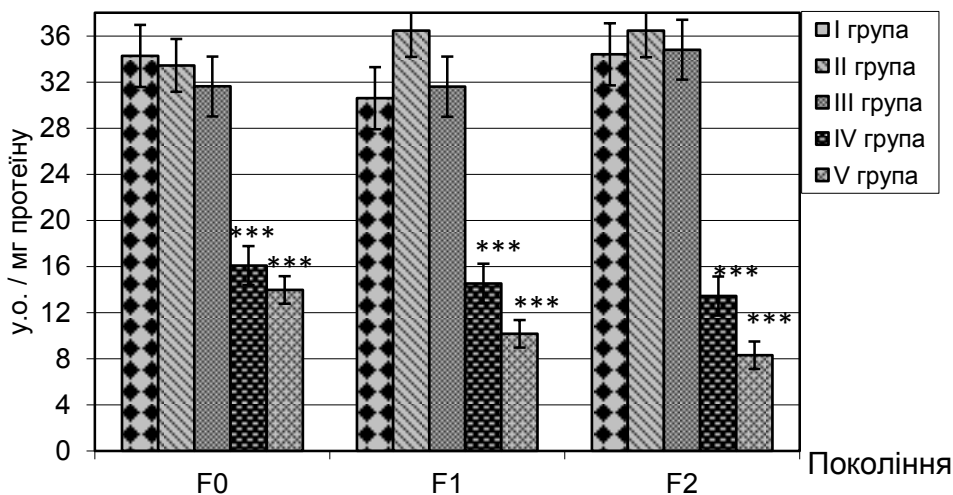


Рис.3.6.1. Супероксиддисмутазна активність в гомогенаті нирок щурів ($M \pm m$, $n=12$).

*Примітка. Тут і на далі. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.*

У F_0 та F_1 покоління також знижується СОД активність у IV та V групах: у 2 та 3 рази у F_0 і у 2,6 та 4 рази у F_1 покоління, відповідно.

У гомогенаті печінки щурів також відмічено зниження СОД активності усіх поколінь у цих же дослідних групах. У F_0 покоління його ензимна активність у IV та V групах вірогідно знизилася у 2 та 2,4 разу, у F_1 покоління у 3 рази, а у F_2 у 4 та 5 рази, при цьому незначне зниження СОД активності спостерігається і у III групі F_0 покоління – 1,4 разу, а у F_1 та F_2 – 1,2 разу (рис. 3.6.2).

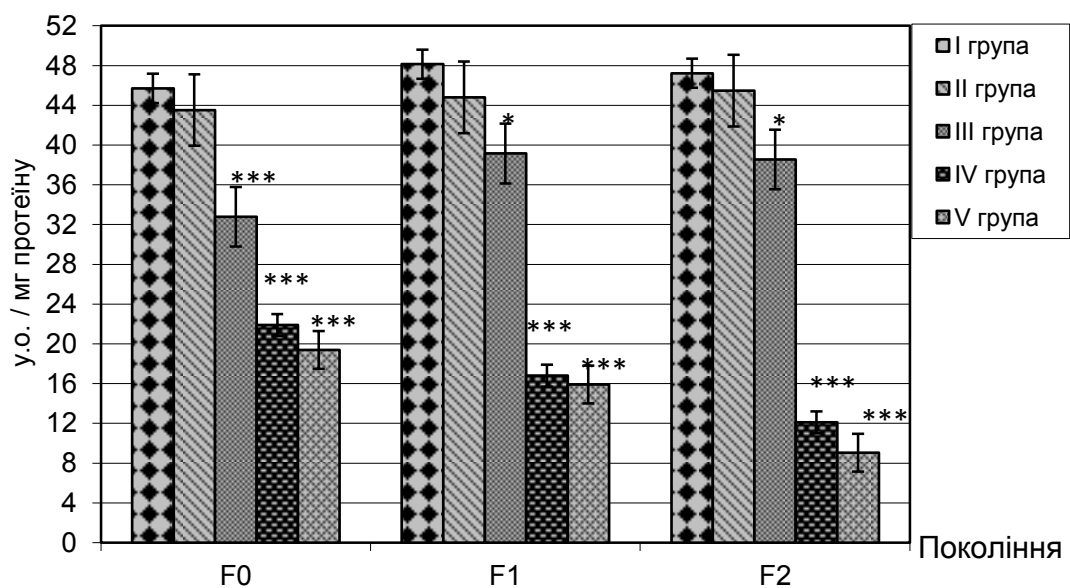


Рис.3.6.2. Супероксиддисмутазна активність в гомогенаті печінки щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Визначалася також супероксиддисмутазна активність і в крові щурів, так у F_0 покоління у IV та V групах ензимна активність знижується у 2,5 та 3,6 разу, у F_1 покоління у 2,6 та 3,4 разу, а у F_2 у 3,2 та 4 рази (рис. 3.6.3). У порівнянні з показниками СОД активності у крові тварин III групи виявлено також зниження активності цього ензиму в 1,2 разу (покоління F_0), у 1,3 та 1,35 разу (покоління F_1 та F_2).

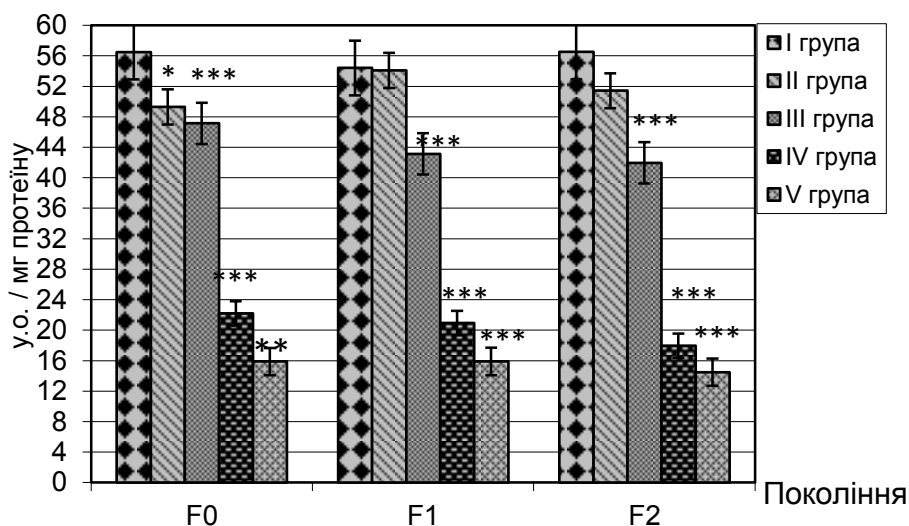


Рис.3.6.3. Супероксиддисмутазна активність в крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

Каталазна активність в гомогенаті нирок щурів у III, IV та V групах зростала у 1,2, 1,4 та 1,6 разу (покоління F_0). Спостерігалось вірогідне зростання КТ активності у тварин F_1 покоління у III, IV та V груп, відповідно в 1,2, 1,4 і 1,5 разу у порівнянні з показниками контрольної групи. У нирках тварин F_2 покоління у цих дослідних групах спостерігалось зростання ензимної активності в 1,2, 1,5 і 1,6 разу у порівнянні з показниками I групи (рис. 3.6.4).

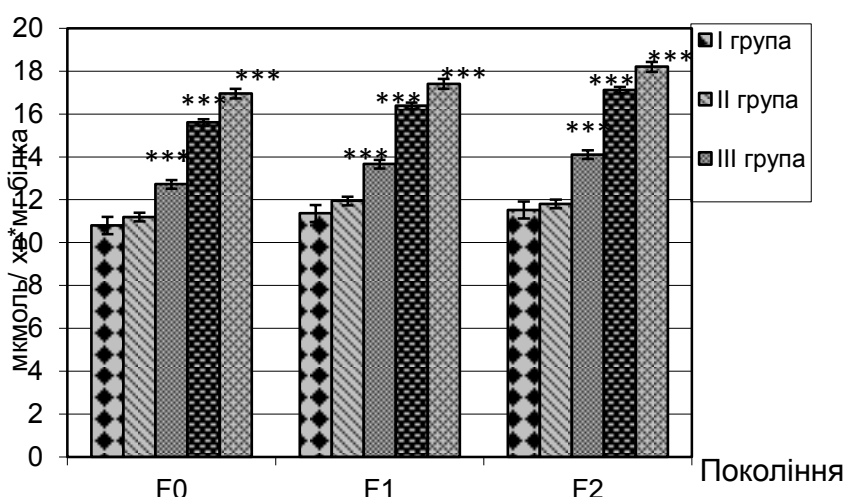


Рис. 3.6.4. Каталазна активність в гомогенаті нирок ($M \pm m$, $n=12$)

У печінці виявлено вірогідне зростання КТ активності лише в IV та V групі в 1,2 та 1,3 разу у порівнянні з показниками тварин I групи (покоління

F₀). Каталазна активність цього ензиму в наступних поколіннях також зростає у 1,2 та 1,3 разу (покоління F₁), а також у 1,3 та 1,4 разу порівняно з контролем (покоління F₂).

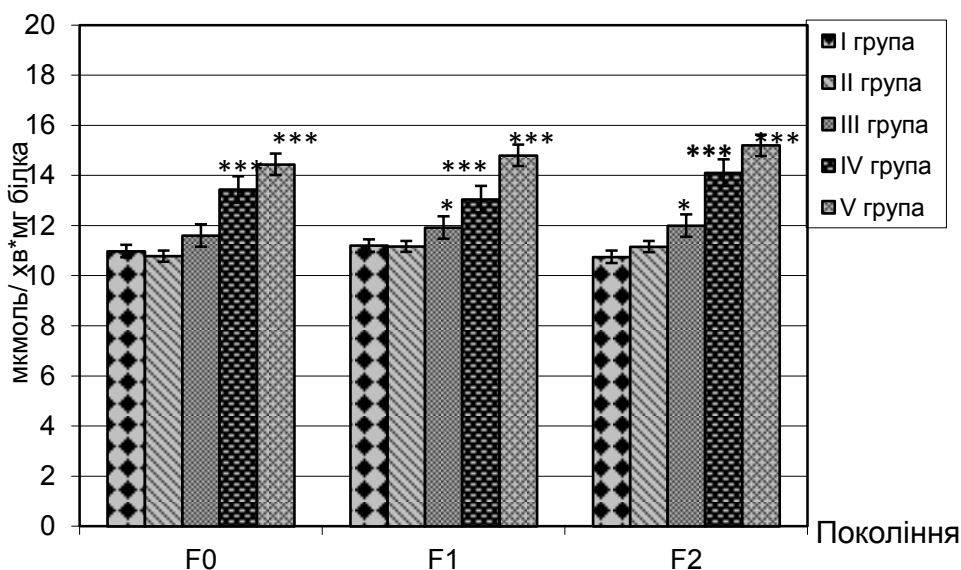


Рис.3.6.5. Каталазна активність в гомогенаті печінки щурів за вживання традиційної, трансгенної сої не обробленої та обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup ($M \pm m$, $n=12$)

У крові щурів покоління F₀ КТ активність також зростає в IV та V групі в 1,3 та 1,5 разу; зростає у 1,4 та 1,5 разу (покоління F₁), а також у 1,5 та 1,6 разу порівняно з контролем (покоління F₂) (рис. 3.6.6).

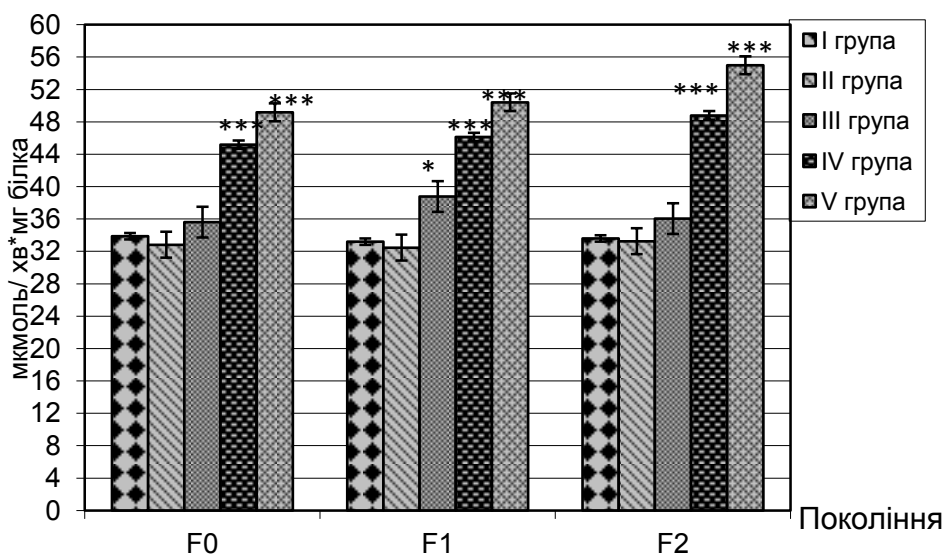


Рис. 3.6.6. Активність каталази в крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

У III групі каталазна активність зростає у 1,2 разу в поколінні F_1 та F_2 порівняно з контрольною групою, а у F_1 зростає у 1,1 разу ($p \geq 0,05$) порівняно з контролем

Функціонування різних компонентів АОС тісно пов'язане з окремими ланками клітинного метаболізму. Глутатіоновий метаболізм є одним з найважливіших антиоксидантних захисних механізмів. Глутатіонпероксидаза (ГП) належить до основних антиоксидантних ензимів, які відіграють важливу роль у захисті від пошкодження клітин і тканин активними формами кисню. Кінцевим продуктом цієї реакції є глутатіон дисульфід (GSSG). У клітинах відновлений глутатіон регенерується з окисненого глутатіону в результаті реакції, що каталізується глутатіонредуктазою (ГР).

Проведені дослідження дали змогу простежити основну динаміку змін показників глутатінової ланки антиоксидантної системи в гомогенатах нирок і печінки, а також у крові щурів при зазначених раціонах. Визначався також вміст відновленого глутатіону в гомогенаті нирок щурів у IV та V групі, результати дослідження показали зниження концентрації GSH в 1,2 разу в порівнянні з показниками тварин I групи (покоління F_0). У наступних поколіннях вміст відновленого глутатіону також знижується у 1,2 та 1,3 разу (покоління F_1), а також у 1,3 та 1,35 разу порівняно з контролем (покоління F_2).

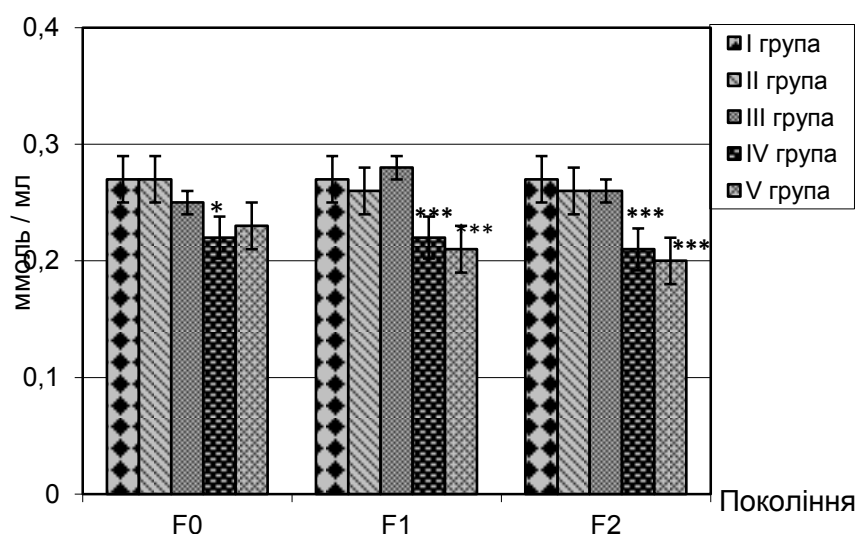


Рис.3.6.7. Вміст відновленого глутатіону в гомогенаті нирок ($M \pm m$, $n=12$)

У гомогенаті печінки спостерігається також зниження концентрації GSH у IV та V групі в 1,3 разу у батьківському поколінні, у наступних (F_1 та F_2 покоління) – у 1,6 та 1,8 разу порівняно з контрольною групою, при цьому як видно достовірної різниці між цими двома групами не виявлено (рис.3.6.8.).

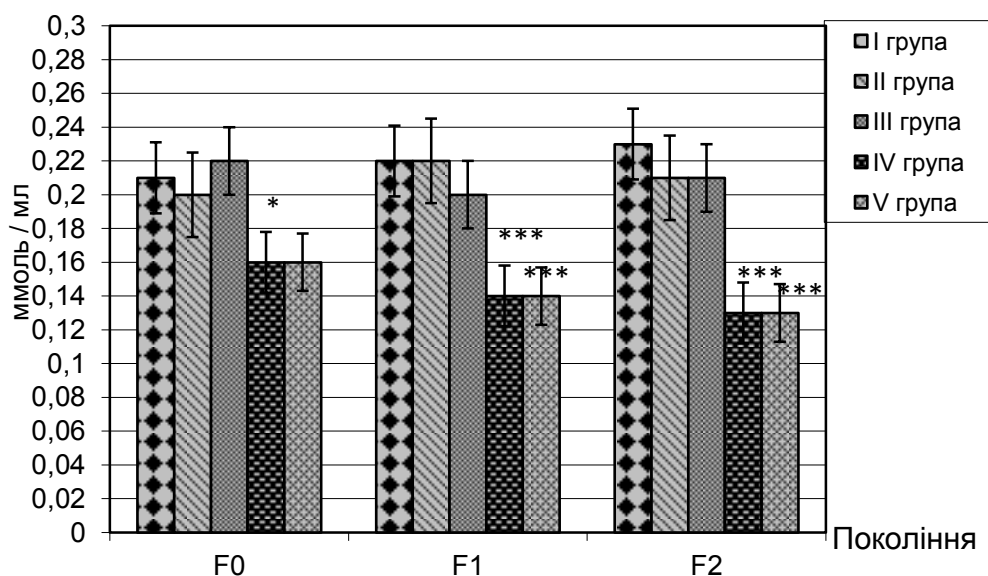


Рис.3.6.8. Вміст відновленого глутатіону в гомогенаті печінки ($M \pm m$, $n=12$)

Найбільше зниження вміст відновленого глутатіону спостерігається у крові щурів IV та V групи: у 1,4 та 1,45 разу (покоління F_0); у 1,6 та 1,7 разу (покоління F_1); у 1,8 та 1,9 разу (покоління F_2) (рис.3.6.9.).

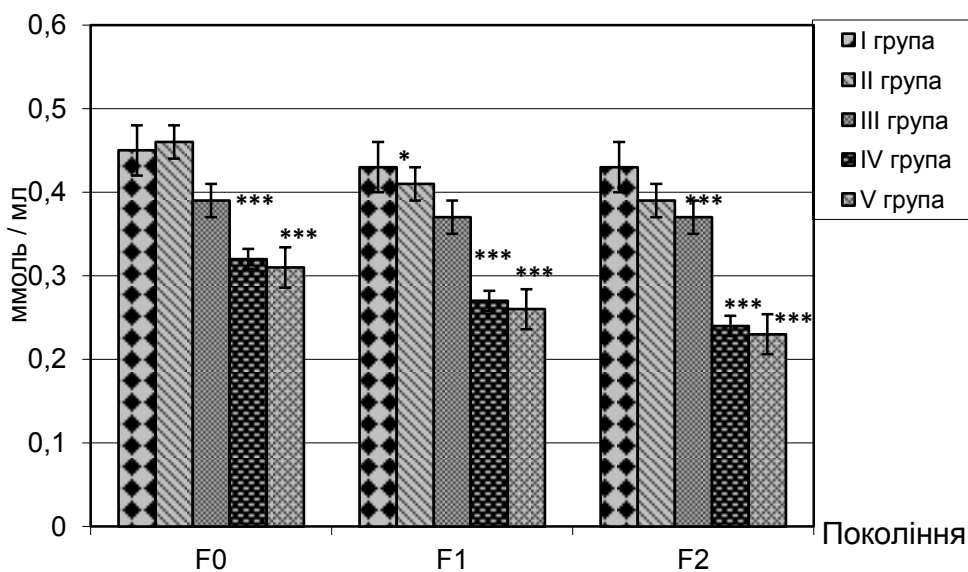


Рис.3.6.9. Вміст відновленого глутатіону в крові щурів ($M \pm m$, $n=12$)

У III групі вміст відновленого глутатіону у крові в трьох поколіннях змінюється незначно у 1,16 разу.

Глутатіонпероксидаза, являється ключовим ензимом антиоксидантної системи в організмі тварин, саме тому визначення її ензимної активності може показати стан антиоксидантної системи щурів. Так, у III групі спостерігалось зниження ензимної активності відносно контрольної групи в тканині нирок у 1,5 (покоління F_0), 1,4 (покоління F_1) та 1,3 разу (покоління F_2). Глутатіонпероксидазна активність найбільше знижується у IV та V групи: у 2 та 4 рази (покоління F_0), 2 та 4,6 рази (покоління F_1) та 2,5 та 4,5 рази (покоління F_2) порівняно з контролем.

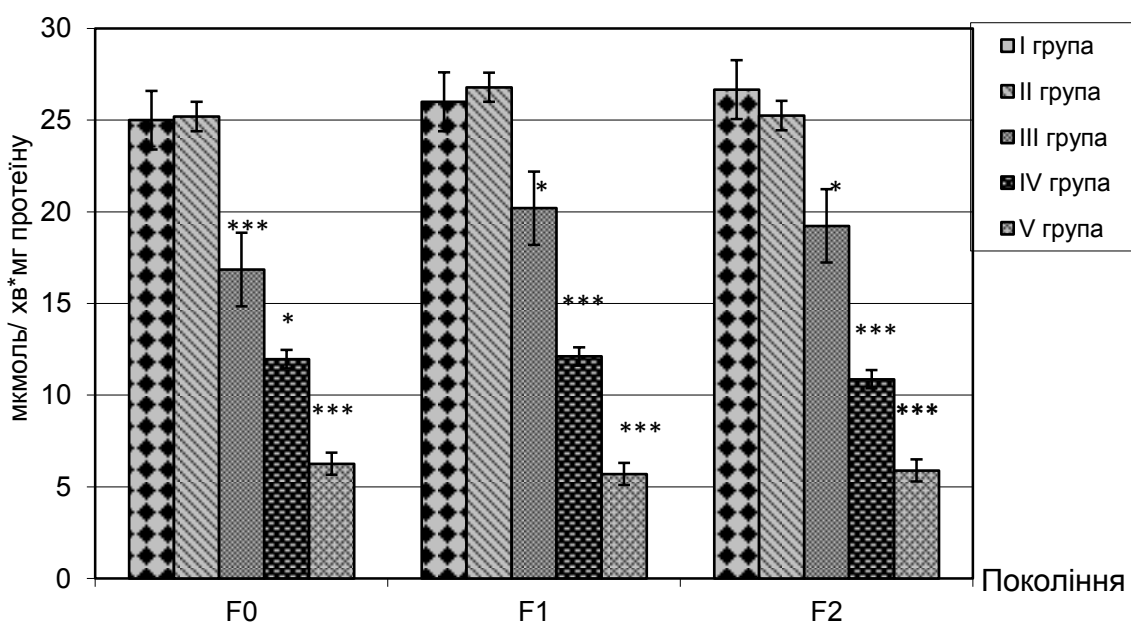


Рис.3.6.10. Глутатіонпероксидазна активність в гомогенаті нирок щурів за вживання традиційної, трансгенної сої необробленої та обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup ($M \pm m$, $n=12$)

У гомогенаті печінки ГП активність також знижується у цих дослідних групах: 1,8 та 2,3 разу в F_1 поколінні; у 2 та 2,2 разу у F_1 поколінні; у 2 та 2,6 разу у F_2 поколінні (рис.3.6.11.).

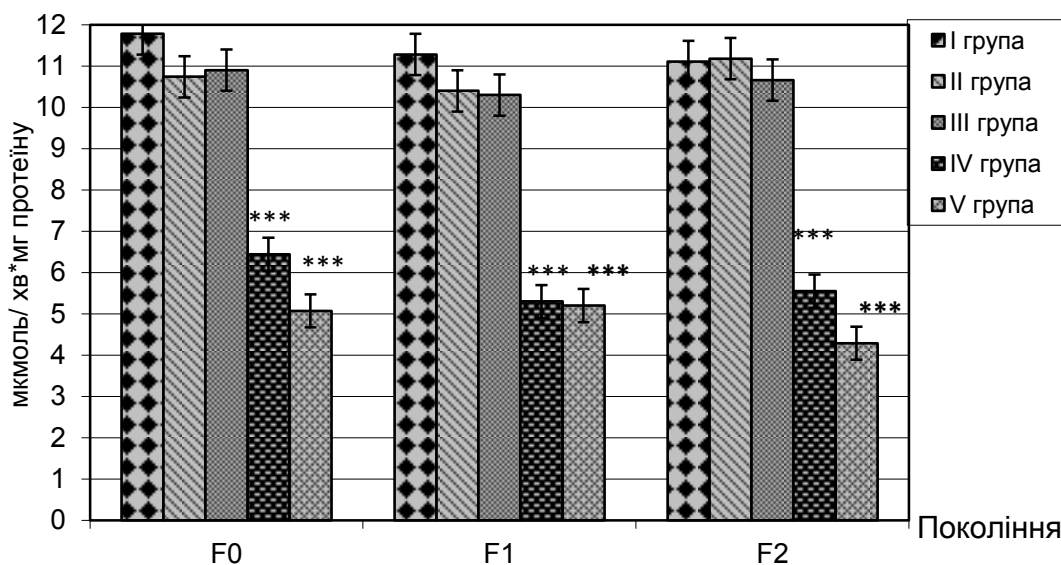


Рис.3.6.11. Глутатіонпероксидазна активність в гомогенаті печінки щурів за вживання традиційної, трансгенної сої не обробленої та обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup ($M \pm m$, $n=12$)

У крові ГП активність також знижується у IV та V групах у всіх поколіннях щурів: у F_0 поколінні у 1,6 та 1,9 разу; у F_1 у 1,8 та 2 разу; у F_2 у 1,8 та 2,4 разу (рис.3.6.12).

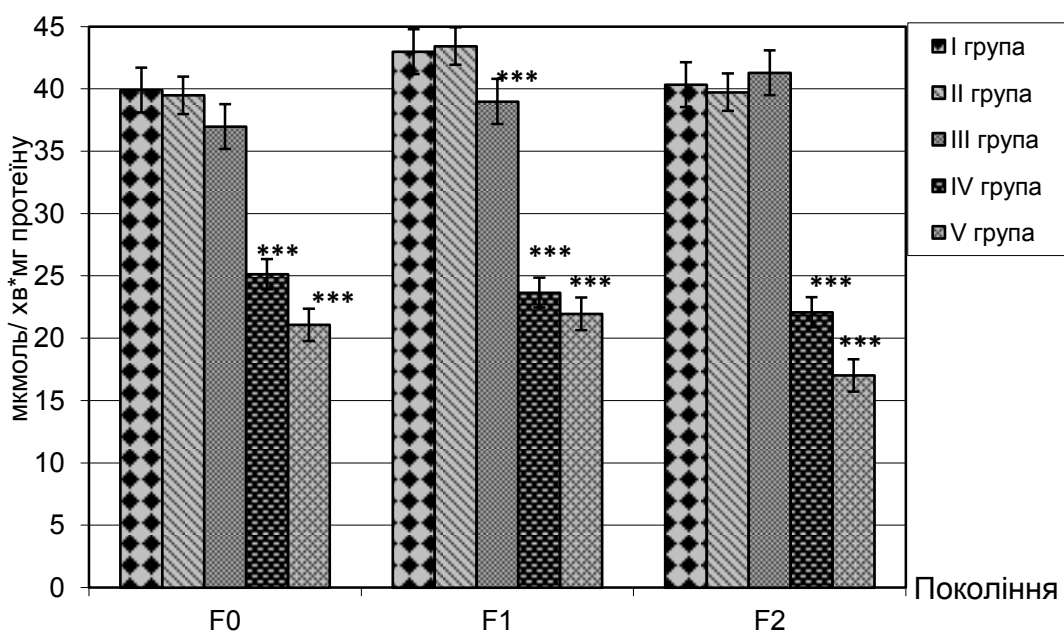


Рис.3.6.12. Глутатіонпероксидазна активність в крові щурів за вживання традиційної, трансгенної сої необробленої та обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup ($M \pm m$, $n=12$)

Глутатіонтрансферази (КФ 2.5.1.18) є важливими ензими другої фази системи детоксикації. Глутатіонтрансфераза (GST) являється антиоксидантним ферментом, який каталізує зв'язування великої різноманітності електрофілів на сульфгідрильні групи відновленого глутатіону.

У тканинах людини та більшості видів тварин виявлені множинні форми глутатіонтрансфераз. За гомологією нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, специфічністю до субстратів та інгібіторів і за імунологічними властивостями було розроблено єдину для усіх організмів класифікацію ГТ [84]. На сьогоднішній день у людини нараховують шістнадцять представників цитозольних ГТ і п'ять мікросомних, кожна з яких кодується окремим геном. Саме тому є дуже важливим дослідити зміни глутатіонтрансферазної активності у нирках, печінці та крові щурів.

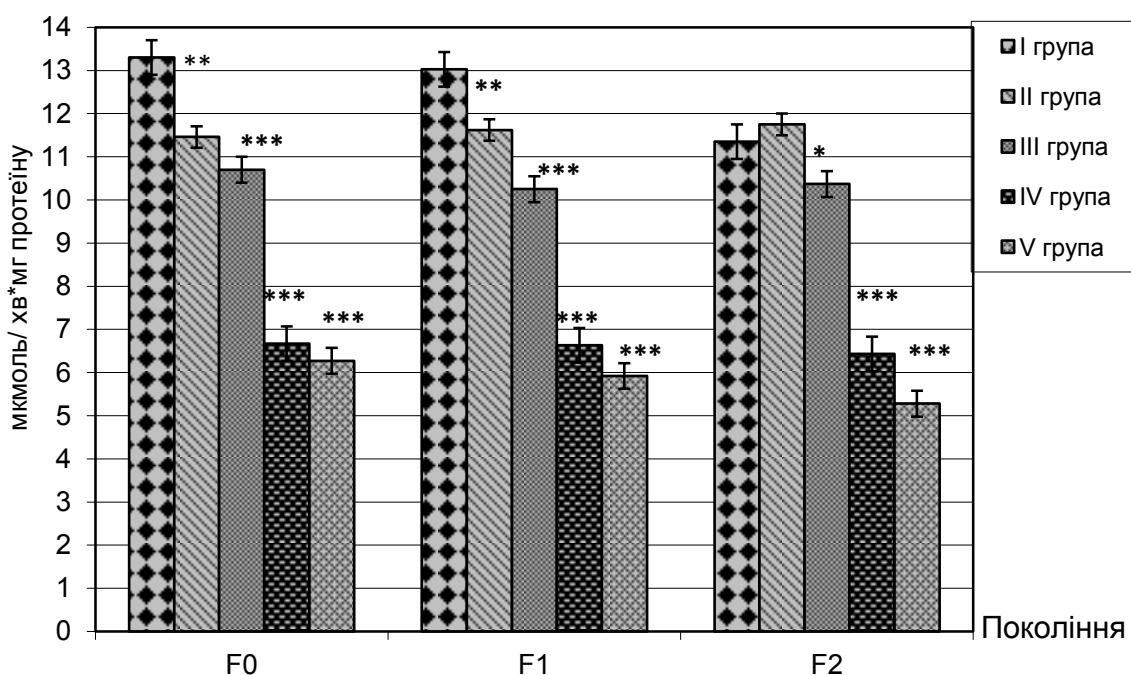


Рис. 3.6.13 Глутатіонтрансферазна активність в гомогенаті нирок щурів за вживання традиційної, трансгенної сої необробленої та обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup ($M \pm m$, $n=12$)

Глутатіонтрансферазна активність найбільше знижується у IV та V групи: у 2 рази (покоління F_0), 2 та 2,2 разу (покоління F_1) та 1,8 та 2,1 разу (покоління F_2) порівняно з контролем.

У гомогенаті печінки ГТ активність знижується у цих дослідних групах: 1,4 та 1,6 разу у F_0 поколінні; у 1,6 та 1,8 разу у F_1 поколінні; у 1,4 та 1,6 разу в F_2 поколінні.

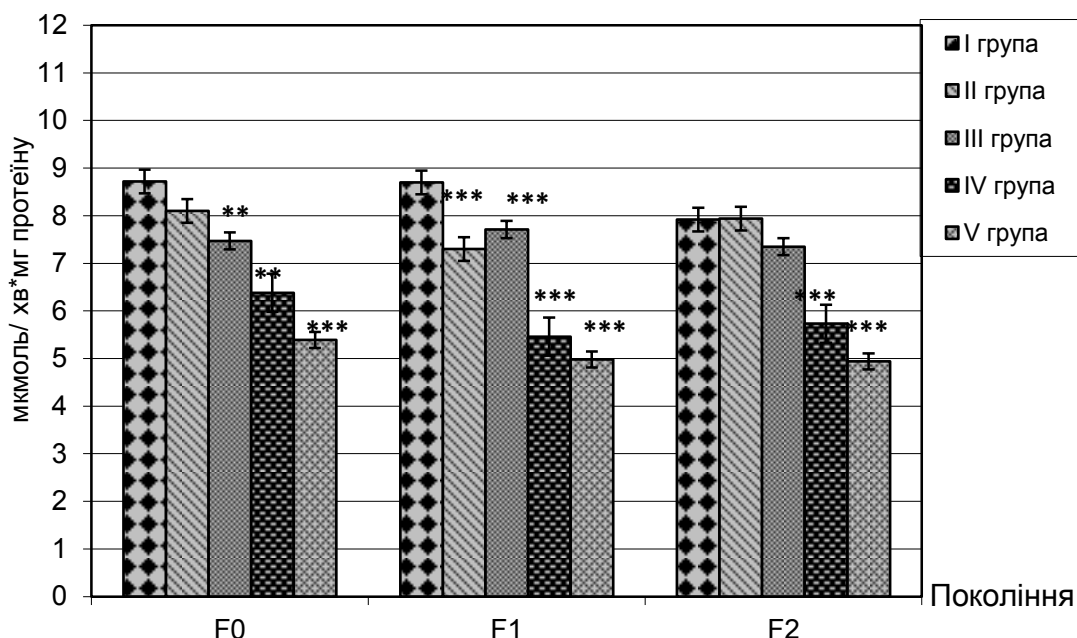


Рис. 3.6.14 Глутатіонтрансферазна активність в гомогенаті печінки щурів за вживання традиційної, трансгенної сої необробленої та обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup ($M \pm m$, $n=12$)

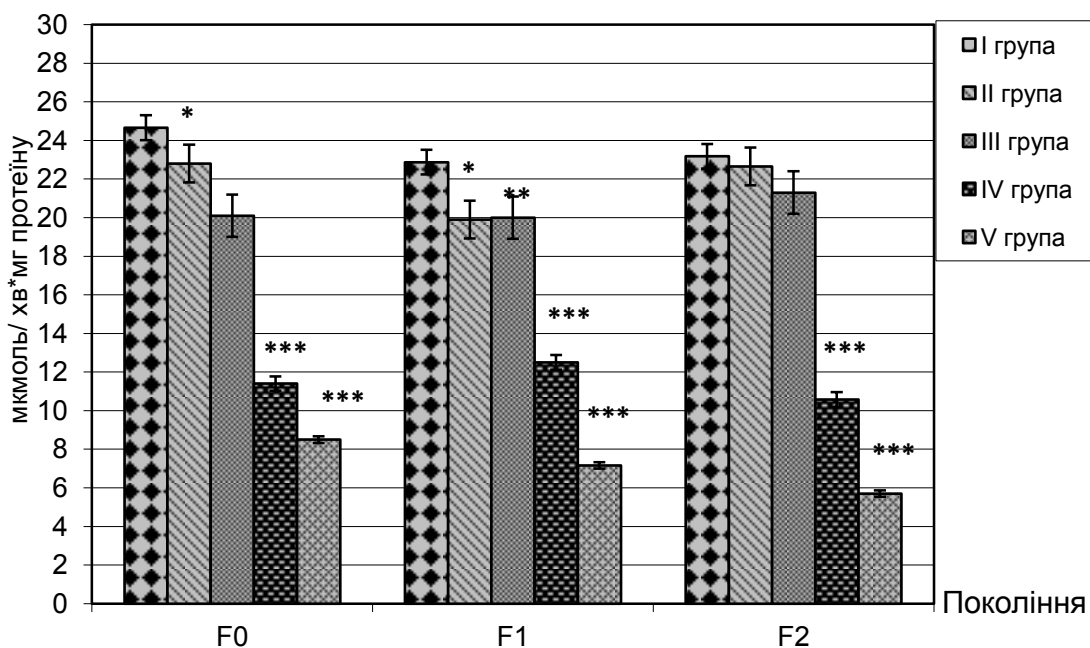


Рис.3.6.15. Активність глутатіотрансферази в крові щурів за вживання традиційної, трансгенної сої необробленої та обробленої гербіцидом та гербіциду Roundup ($M \pm m$, $n=12$)

У крові ГТ активність також знижується у IV та V групах у всіх трьох поколіннях щурів: у F_0 покоління у 2,2 та 2,9 разу; у F_1 у 1,8 та 3,2 разу; у F_2 у 2,2 та 4 рази.

Отже, підвищення каталазної активності у нирках, печінці та крові щурів трьох поколінь свідчить про утворення активних форм кисню в організмі. При цьому зниження ензимної активності антиоксидантів: супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази та відновленого глутатіону свідчить про виснаження антиоксидантної системи внаслідок довготривалого вживання гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої і гербіциду Roundup, а також про порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та накопичення вільних радикалів у тканинах, що призводить до окиснення біомолекул та порушення будови клітин нирок та печінки.

3.7. Постнатальний розвиток і масометричні показники щурів, яким згодовували гліфосат-резистентну сою оброблену гербіцидом Roundup

Постнатальний розвиток щурів досліджувався на двох поколіннях щурів. У віці 12 місяців щурів забивали, від кожної тварини відбирали внутрішні органи для масометричних досліджень. Постнатальний розвиток приплоду оцінювали за кількістю живих та мертвонароджених щуренят та їх масою, а також здатністю до виживання у перші два місяці життя.

Кількість приплоду в контрольній групі коливалася в межах фізіологічної норми і серед новонароджених не було виявлено мертвих щурів. У дослідних групах смерть щурят наступала в перші 5 діб життя, що свідчить про порушення пренатального і постнатального розвитку.

Таблиця 3.7.1.

Кількість та життєздатність приплоду самок щурів другого покоління, до раціону яких додавали боби з нативної, трансгенної сої необробленої, трансгенної сої обробленої гербіцидом, та яким давали в питну воду гербіцид (0,1 мкг/л) ($M \pm m$, $n=7$).

Група	Кількість приплоду у гнізді в перший день після народження, голів	Життєздатність приплоду		
		Кількість приплоду в групі, голів	Кількість приплоду, що загинула	Живі від народження у двомісячному віці, %
I	$9,8 \pm 0,33$	59	5	91,5%
II	$9,7 \pm 0,21$	58	5	91,4%
III	$9,8 \pm 0,32$	59	5	91,5%
IV	$9,5 \pm 0,22$	57	7	87,7%
V	$7,7 \pm 0,21^{***}$	46	11	76,1%

Примітка: $*** p \leq 0,001$ порівняно з контрольною групою.

Постнатальний розвиток тварин оцінювали шляхом підрахунку кількості живих та мертвонароджених плодів, а також шляхом контролювання фізіологічного стану, життєздатності та живої маси щуренят

протягом двох перших місяців життя. Результати досліджень показали, що спостерігається збільшення маси щуренят II та III групи порівняно з контролем. Кількість приплоду в дослідній і контрольній групах коливалася в межах норми (табл. 3.7.1). Протягом двох місяців зафіксовано смертність щуренят контрольної групи 8,5%, хоча це значення коливається в межах фізіологічної норми (3,6–9,2%) [39]. Однак, смертність щуренят від самок II і III дослідних груп склала 8,6 і 8,5%, відповідно. Смертність щуренят від самок IV та V дослідних груп становила відповідно 12,3 та 23,9 %. Основна смертність приплоду в цих дослідних групах спостерігалась в перші доби життя, що може свідчити про народження ослабленого та менше життєздатного потомства (табл. 3.7.1).

Таблиця 3.7.2

Динаміка маси приплоду F_1 покоління самок щурів (покоління F_0), до раціону яких додавали боби з нативної, трансгенної сої необробленої, трансгенної сої обробленої гербіцидом, та яким давали в питну воду гербіцид (0,1 мкг/л) ($M \pm m$, $n=10$).

Динаміка маси тіла однієї тварини, г			
Група	при народженні	20 днів	два місяці
I	4,93±0,069	34,90±0,044	92,5±0,97
II	4,925±0,052	33,57±0,29***	102,7±0,53***
% до контролю	98,5	96,2	111,0
III	4,7±0,059*	33,2±0,165	98,4±0,65***
% до контролю	96,5	91,7	106,38
IV	4,5±0,067***	32,5±0,16***	97,5±0,73***
% до контролю	91,3	93,1	105,4
V	3,5±0,075***	27,1±0,29***	67,5±1,0***
% до контролю	71	77,7	73

Примітка: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.

Через три доби після народження щурят проводили їх зважування, вірогідних міжгрупових відмінностей за значеннями живої маси не виявлено (табл. 3.7.2).

Маса новонароджених тварин II та III дослідних груп була меншою на 1,5 і 3,5 %, відповідно, порівняно з контрольною. Така тенденція прослідковувалася й на 20-й день життя тварин – 3,8 % та 8,3%. Маса тіла щурів у двомісячному віці у II та III групах зростає на 11 та 6,38 % порівняно з контролем, що свідчить про позитивний вплив компонентів сої на ріст та масу приплоду, за рахунок кращого засвоєння протеїну сої тваринами та про його біологічну цінність. У IV та V групах маси щурят при народженні були менші на 8,7 та 29 % порівняно з контролем, а на 20-й день спостерігається і на 6,9 та 22,3 % порівняно з контролем. Через два місяці маса щурят у IV групі збільшувалася на 5% та у V групі зменшувалась на 27%.

У батьківському поколінні щурів спостерігається незначне зменшення загальної маси тіла в усіх дослідних групах порівняно з контролем. При вивченні масометричних показників внутрішніх органів щурів спостерігається зменшення маси нирок та печінки: у II групі – на 15 % та 1,1%; III групі – на 8,5% та 20 %; IV групі – на 10% та 6% ; у V групі зменшення маси нирок на 12,6 % та збільшення маси печінки на 7,4% (таблиця 3.7.3.).

Також спостерігається зменшення маси серця: в II групі на 10,3%; III групі – збільшується на 6%; IV група – зменшується на 12,1 % та у V групі – зменшується на 14 % серце та легені на 19 %. Крім того, спостерігається збільшення маси селезінки: II група на 20 %; III група – на 15 %; IV група – на 36 % ; у V групі на 16 % (таблиця 3.7.3.).

Зміни загальної маси щурів F_0 покоління, які досягли дванадцятимісячного віку у дослідних групах були: у II та IV – збільшилась на 14 % та 6%; у III – зменшилась на 4,6%, а у V групі не змінилась

порівняно з контролем. При вивченні масометричних показників внутрішніх органів щурів II та III групах F₂ покоління спостерігається зменшення маси органів: нирки – на 6,9 та 21,2 %; печінки – на 1,4 та 3,3%; серця – на 7,1% (II група) (таблиця 3.7.4.).

Таблиця 3.7.3.

Маси внутрішніх органів щурів батьківського покоління, до раціону яких додавали боби з нативної, трансгенної сої (яка не оброблена гербіцидом), трансгенної сої (яка оброблена гербіцидом), та яким додавали в питну воду гербіцид (0,1 мкг/л) (M±m, n=10)

Група	Загальна маса тіла, г	Легені, г	Нирки, г	Печінка, г	Серце, г	Селезінка, г
I	230±10,6	1,85±0,084	2,06±0,11	9,50±0,23	1,16±0,078	0,91±0,054
II	231±14,33	1,84±0,05	1,7±0,008*	9,4±0,02	1,04±0,032	1,1±0,027***
% до контролю	100	99,5	85	98,9	89,7	120,9
III	200±0,96*	1,3±0,02***	1,83±0,02	7,6±0,27***	1,23±0,028	1,043±0,03**
% до контролю	86,6	99,5	91,5	80	106	114,6
IV	226±9,25**	1,97±0,054	1,8±0,05	8,93±0,48	1,02±0,082	1,24±0,066**
% до контролю	98	106,5	90	94	87,9	136
V	209±3,0	1,5±0,075**	1,85±0,06	10,2±0,49	0,998±0,053	1,059±0,058*
% до контролю	91	81,2	87,4	107,4	86	116,4

Примітка: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.

Також слід відзначити про збільшення маси селезінки у II групі на 5,8% (та легенів на 5%); III групі - на та 3,8% та у IV групі на 33,7 % (таблиця 3.7.4.).

F₁ покоління щурів у віці чотирьох місяців спаровували та продовжували отримувати той же раціон, що й покоління F₀ щурів відповідно до дослідної групи. Друге покоління щурів одержали через 22-26 днів, через три доби щуренят зважували. Кількість приплоду в I, II та III

групах коливалася в межах фізіологічної норми. При оцінці постнатального розвитку тварин враховували кількість живих та мертвонароджених плодів, фізіологічний стан, життєздатність та живу масу щуренят протягом двох перших місяців життя (таблиця 3.7.5).

Таблиця 3.7.4

Маси внутрішніх органів щурів F₂ покоління, до раціону яких додавали боби з нативної та трансгенної сої (M±m, n=14)

Група	Загальна маса тіла, г	Легені, г	Нирки, г	Печінка, г	Серце, г	Селезінка, г
I	217±13,5	1,9±0,157	2,03±0,11	9,42±0,53	1,05±0,062	1,04±0,054
II	247±16,06	2,00±0,17	1,93±0,044	9,38±0,68	0,97±0,034	1,1±0,05
% до контролю	114	105	93,1	99,6	92,4	105,8
III	207±1,3	1,359±0,062 ^{**}	1,6±0,06 ^{**}	9,11±0,8	1,3±0,032 ^{***}	1,08±0,031
% до контролю	95,4	71,5	78,8	96,7	124	103,8
IV	229±21,2	1,87±0,048	2,056±0,048	10±0,67	1,01±0,012	1,39±0,013
% до контролю	106	98,4	101,3	106	96,2	133,7
V	215,4±3,88	1,3±0,065 ^{**}	1,78±0,112	9,9±0,95	0,956±0,062	1,1±0,05
% до контролю	99,3	68,4	87,7	105	91	106

Примітка. Тут і надалі. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.

Результати досліджень показали, що спостерігається незначне збільшення маси щуренят II та III групи порівняно з контролем. Кількість приплоду в дослідних і контрольній групах коливалася в межах норми (таблиця 3.7.5).

Протягом двох місяців зафіксовано смертність щуренят контрольної групи 11,5 %, значення незначно відхилилося від фізіологічної норми (3,6–9,2%). Смертність щуренят від самок II та III дослідних груп становила 13,6 %, що також незначно відхилилося від фізіологічної норми. Смертність щуренят від самок IV та V дослідних груп становила 20,6% та 26% через два місяці.

Таблиця 3.7.5

Постнатальний розвиток приплоду самок щурів F₁ покоління, до раціону яких додавали боби з нативної, трансгенної сої обробленої гербіцидом, трансгенної сої необробленої гербіцидом та яким давали в питну воду гербіцид (0,1 мкг/л) (M±m, n=7).

Група	Кількість приплоду у гнізді в перший день після народження, голів	Життєздатність приплоду		
		Кількість приплоду в групі, голів	Кількість приплоду, що загинула	Живі від народження у двомісячному віці, %
I	7,5 ±0,13	45	5	88,5%
II	7,3 ±0,22	44	6	86,4%
III	7,3±0,23	44	6	86,4%
IV	5,7±0,58***	34	7	79,4%
V	4,5±0,45***	27	7	74%

Основна смертність приплоду в цих дослідних групах спостерігалась в перші дні життя, що може свідчити про народження ослабленого та менше життєздатного потомства (таблиця 3.7.6)

Таблиця 3.7.6

Динаміка маси приплоду F₂ покоління самок щурів (покоління F₁), до раціону яких додавали боби з нативної, трансгенної сої обробленої гербіцидом, трансгенної сої необробленої гербіцидом та яким давали в питну воду гербіцид (0,1 мкг/л), г (M±m, n=7).

Динаміка маси тіла однієї тварини, г			
Група	при народженні	20 днів	два місяці
I	4±0,046	31,3±0,22	92±0,62
II	3,95±0,045	32,9±0,41	93,3±0,18
% до контролю	98,75	105,11	101,4
III	3,98±0,04	33±0,44***	93±0,27
% до контролю	99,5	105,4	101,1
IV	3,1±0,048***	23,3±0,33***	69±3,4***
% до контролю	77,5	74,4	75
V	3±0,04***	23,05±0,87***	63,75±0,29***
% до контролю	75	73,6	69,3

Примітка: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.

Середня маса новонароджених тварин II та III дослідних груп була меншою на 1,25% і 0,5%, відповідно, порівняно з контрольною. Порівнюючи маси щурів на 20-й день життя тварин у цих дослідних групах спостерігається збільшення маси тіла на 5,11% та 5,4% порівняно з контрольною групою. Маса тіла щурів у двомісячному віці у II та III групах зростає на 1,4 та 1,1% порівняно з контролем, що свідчить про позитивний вплив компонентів сої на ріст та масу приплоду. Це може свідчити про краще засвоєння протеїну сої тваринами та про його біологічну цінність. У IV та V групах при народженні маси щуренят були менші на 22,5 та 25 % порівняно з контролем, на 20-й день спостерігалось також зменшення маси щуренят на 25,6 та 26,36 % від інтактної групи. Через два місяці маса щуренят у гніздах IV групи знижується на 25 % та V групі зменшується на 30,7 %. Такі результати можуть свідчити про те що у II та III групах не спостерігається відхилення постнатального розвитку щурів від контрольної групи, на це вказують фізіологічний стан, життєздатність та жива маса щуренят протягом двох перших місяців життя. У IV та V групах щурів спостерігається відхилення у постнатальному розвитку щурів F₂ покоління, основною причиною цього може бути дія гербіциду на щуренят, що вживали самки щурів разом з питною водою та соєю, яка містила гербіцид.

У F₂ поколінні щурів спостерігається незначні зміни загальної маси тіла в усіх дослідних груп порівняно з контролем. Так, у II та III групах збільшується маса тіла на 5,88 та 8%; у IV та V групах зменшення - у 1,47 та 17,7 %. При вивченні масометричних показників внутрішніх органів щурів спостерігається зменшення маси нирок та серця: в II група - на 11,76 та 15,22%; III група – на 5,88 та 5,56%; IV група – на 11,76 та 21,11 % ; у V групі 18,8 та 11,57 % (таблиця 3.7.7.). Також спостерігаються зміни у масі печінки та селезінки: в II групі - збільшення маси печінки на 2% та зменшення маси селезінки 4,64%; III група - зменшення печінки на 8,4% та збільшення селезінки 4,5%; у IV групі спостерігається збільшення печінки та

селезінки - на 16,56 та 26,2 %; у V групі – збільшення 23 та 21,9 %. При цьому не змінюється маса легень у всіх дослідних групах, окрім V групи, у якій відмічено зменшення на 13,5%.

Таблиця 3.7.7

Маси внутрішніх органів щурів другого покоління, до раціону яких додавали боби з нативної, трансгенної сої обробленої гербіцидом, трансгенної сої необробленої гербіцидом та яким додавали в питну воду гербіцид (0,1 мкг/л) ($M \pm m$, $n=7$)

Група	Загальна маса тіла, г	Легені, г	Нирки, г	Печінка, г	Серце, г	Селезінка, г
1	2	3	4	5	6	7
I	210,7 $\pm$ 3,78	1,84 $\pm$ 0,006	1,7 $\pm$ 0,085	8,03 $\pm$ 0,2	1,08 $\pm$ 0,047	0,927 $\pm$ 0,023
II	223 $\pm$ 2,83	1,84 $\pm$ 0,006	1,5 $\pm$ 0,13	8,2 $\pm$ 0,24	0,948 $\pm$ 0,084	0,884 $\pm$ 0,025***
% до контролю	105,83	100	88,24	102	84,78	95,36
III	227,6 $\pm$ 2,1***	1,86 $\pm$ 0,003**	1,6 $\pm$ 0,05*	7,36 $\pm$ 0,52	1,02 $\pm$ 0,026	0,969 $\pm$ 0,1
% до контролю	108	101	94,12	91,66	94,44	104,5
IV	207,6 $\pm$ 0,95	1,84 $\pm$ 0,012	1,5 $\pm$ 0,08	9,36 $\pm$ 0,18**	0,852 $\pm$ 0,06**	1,17 $\pm$ 0,063***
% до контролю	98,53	100	88,24	116,56	78,89	126,2
V	173,4 $\pm$ 3,9***	1,74 $\pm$ 0,11***	1,38 $\pm$ 0,038***	88,53 $\pm$ 0,2**	0,95 $\pm$ 0,073	1,13 $\pm$ 0,04***
% до контролю	82,3	86,5	81,18	106,23	88,43	121,9

Примітка: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ порівняно з показниками контрольної групи.

Збільшення маси печінки у тварин дослідних груп, більше виражено в самок щурів IV та V групи, порівняно з контролем, що свідчить про негативний вплив гербіциду та насіння сої, яка була оброблена цим гербіцидом.

За вживання генетично модифікованої сої, яка була оброблена гербіцидом та самого гербіциду спостерігається збільшення смертності

щуренят першого, а особливо другого покоління протягом перших двох місяців. При вимірюванні коефіцієнтів органів спостерігається зменшення маси внутрішніх органів як у батьківському, так і у двох наступних поколіннях, хоча відмічається збільшення маси печінки та селезінки у IV та V групі щурів. Такі дані можуть свідчити про токсичний вплив гербіциду Roundup та генетично модифікованої сої. Хоча такого ефекту не спостерігається за вживання трансгенної сої, яка не була оброблена гербіцидом. Саме такий токсичний вплив може бути зумовлений залишковим вмістом гербіциду у насінні сої [126].

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

В останні роки значне наукове зацікавлення зосереджено на проблемах, пов'язаних із різними чинниками забрудненням довкілля, в тому числі гербіцидами, які сьогодні широко використовуються у сільському господарстві. Найпоширенішим гербіцидом у всьому світі є гербіцид Roundup, що має широкий спектр дії. Актуальним на сьогодні залишається вивчення не лише дії цього гербіциду, а також вплив генетично модифікованих організмів стійких до дії даного гербіциду, зокрема сої лінії GTS 40-3-2 на організм людини та тварин. Окремим питанням також залишається вивчення здатності гербіциду Roundup накопичуватися у насінні генетично модифікованих рослин та вплив його на обмін речовин в організмі тварин та людини. Пригнічуючу та токсичну дію гербіциду Roundup не можна ігнорувати з причин негативного впливу на здоров'я людини та тварин, в організм яких цей гербіцид потрапляє через шкіру, органи дихання, з питною водою та продуктами харчування.

З цією метою у світі проводилися дослідження впливу генетично модифікованої сої лінії GTS 40-3-2 на організм лабораторних тварин та почали проводитися дослідження впливу гербіциду Roundup. Разом з тим, не було проведено дослідження сумісної дії цих двох факторів. Тому дослідження впливу ГМ-сої обробленої гербіцидом Roundup на його залишкові концентрації є необхідною умовою для оцінки ризику використання генетично модифікованих продуктів [14]. Крім того концентрація гербіцидів при обробці полів часто перевищує норму, що сприяє накопиченню їх у насінні. Слід відзначити, що навіть невеликі концентрації гліфосату можуть негативно впливати на організм тварин [156, 177]. У даній роботі проводилися дослідження впливу гербіциду Roundup на три покоління щурів, який вони отримували разом із питною водою (0,01 мкг/л), що є допустимою концентрацією в межах Європейського Союзу

[156]. Тому метою було вивчення малих концентрацій цього гербіциду на організм лабораторних тварин.

Окрім основної мети – вивчення впливу обробленої та необробленої гербіцидом генетично модифікованої сої, розглядалося потрапляння цього гербіциду разом з питною водою в організм тварин та людини. Варто відзначити, що дослідження цих факторів на органи та тканини присутні в незначній кількості наукових робіт та публікаціях [35, 38, 90, 177].

Саме з цією метою в даній дисертаційній роботі ми намагалися вивчити народжуваність та постнатальний розвиток щурів у декількох поколіннях, як свідчать літературні джерела [39], найбільший вплив генетично модифікованих організмів припадає саме на наступні покоління. З цією метою досліджувались масометричні показники трьох поколінь щурів за вживання традиційної, генетично модифікованої сої обробленої та необробленої гербіцидом та вплив самого гербіциду. Результати відповідних досліджень перш за все характеризують вплив окремих цих факторів та впливу ГМ-сої і гербіциду разом, оскільки у природі та у повсякденному житті впливають обидва ці фактори. Цей напрям досліджень є актуальним з практичної точки зору, у справі як забезпечення екологічної безпеки сільськогосподарської продукції та водойм, а також становить теоретичний інтерес, збагачуючи розуміння впливу ГМ-сої та гербіциду Roundup на організм тварин та людей. Разом з тим, основною метою роботи було виявити, який з факторів в більшій мірі впливає на стан здоров'я організму щурів оскільки дослідження різних авторів зазвичай помітно відрізняються залежно від виду, віку організму та тривалості проведення досліджень.

Аналіз народжуваності та масометричні показники у двох наступних поколінь (F_1 та F_2) може характеризувати постнатальний розвиток щурів під впливом ГМ-сої та гербіциду.

Морфологічні дослідження стану клітин печінки та нирок під час вживання обробленої та необробленої сої гербіцидом, а також гербіциду разом з питною водою дають можливість судити про вплив цих факторів, на

організм, зокрема на основний орган детоксикації (печінку) та на видільну систему (нирки).

Дослідження впливу гербіциду та генетично модифікованої сої, а також їх сумісної дії на біохімічні показники протеїнового та азотистого обміну [40, 54, 65], проводили при короткотривалому і довготривалому впливі генетично модифікованої сої [40, 53, 54], але сумісна дія цих двох факторів не вивчалася.

При цьому виявлені біохімічні зміни споживання обробленої генетично модифікованої сої та гербіциду Roundup, зокрема вміст карбонільних похідних, SH-груп та активність протеолітичних ензимів, також підтверджуються і гістохімічними показниками (гістохімічний аналіз мікрофотографій, коефіцієнт R/B).

Вивчення активності ключових ензимів антиоксидантного захисту, є необхідним для оцінки безпечності вживання генетично модифікованих продуктів. Крім того, ці дослідження показують стан антиоксидантної системи в організмі щурів. У дисертаційній роботі результати досліджень активності ензимів антиоксидантної системи висвітлені у розділі 3.6.

Ці дослідження у своїй сукупності скеровані на вирішення задач дослідження й досягнення мети роботи. Проведемо узагальнення основних результатів досліджень за основними проблемними напрямками й сформуловані попередні висновки у світлі відомих у науковій літературі фактів.

Аналіз літератури показав, що гербіцид може накопичуватися у насінні сої та проникати у водойми, а при потрапленні негативно впливає на організм тварин [49, 54, 177, 181], саме тому є важливим встановити, які зміни може викликати гербіцид Roundup у організмі тварин та людини.

На початку нашого експериментального дослідження та перед додаванням у корм експериментальних тварин сої обох сортів, був проведений аналіз на якісне визначення у зразках сої наявності генетично модифікованих вставок. Зразки сої обох сортів (Чернівецька 9 та лінії GTS

40-3-2) були перевірені на наявність генетичної модифікації, що підтверджено Українською лабораторією якості і безпеки продукції АПК протоколом №1691-Н (додаток А). У другому зразку виявлені цільові послідовності промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) та термінатора NOS (T-NOS) T1 плазмиди *Agrobacterium tumefaciens* (табл. 3.1.1), що свідчить про те що це є генетично модифікована соя.

Перед додаванням сої в корм піддавали термічній обробці, також після цього визначали антипоживні речовини у насінні сої: активність трипсинового інгібітору, уреазу (табл. 3.1.3), ліпази та ліпоксигенази (табл. 3.1.4). З'ясовано, що термічна обробка насіння сої призводить до знешкодження уреазу та інгібітору трипсину, але вміст активності уреазу та інгібітору трипсину залишається більшим у насінні трансгенної сої ніж традиційної, хоча між ними немає вірогідної різниці (див. табл. 3.1.3). Результати аналізу сої свідчать, що термічна обробка насіння сої призводить до часткової інактивації ліпази та ліпооксигенази, як у традиційній, так і в трансгенній сої. Вміст ліпази у насінні ГМ-сої залишається більшим, ніж у традиційної, про що свідчить збільшення кислотного числа $1,58 \pm 0,15$ (табл. 3.1.4). Визначення ліпази і ліпоксидазу, є дуже важливим, адже вони можуть викликати гідроліз і окиснення соєвого жиру, при цьому утворюються окиснені продукти поліненасичених жирних кислот які проявляють високу біологічну активність по відношенню до клітинних мембран. При високій концентрації їх в кормі може спостерігатися отруєння тварин.

Також у насінні термічно обробленої генетично модифікованої сої визначали вміст залишкової кількості гліфосату методом тонкошарової хроматографії (додаток Б, В). Результати дослідження показали, що у першому зразку термічно обробленої генетично модифікованої сої, яку необробляли гербіцидом Roundup вміст залишку гліфосату у насінні $<0,3$ мг/кг. Тобто досліджуваний зразок відповідає вимогам ДСанПіН 8.8.1.2.3.4-000-2001 “Допустимі дози, концентрації, кількості та рівні вмісту пестицидів у сільськогосподарській сировині, харчових продуктах, повітрі робочої зони,

атмосферному повітрі, воді водоймищ, ґрунті”(додаток Б). У другому зразку генетично модифікованої сої, яка була оброблена гербіцидом Roundup виявили залишкову кількість гліфосату у насінні, що становило 0,78 мг/кг і даний показник перевищує норму по НД на продукт (термічно оброблене насіння сої) у 2,6 разу (додаток В). Вміст гліфосату перевищує норму, можливо тому що гербіцид Roundup використовується близько 30 років, за цей час появились “супер бур’яни”, які стали стійкі до дії гліфосату. Саме тому часто фермерам доводиться збільшувати концентрацію гербіцидом Roundup під час обробки поля та перевищувати гранично допустиму концентрацію. Гранично допустима концентрація (ГДК) для різних фосфорорганічних сполук коливається від 0,02 до 0,5 мг/м³, ГДК у воді водойм – 0,02 мг/дм³ [88].

Результати досліджень постнатального розвитку і масометричних показників щурів, за вживання гліфосат-резистентної сої обробленої гербіцидом Roundup та гербіциду доводять, що смертність щуренят від самок IV та V дослідних груп становила 12,3 та 23,9% у другому (F₁) поколінні. Така ж картина спостерігається і в F₂ поколінні, основна смертність приплоду в цих дослідних групах спостерігалась в перші доби життя, що може свідчити про народження ослабленого та менш життєздатного потомства. Також слід відзначити, що у IV та V групах при народженні маси щуренят були менші на 8,7 та 29 % порівняно з контролем, на 20-й день менші на 6,9 та 22,3%. Через два місяці маси щуренят у IV групі збільшується на 5% та у V групі зменшується на 27% в порівнянні з контролем. У F₂ поколінні при народженні маси щуренят були менші на 22,5 та 25 % порівняно з контролем, на 20-й день спостерігається також зменшення маси щуренят на 25,6 та 26,36%. У щурів усіх трьох поколінь спостерігається збільшення маси печінки та селезінки IV та V групах, що свідчить про негативний вплив гербіциду та підтверджує наявність його залишків у насінні обробленої ним сої. Таким чином, можна сказати, що вживання гербіциду разом з питною

водою та вживання сої, обробленої гербіцидом, може призвести до порушень у пренатальному та постнатальному розвитку.

Токсичний вплив гербіциду Roundup та обробленої ним транс генної сої також підтверджують і гістологічні дані, які були одержані під час експериментів. Вивчався вплив даних факторів на клітини печінки та нирків, одержані результати показали порушення у будові цих органів порівняно з контрольною групою. Проаналізувавши одержані результати гістологічних досліджень, можна зробити висновок, що структура цитоплазми гепатоцитів та їх ядер змінюється. Окрім того, вміст цитоплазми гепатоцитів зміщується до периферії клітини, окремі гепатоцити мають дрібнозернисту цитоплазму, яка рівномірно заповнює клітину. При цьому гетерогенність клітин печінки чітко виражена у контрольній групі. У нирках щурів трьох поколінь, спостерігається набряк епітеліоцитів дистальних каналців, просвіт цих каналців звужений, спостерігається некроз окремих клітин, що свідчать про порушення структури як печінки, так і нирок, що в подальшому призводить до порушення їх функцій.

Порівнюючи отримані нами результати із результатами, приведеними у літературі, відзначимо, що у печінці щурів F₂ покоління, яких згодовували генетично модифікованою соєю, ультраструктурно виявлено в цитоплазмі гепатоцитів помірне набубнявіння мітохондрій і зменшення в них кількості крист, значне зростання кількості пероксисом на тлі зниження вмісту хроматину в ядрах, а в перисинусоїдальному просвіті виражене значне розширення жовчних капілярів. Всі ці субмікроскопічні зміни вказують на енергетичне навантаження та інтенсифікацію дезінтоксикаційних процесів даними клітинами [122]. Подібні результати були одержані і багатьма іншими дослідниками [24, 38, 78, 80], що також підтвердили негативний вплив гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої на будову внутрішніх органів, які проявляються у порушенні структури клітин та некрозу окремих клітин у більшості органів, зокрема печінці та нирках. Окремо дія гліфосату не вивчалася проте іншими авторами вивчалася сумісна

дія Плюмбум Ацетату, Купрум Сульфату і гліфосату в тканині печінки, при цьому відмічаємо явища некрозу та дистрофії, які асоціюються зі значною змішаноклітинною інфільтрацією. Крім того, вивчався вплив цих факторів на нирки; виявлені структурні зміни в статевонезрілих щурів при впливі даних ксенобіотиків вказують на порушення їх функцій [35].

Отримані нами результати гематологічних досліджень, показали, що у F_0 поколінні підвищується кількість нейтрофілів сегментоядерних та палицеоядерних у крові щурів. У F_1 та F_2 поколіннях лише нейтрофілів сегментоядерних (у IV та V групах у F_0 ; у II, IV та V групах у F_1 поколінні), а по іншим показникам не спостерігається змін лейкоцитарної формули крові експериментальних щурів, що може свідчити про інтоксикацію організму. Ці дані підтверджуються також підвищенням вмісту молекул середньої маси у крові, нирках та печінці щурів у IV та V групах щурів.

Вміст ароматичних і аліфатичних молекул середньої маси в крові збільшувався, вміст циклічних МСМ в IV і V групі підвищувався - у 1,3 разу (у F_0 та F_1 поколіннях щурів) спостерігається ще більше підвищення вмісту МСМ. Так, вміст молекул середньої маси, що містять у своїй структурі ароматичні кільця підвищується в 1,7 разу відповідно. При вживанні генетично модифікованої сої, обробленої гербіцидом, і при моноведенні гербіциду разом з питною водою, в крові щурів F_0 покоління підвищується рівень аліфатичних середніх молекул в 1,6 і 1,7 разу порівнянно з контролем, відповідно. Вміст МСМ в сироватці крові у другому поколінні залишається на такому ж рівні. У F_2 поколінні вміст МСМ (аліфатичних) збільшується у 1,6 разу, ароматичних у 1,7 разу у цих же дослідних групах.

Кількість молекул середньої маси (аліфатичних та ароматичних) у печінці та нирках щурів підвищується у два і більше разів, найбільше вміст МСМ спостерігається у F_2 поколінні.

Молекули середньої маси являються вторинними ендогенними токсинами пептидної природи, які можуть слугувати маркерами «метаболічної інтоксикації» організму під час різних шкідливих впливах,

зокрема впливу гербіциду та обробленої цим гербіцидом генетично модифікованої сої.

Під час дослідження протеїнових фракцій у дослідних групах спостерігається зниження альбумінового коефіцієнту – у III, IV та V він найменший і становить не більше 30%, найбільше цей показник знижується у щурів F₂ покоління. Отже, вказані зміни співвідношення протеїнових фракцій у крові щурів свідчать про сповільнення синтезу альбумінів у печінці при вживанні сої та гербіциду. Наведені вище результати наших досліджень вказують на те, що, поряд із змінами розподілу та вмісту протеїнових фракцій, відбуваються зміни стану імунної системи. При цьому на вікові особливості функціонування імунної системи впливають як екзо-, так і ендогенні чинники [10].

В результаті дослідження (АлАт, АсАт та СМ) у печінці та нирках в дослідних групах щурів трьох поколінь показало порушення в роботі нирок та печінки. У IV та V групі у гомогенаті нирок спостерігається суттєве збільшення ензимної активності АлАт і АсАт, так у IV збільшується у 3 та 2 рази, у V групі у 3 та 2,5 рази порівняно з контрольною групою. Збільшення рівня МСМ може свідчити про ендогену інтоксикацію організму, що чітко виражено у IV групі вміст МСМ₁ та МСМ₂ збільшується у 1,6 разу, а у V групі - у 1,7 та 1,6 разу. Вміст МСМ аліфатичних та ароматичних збільшується також у IV групі у 1,7 разу, а у V групі у 1,8 разу.

Найбільше підвищення амінотрансферазної активності спостерігається у F₂ поколінні у IV групі – ензим на активність АлАт і АсАт збільшується у 2,3 разу та у V групі у 2,7 та 2,6 разу. Вміст молекул середньої маси (аліфатичних та ароматичних) також збільшується у IV групі у 2,6 та 2,5 разу, а у V групі у 2,4 та 2,3 разу.

Досліджувалася ензима активність ГГТ в сироватці крові у трьох поколіннях щурів. Результати досліджень показали, що у F₀ поколінні ензимна активність найбільше підвищується за умов дії гербіциду – у 2,2 разу та застосуванням дієти збагаченої геномодифікованою соєю обробленою цим

гербіцидом – у 1,8 разу порівняно з контролем (рис.4). У F_1 поколінні таке підвищення виражене ще більшою мірою: за дії Roundup активність ензимів ГГТ підвищується у 2,5 разу, за умов застосування трансгенної сої обробленої гербіцидом – у 2,1 разу порівняно з контролем. У F_2 поколінні також відмічено зростання ензимної активності ГГТ у IV та V групі приблизно у 1,6 та 1,7 разу порівняно з контрольною групою, а у II та III групі у 1,3 та 1,2 разу.

Гіперферментемія амінотрансфераз та γ -глутамілтрансферази більшою мірою виражена у щурів трьох поколінь, які споживали генетично модифіковану сою, оброблену гербіцидом або яким здійснювали моновведення гербіциду Roundup.

Для перевірки роботи нирок також визначався рівень креатиніну у IV та V групах – знизився у 1,3 разу (у F_0 поколінні), а у F_1 поколінні у 1,7 разу порівняно з контрольною групою, та його зниження у 2,3 та 2 разу у сечі щурів F_2 поколінні. Концентрація сечовини у сечі щурів в IV та V групах знизився у 1,3 рази, а у F_1 та F_2 поколінні знизився у 1,2 разу. При цьому спостерігається збільшення концентрації сечової кислоти у IV та V групах – у 2 та 2,2 разу, у F_1 поколінні у 2,6 та 3 разу, а у F_2 у– 2,5 та 2,4 разу порівняно з контролем.

Проаналізувавши зміни показників у сечі трьох поколінь можна зробити висновок, що визначальним чинником у порушенні азотистого обміну є дія гербіциду Roundup або його залишковий вміст у насінні трансгенної сої.

Також узгоджується з літературними даними підвищення показників азотистого обміну, зокрема сечової кислоти, та зниження креатиніну і сечовини може свідчити про ниркову недостатність, адже рівень азотистих метаболітів значно підвищується у крові, що свідчить про порушення роботи печінки, внаслідок дії токсичних речовин.

Для визначення окиснення протеїнів проводився гістохімічний та біохімічний аналіз. Ступінь окиснення протеїнів згідно із гістологічними методами зрізів визначали за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної

програми ImageJ (версія 1.48v, вільна ліцензія, W.Rasband, National Institute of Health, USA, 2015) виконували комп'ютерну мікроспектрофотометрію у системі кольору RGB (Red, Green, Blue) [5]. У результаті отримували два параметри R та B, на основі яких отримували коефіцієнт R/B, який використовувався як міра ОМП. R/B- співвідношення між інтенсивністю забарвлення у ділянці червоного спектру (R) до інтенсивності забарвлення у ділянці синього спектру (B). Обраховували середню арифметичну та її похибку.

Так, коефіцієнт R/B у епітеліальних клітинах проксимальних каналців нирок IV групи збільшується у 1,22 разу, а у другому поколінні - у 1,36, у третьому ж - у 1,38 разу. Також підвищується вміст кислих протеїнів у епітеліальних клітинах проксимальних каналців у V групі як у F₀ так і у F₁ та F₂ поколінні. Такий результат може свідчити про здатність гербіциду Roundup накопичуватися у насінні сої, та підвищувати вільнорадикальні процеси у клітинах нирок, саме це і призводить до підвищення вмісту ОМП у нирках.

Отже, тривале вживання гербіциду та обробленої ним сої тваринами спричиняє активацію процесу вільнорадикального окиснення у клітинах внутрішніх органів. Разом із тим, в наших дослідженнях встановлена динаміка накопичення ОМП в тканинах.

Дослідження ОМП за рівнем карбонільних похідних у гомогенаті нирок показав що вживання трансгенної сої обробленої гербіцидом Roundup та гербіциду разом з питною водою призводить до зростання їх у гомогенаті нирків у F₀ поколінні— у 1,7 та 1,6 разу, у F₁ — у 1,9 та 1,8 разу, а у F₂ — 1,8 та 1,9 разу. При цьому визначався вміст SH-груп у нирках щурів трьох поколінь, найбільше їх вміст знижується у F₂ поколінні у IV та V групі – 1,8 та 1,7 разу, відповідно. Саме зниження їх кількості спостерігається під час оксидативного стресу, який виникає в результаті порушення балансу між продукцією вільних радикалів і механізмами антиоксидантного контролю. Окиснені протеїни стають чутливими до дії протеолітичних ензимів, саме

тому визначалася їх активність у гомогенаті нирків, результати досліджень показали що у F_0 поколінні протеолітична активність ензимів у IV та V груп зменшується у 1,3 та 1,2 разу, у F_1 поколінні – у 1,6 та 1,3 разу, а у F_2 в 1,9 та 1,6 разу, відповідно. Ймовірно, вживання обробленої гербіцидом трансгенної сої та гербіциду призводить до посилення вільнорадикальних процесів, що може призводити до окиснювальної модифікації і самих ензимів.

При вивченні гістохімічного забарвлення тканин печінки можна стверджувати про переважання у печінці щурів IV та V груп концентрації кислих протеїнів, як у F_0 поколінні, так і у наступних двох поколіннях. Спостерігається зростанням показника R/B у 1,2 разу в клітинах печінки усіх трьох поколінь щурів при цьому спостерігається збільшення числа гепатоцитів у стані гідропічної дистрофії про що свідчать мікрофотографії тканини печінки. Підвищення рівня ОМП підтверджується і за біохімічною оцінкою, такі результати можуть свідчити про деструкцію протеїнових структур клітини, яка може відбуватися за рахунок окиснення аміногруп та сульфгідрильних груп. Вміст сульфгідрильних груп у гепатоцитах щурів у IV та V групи - у 1,4 та 1,3 разу в F_0 поколіннях, та у 1,4 разу F_1 покоління. У F_2 поколінні рівень сульфгідрильних груп знижується у IV та V групі – 1,3 та 1,4 разу відповідно. Протеолітична активність ензимів печінки щурів знижується – у 1,3 (F_0) та 1,4 разу (F_1 та F_2) порівняно з показниками інтактної групи щурів, це імовірно, пов'язано з інактивацією протеаз вільними радикалами. Така ж картина спостерігається і у щурів V групи протеолітична активність ензимів знижується у 1,2 разу в усіх трьох поколіннях.

Окиснення протеїнів під дією активних форм кисню з утворенням карбонільних похідних є однією з адаптаційних систем і стимулює активацію протеолітичних ензимів на перших етапах, що вибірково руйнують окиснені протеїни. При цьому модифікації піддаються і самі протеази внаслідок надмірного утворення активних форм кисню під час оксидативного стресу, саме тому їх активність в наступних поколіннях знижується.

Для оцінки безпечності вживання генетично модифікованих продуктів на організм щурів важливе значення відіграють показники ферментативної активності антиоксидантної системи. Антиоксидантна система є однією з найважливіших захисних систем організму, яка підтримує оптимальний рівень окисно-відновних процесів, крім того вона знешкоджує побічні продукти ПОЛ, ОМБ та активні форми кисню що виникають при різних патологічних станах та дії токсичних речовин. Споживання трансгенних рослин тваринами та людиною, може містити такі небезпеки для організму: синтезом алергенних чи токсичних білків, що кодують штучно внесені гени у рослину, можливістю накопичення гербіциду у насінні генномодифікованих рослин та інше.

Рівень токсичності визначали за біохімічними, гематологічними та морфологічними показниками, ензимною активністю системи антиоксидантного захисту (глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, каталази, супероксиддисмутази) [121].

Важливим ензимом антиоксидантного захисту є супероксиддисмутаза, яка, дисмутуючи супероксидний аніон радикал, перетворює його в менш реакційноспроможний пероксид гідрогену. СОД безпосередньо забезпечує обрив вільнорадикальних реакцій у клітинах аеробних організмів на так званій «нульовій» стадії вільнорадикального окислення [8, 12].

Як, відомо, за умов активації прооксидантних процесів у клітинах важливе значення має функціональна активність ензимів антиоксидантної системи, які задіяні у процесах детоксикації вільних радикалів та продуктів їх окиснення, а саме: супероксиддисмутази [122, 152, 153], каталази, глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази [83, 169]. З літературних джерел та на основі наших досліджень виявлено різну динаміку антиоксидантних ензимів у клітинах тварин, які зазнають впливу гербіциду Roundup. Із результатів досліджень, виконаних іншими авторами, випливає, що зміни стану антиоксидантної системи, активація або пригнічення окремих ензимів залежать від дози гербіциду. Супероксиддисмутазна активність знижується

IV та V групах в 2 та 2,5 разу у нирках щурів F_0 покоління, при цьому його ензимна активність не змінюється у II та III групах порівняно з контрольною групою [8, 12]. У F_1 та F_2 поколіннях СОД активність знижується у IV та V групах: у 2 та 3 рази, також у 2,6 та 4 рази у нирках у F_2 покоління. У гомогенаті печінки також спостерігається зниження його ензимної активності у IV та V групах F_0 покоління у 2 та 2,4 разу вірогідно, у F_1 покоління у 3 рази, а у F_2 у 4 та 5 рази, у крові щурів відмічається зниження у 2,5 та 3,6 разу у F_0 покоління, у F_1 покоління - у 2,6 та 3,4 рази, а в F_2 - у 3,2 та 4 рази.

Спостерігається зниження ензимної активності й інших ензимів антиоксидантного захисту, а саме глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази. Глутатіонпероксидазна активність у гомогенаті нирок найбільше знижується у IV та V групи: у 2 та 4 рази (покоління F_0), 2 та 4,6 разу (покоління F_1) та 2,5 та 4,5 разу (покоління F_2) порівняно з контролем. ГП активність також знижується у цих дослідних групах і у печінці: 1,8 та 2,3 разу у F_0 покоління; у 2 та 2,2 разу у F_1 покоління; у 2 та 2,6 разу у F_2 покоління. У крові ГП активність також знижується у IV та V групах у всіх трьох поколіннях щурів: у F_0 покоління у 1,6 та 1,9 разу; у F_1 у 1,8 та 2 разу; у F_2 у – у 1,8 та 2,4 разу.

Глутатіонтрансферазна активність найбільше знижується в печінці у IV та V групи має у всіх трьох поколіннях: 1,4 та 1,6 разу у F_0 покоління; у 1,6 та 1,8 разу у F_1 покоління; у 1,4 та 1,6 разу у F_2 покоління. Глутатіонтрансферазна активність у нирках найбільше знижується у IV та V групи: у 2 рази (покоління F_0), 2 та 2,2 разу (покоління F_1) та 1,8 та 2,1 разу (покоління F_2) порівняно з контролем.

У крові ГТ активність також знижується у IV та V групах у всіх трьох поколіннях щурів: у F_0 покоління у 2,2 та 2,9 разу; у F_1 покоління у 1,8 та 3,2 разу; у F_2 покоління у 2,2 та 4 разу. Крім того, спостерігається зниження вільного глутатіону у гомогенаті печінки, найбільше у F_2 покоління – у 1,6 та 1,8 разу.

Разом із тим, результати проведених досліджень дають підставу вважати, що тривале споживання гербіциду та обробленої ним сої впливає на організм тварин, підвищує рівень оксидативного стресу в клітинах органів і тканин. Таке судження підтверджується результатами досліджень впливу гербіциду на окиснювальну модифікацію протеїнів та ензимну активність антиоксидантів у крові, нирках, печінці щурів [8, 12].

На основі аналізу показників, щодо підвищення каталазної активності у нирках, печінці та крові щурів трьох поколінь можемо зробити висновок що відбувається інактивація вільно радикальних процесів та утворення активних форм кисню в організмі при цьому відбувається активацію антиоксидантних ензимів внаслідок оксидативного стресу. Зниження ензимної активності антиоксидантних супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази та вмісту відновленого глутатіону у тканинах щурів трьох поколінь може свідчити про виснаження антиоксидантної системи та порушення прооксидантної/антиоксидантної рівноваги внаслідок довготривалого вживання оброблено генетично модифікованої сої і гербіциду Roundup.

Ймовірно, що гербіцид Roundup, будучи ксенобіотиком, біотрансформується системою цитохрому P450 печінки у потенційно токсичні метаболіти, які здатні викликати ініціацію вільно радикальних процесів та пошкодження клітинних мембран [14], підтвердженням цьому є підвищення АлАт і АсАт у крові щурів, особливо у F₁ та F₂ поколіннях. Крім того, утворення активних форм кисню призводить до окиснювальної модифікації протеїнів (підвищення карбонільних похідних та SH- груп).

З іншого боку, застосування гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої може призвести до розвитку синдрому ендогенної інтоксикації про що свідчить підвищення МСМ у крові, у результаті чого буде порушуватися не тільки структурно-функціональний стан клітинних мембран і дискоординація метаболічних процесів, але й робота детоксикаційної системи печінки та екскреторної функції нирок.

Отже, за довготривалого вживання генетично модифікованої сої обробленої гербіцидом Roundup та самого гербіциду разом з питною водою призводить до порушення протеїнового і азотистого обміну, а також виснаження антиоксидантної системи, при цьому споживання генетично модифікованої сої необробленої гербіцидом Roundup не призводить до таких зміни. Результати наших досліджень узгоджуються з літературними джерелами [14].

ВИСНОВКИ

На основі теоретичного узагальнення й аналізу власних експериментальних досліджень виявлено зміни масометричних показників у трьох поколіннях щурів і зниження репродуктивної здатності у двох поколіннях щурів, за вживання генетично модифікованої сої, обробленої гербіцидом, та гербіциду Roundup. Обґрунтовано й експериментально доведено, порушення детоксикаційної функції печінки та роботи нирок, підвищення окиснювальної модифікації протеїнів і порушення рівноваги у функціонуванні прооксидантно-антиоксидантної системи щурів у поколіннях F_1 і F_2 .

1. Проведені дослідження на наявність генетично модифікованих вставок у двох зразках сої показали, що у зразку № 2 виявлені цільові послідовності промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) і термінатора NOS (T-NOS) T1 плазмиди *Agrobacterium tumefaciens*. За результатами лабораторних досліджень соя сорту Чернівецька 9 за хімічним складом (вологість, масова частка протеїну, жирів, елементів) еквівалентна генетично модифікованому гліфосат-резистентному сорту сої лінії GTS 40-3-2, хоча вміст протеїну в ній більший, а інші виявлені за окремими показниками різниці є в межах біологічної норми.

2. Виявлено гіперенземію амінотрансфераз і γ -глутамілтрансферази, що більшою мірою виражена у щурів усіх поколінь, які споживали генетично модифіковану сою, оброблену гербіцидом, або яким здійснювали моноведення гербіциду Roundup. Виявлені зміни призводять до порушення функціонального стану печінки, прогресування синдрому ендогенної інтоксикації за рахунок підвищення вмісту ароматичних молекул середньої маси в крові – в 1,6 і 1,7 разу та в 1,6 разу ($p \leq 0,001$) в поколінні F_2 (у IV і V групах). Порушення функціонального стану печінки може виражатися некрозом гепатоцитів, фрагментацією печінкових часток і супроводжуватися виходом ензимів у кров'яне русло за умов ушкодження цього органа.

3. Визначальним чинником у зміні показників азотистого обміну є дія гербіциду Roundup, що також може міститися в насінні трансгенної сої за її обробки. Підвищення показників азотистого обміну, зокрема сечової кислоти, і зниження креатиніну та сечовини може свідчити про ниркову недостатність, адже рівень азотистих метаболітів значно підвищується у крові, що свідчить про порушення роботи печінки внаслідок токсичних речовин і порушень гормонального балансу.

4. Вплив гербіциду Roundup у концентрації 0,1 мкг/л супроводжується змінами морфологічних показників як у нирках, так і в печінці (оборотне набрякання гепатоцитів і некротичні зміни в окремих гепатоцитах) у щурів усіх поколінь. Довготривале згодовування щурам трансгенної сої, обробленої гербіцидом Roundup, призводить до оборотного набрякання у клітинах нирок і печінки. В окремих клітинах також спостерігається явище каріопікнозу, як прояв некротичних змін цих клітин, при цьому цей процес сильніше виявляється у щурів двох наступних поколінь.

5. Результати досліджень окиснювальної модифікації протеїнів у нирках та печінці показали підвищення ОМП за вживання генетично модифікованої сої, обробленої гербіцидом, та гербіциду Roundup разом з питною водою у гомогенаті печінки в трьох поколіннях і за коефіцієнтом R/B. ОМП є результатом порушення рівноваги між процесами, що регулюють синтез і оксидацію протеїнів, та зменшення активності протеаз, які селективно розщеплюють окиснювальні форми протеїнів. Уміст сульфгідрильних груп також зменшується в гепатоцитах у цих групах у F₂ поколінні – у 1,3 і 1,4 разу, а в нирках у IV і V групах у F₂ поколінні – в 1,8 і 1,7 разу, що свідчить про вплив вільних радикалів на протеїни за рахунок взаємодії як з NH₂-, так із SH-групами.

6. Результати досліджень ензимної активності антиоксидантної системи показали підвищення каталазної активності в нирках, печінці та крові щурів в усіх поколіннях, що свідчить про утворення активних форм кисню в організмі. При цьому зниження ензимної активності супероксиддисмутази,

глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази та вмісту відновленого глутатіону свідчить про виснаження антиоксидантної системи внаслідок довготривалого вживання гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої і гербіциду Roundup, а також про порушення про- і антиоксидантної рівноваги і нагромадження вільних радикалів у тканинах, що призводить до окиснення біомолекул і порушення будови клітин нирок і печінки.

7. Результати досліджень репродуктивної здатності у двох поколіннях (F_0 і F_1) та зміни масометричних показників трьох поколінь щурів (F_0 , F_1 та F_2) показали, що під час згодовування генетично модифікованої сої, обробленої гербіцидом, і самого гербіциду збільшилася смертність щурят F_1 покоління у IV і V дослідних групах на 20,6 і 26 % відповідно, у F_2 поколінні – у IV групі на 25 % та в V групі зменшилася на 30,7 %. При вимірюванні коефіцієнтів маси органів фіксували зменшення маси внутрішніх органів як у батьківському, так і у двох наступних поколіннях.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аверьянова Н. И., Шипулина И. А. & Жуйков А. Е. (2001). Пиелонефрит и гломерулонефрит у детей: монография (pp. 179). Ухта
2. Александрова К. В. (2011). Основы клінічної біохімії (pp. 286). Запоріжжя.
3. Антоняк, Г. Л., Бабич, Н. О., Сологуб, Л. І. & Снітинський, В. В. (2000). Утворення активних форм кисню та система антиоксидантного захисту в організми тварин. Біологія тварин, 2 (2), 34–43.
4. Антоняк, Г. Л. & Снітинський, В. В. (2001). Активні форми кисню і антиоксиданти у функціональній активності живих систем. Вісник аграрної науки, 48–55.
5. Бабич, А. О. & Бабич-Побережна, А. А. (2012). Світові та вітчизняні тенденції розміщення виробництва і використання сої для розв'язання проблеми білка. Корми і кормовиробництво, 71, 12–26.
6. Березов, Т. Т. & Коровкин, Б. Ф. (1998). Биологическая химия (pp. 704). Москва.
7. Беркало, Л. В., Бобович, О. В. & Боброва, Н. О. (2003). Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. (pp. 320). Полтава.
8. Беркало, Л. В., Бобович О. В. & Гейко О. О. (1997). Посібник з експериментальних клінічних досліджень в біології та медицині (pp. 271). Полтава.
9. Берник, О.О., Савчук, О. М. & Дворщенко, К. О. (2010). Пероксидне окиснення білків печінки за умов гіпоацидного стану. Фізика живого, 18(3), 89–92.
10. Биохимические методы исследования в клинике (1999). Москва, 651.
11. Боднар, И. А., Климонтов, В. В., Королева, Е. А. & Желтова, Л. И. (2003). Суточная динамика артериального давления у больных

- сахарным диабетом типа 1 с нефропатией. Проблемы эндокринологии, 49 (5), 5–10.
12. Бусел, Ю.М., Морозенко, Д.В. & Камаєва, Н.О. (2009). Рівень середніх молекул крові як показник ендогенної інтоксикації за панкреатиту в собак. Вісник Полтавської державної аграрної академії, 4, 167–168.
 13. Василюк, М.Д., Василюк, С.М., Шевчук, А.Г. & Федорченко, В.М. (2012). Гостра печінкова недостатність у хворих на обтураційну жовтяницю. Галицький лікарський вісник, 19 (3), 111-113.
 14. Василюк, С. М., Василюк, М. Д., Чурпій, К. Л. & Пилипчик, В. І. (2009). Діагностика і комплексне лікування пацієнтів із обтураційною жовтяницею, ускладненою гострою печінково-нирковою недостатністю. Науковий вісник Ужгородського університету, серія «Медицина», 36, 67–70.
 15. Влізло, В. В. , Максимович, І. А., Галяс, В. Л. & Леньо М. І. (2008). Лабораторна діагностика у ветеринарній медицині: довідник. (6–13). Львів.
 16. Воейков, В. Л. (2003). Активные формы кислорода - патогены или целители? Клиническая геронтология, 3, 27–40.
 17. Волчегорский, И. А., Тишевская, Н. В. & Кузнецов, Д. А. (2000). Влияние «средних молекул» выделенных из плазмы крови интактных и обожженных животных, на клеточный состав культур эритробластических островков костного мозга. Весник РАМН, 2, 30–35.
 18. Вороніна Л.М. (2000). Біологічна хімія (рр. 608). Харків.
 19. Вудмаска, І. В., Параняк, Р. П., Янович, Д. О., Семенович, В. К. & Голубець, Р. А. (2007). Оцінка якості та безпечності генетично модифікованих організмів. Біологія тварин, 9(1-2), 23–29.
 20. Габриелян, Н.И. & Липатова, В.И. (1984). Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики

- нефрологических заболеваний у детей. Лабораторное дело, 3, 138–140.
21. Гладкий, Ф., Григорова, Л., Кузнецова, Л., Пильник, Л. & Петік, П. (2007). Жири рослин та олії. Метод визначання пероксидного числа. держспоживстандарт України (pp. 6). Київ.
 22. Гольдфарб, Ю. С. (1995). Физико-химические методы гемотерапии при острых экзо- и эндотоксикозах. Анестезия и реаматология, 3, 48–53.
 23. Гонський, Я. І., Дмухальська, Є. Б. & Куліцька, М. І. (2011). Вплив солей важких металів та фосфорорганічних пестицидів на обмін білків в уражених білих щурів. Медична і клінічна хімія, 13(4), 100–102. <https://doi.org/10.11603/1681-2557.2011.v13.i4.389>
 24. Гонський, Я. І., Дмухальська, Є. Б. & Ярошенко, Т. Я. (2014). Біохімічні показники функціонального стану печінки за умов поєднаної дії важких металів і раундапу. Медична хімія, 16(3), 73–77. <https://doi.org/10.11603/1681-2557.2014.v16.i3.3992>
 25. Гонський, Я. І. & Максимчук, Т. П. (2001). Біохімія людини (pp. 736). Тернопіль.
 26. Горбач, Т. В., Губина-Вакулик, Г. И. & Денисенко, С. А. (2016). Влияние генномодифицированной сои в рационе питания белых крыс на метаболизм и гистологию печени и почек у родителей и потомков. Проблемы старения и долголетия, 25(1), 80–86.
 27. Горбунова, Н. Б., Батай, Л.Е., Водчиц, А. И., Улащик, В. С. & Орлович, В. А. (2013). Изменение активности супероксиддисмутазы и каталазы в крови и иммунокомпетентных органах крыс с системным воспалением под влиянием непрерывного низкоинтенсивного лазерного излучения видимого диапазона спектра. Фотобіологія та експериментальна фотомедицина, 1- 2, 64–70
 28. Горячковский, А. М. (2005). Клиническая биохимия в лабораторной диагностике (pp. 607). Одесса.

29. Горячковський, А. М. (1994). Справочное пособие по клинической биохимии. (рр. 297–298). Одесса.
30. Громашевський, Л. Л. (1997). «Середні молекули» як один з показників «метаболічної інтоксикації» в організмі. Лабораторна діагностика, 1, 11–16.
31. Губський, Ю. І. (2000). Біологічна хімія (рр. 508). Київ-Тернопіль.
32. Гуральчук, Ж. З. & Мордерер, Є. Ю (2015). Проблема резистентності рослин до гербіцидів: генетичний та метаболічний аспекти. Фактори експериментальної еволюції організмів, 16, 100–104.
33. Данилова, А. & Запорожченко, А. (2012). Стан антиоксидантної системи захисту у щурів з експериментальними патологіями при введенні до складу раціону препаратів з пробіотичними мікроорганізмами. Вісник Львівського університету. Серія біологічна, 60, 90–97.
34. Денисенко, О. І. (2004). Окисна модифікація білків як чинник патогенез у алегро- дерматозів. Український журнал дерматології, венерології, косметології, 3(1), 23–26.
35. Дмухальська Є. Б. (2015). Структурні зміни внутрішніх органів у молодих щурів, уражених солями важких металів та фосфорорганічними пестицидами. Медична та клінічна хімія, 17(2), 47–51.
36. Дмухальська, Є. Б, Ярошенко, Т. Я. & Кузьмак, І. П. (2018). Вплив цистеїл-гістидил-тирозил-гістидил-ізолейцину на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активних форм кисню в щурів різного віку за дії важких металів і гліфосату. Медична та клінічна хімія, 20(2), 77–83. doi 10.11603/mcsh.2410-681X.2018.v0.i2.9134
37. Дмухальська, Є. Б. & Гонський, Я. І. (2016). Вплив важких металів, фосфорорганічних пестицидів і пептиду на активність ферментів глутатіонової системи. Медична та клінічна хімія, 18(1), 70–74.

38. Долайчук О., Федорук Р. & Мартин, Ю. (2012). Гістологічна структура і масометричні коефіцієнти внутрішніх органів щурів за згодовування сої натурального та генетично модифікованого сортів. Вісник Львівського університету, 59, 235–241.
39. Долайчук, О. П., Матюха, І. О. & Федорук, Р. С. (2012). Показники репродуктивної здатності та коефіцієнти маси внутрішніх органів самок щурів у процесі дії компонентів натуральної та трансгенної сої. Науковий вісник Волинського національного університету імені Лесі Українки, 2, 55–60.
40. Долайчук, О. П., Федорук, Р. С. & Киричук, А. П. (2012). Активність ферментів переамінування у тканинах щурів двох поколінь за згодовування сої традиційного та трансгенного сортів. Біологія тварин, 14 (1–2), 306–310.
41. Долайчук, О. П., Федорук, Р. С., Ковальчук, І. І. & Храбко, М. І. (2013). Фізіологічний вплив бобів сої нативного та трансгенного сортів на організм самок щурів третього покоління. Біологія тварин, 15(3), 22–30.
42. Дробітько, А. В., Дробітько, О. М. & Данілов, І. В. (2015). Вплив інокулянтів *intex* і *оптімайз* на врожайність та якість сортів сої в умовах північного степу. Наукові праці. Екологія, 244 (256), 42–45.
43. Дубініна, Є. Є. & Пустигіна, А. В. (2008). Окиснювальна модифікація протеїнов, їх роль при патологічних станах. Український біохімічний журнал, 80(6), 5–18.
44. Дубініна, О. Ю. (2001). Окиснювальний стрес і окиснювальна модифікація протеїнів. Мед. хімія, 3 (2), 5–12.
45. Елдышев, Ю. Н. (2004). Современная биотехнология. Мифы и реальность (pp. 196). Москва.
46. Ермаков, И. В. (2007). ГМ соя пересматривает спорный формат. Биотехнология природы, 25 (12), 1351–1354.

47. Ермакова, И. В. (2007). Новые данные о влиянии ГМО на физиологическое состояние и высшую нервную деятельность млекопитающих: 2-й Всероссийский симпозиум «Физиология трансгенных растений и проблемы биобезопасности», (pp. 38–39), Москва.
48. Ермакова, И.В. (2009). Перспективы развития экологически чистых продуктов питания: 5-й Московский международный. Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (pp. 366–367) Москва.
49. Жиденко, А. А. (2009). Роль катіонів кальцію у формуванні адаптивних реакцій на гербіциди в організмі коропа (*Cyprinus carpio*). Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія, 17(1), 70–79.
50. Загребельний, В. О., Гайдей, О. С. & Усаченко, Н. В. (2014). Аналіз результатів визначення ГМО у сировині рослинного походження у 2013 році. Ветеринарна медицина, 98, 158–161.
51. Зайцева, О. В. (2012). Модифікація спектрофотометричного методу визначення карбонільних груп протеїнів. Український біохімічний журнал, 84(5), 112–117.
52. Зенков, Н. К., Ланкин, В. З. & Меньщикова, Е. Б. (2001). Окислительный стресс (pp. 81). Москва.
53. Зинов'єв, С. Г. (2014). Деякі біохімічні показники крові свиней при використанні гм-сої в їх раціонах. Біологія тварин, 16(1), 76–82.
54. Зинов'єв, С. Г., Семенов С. О., Біндюг О. А. & Біндюг Д. О. (2016). Білковий профіль крові свиней за згодовування їм ГМ-сої. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України, 4, 1–11.
<http://dx.doi.org/10.31548/dopovidi2016.04.027>

55. Зинь, А. (2012). Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз і мембранний транспорт у живих організмах. Вісник Львівського університету. Серія біологічна, 60, 21–39.
56. Іванов, Д. (2005). Хронічне захворювання нирок. Ліки, 35, 19-21.
57. Ільницька, М. Р., Никула, Т. Д., Мойсеєнко, В. О. & Кисіль, С. С. (2011) Сечова кислота як тригерний фактор розвитку розвитку судинної патології та хронічної хвороби нирок. Український науково-медичний молодіжний журнал, 2, 38–43.
58. Каралин, А. А., Короткина, Р. Н. & Мацкевич, Г. Н. (2003). Торможение активности γ – Глутамилтрансферазы из различных новообразований легких и вилочковой железы человека некоторыми аналогами глутамина и фолиевой кислоты. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии, 3, 21–25.
59. Каримов, И. З. (2004). Изменение окислительной модификации белков сыворотки крови и состояние ДНК лейкоцитов при острых вирусных гепатитах. Современные инфекции, 3, 4–9.
60. Карімов, І. З., Аршинов, П. С. & Лось-Яценко, Н. Г. (2004). Зміна окисної модифікації білків сировотки крові та ДНК лейкоцитів при гострих кишкових інфекціях. Інфекційні хвороби, 12(3), 44–48.
61. Кармазіна, І. С. & Кулініч, В. А. (2009). Кореляційний аналіз показників білкового обміну при канцерогенезі та при запаленні. Природничий альманах, 12, 112–118.
62. Квасницька, О. Б. & Коломієць, М. Ю. (2001). Зміни показників протеолітичної та фібролітичної активності крові при хронічному гепатиті й цирозі печінки. Буковинський медичний вісник, 5 (1), 69–72.
63. Козуб, Н.О., Пилипенко, Л.А., Созінов, І.О., Блюм, Я.Б. & Созінов, О.О. (2012). Генетично модифіковані рослини та проблеми захисту рослин: досягнення і оцінка потенційних ризиків. Цитологія та генетика, 4, 73–86.

64. Колішецька, М. А. (2013). Динаміка змін прооксидантної системи та антиоксидантної системи у легенях морських свинок у пізній період формування експериментальної бронхіальної астми. Медицина транспорту України, 4, 5–9.
65. Корда, М. М., Дмухальська, Є. Б. & Ярошенко, Т. Я. (2018). Вплив пептидів на стан імунної системи організму та вміст білкових фракцій крові щурів, уражених солями важких металів і Раундапом. Медична та клінічна хімія, 20 (3), 70–75. doi 10.11603/mcch.2410-681X.2018.v0.i3.9568
66. Коробчанський, В.О., Герасименко, О.І. & Горбач, Т.В. (2012). Дослідження впливу споживання харчових продуктів з генетично модифікованими компонентами на біохімічні показники крові в умовах хронічного гастроентероколіту. Екологія и техногенная безопасность. Охрана водного и воздушного бассейнов. Утилизация отходов: сб. науч. трудов XX юбилейной международной научно-технической конференции (pp. 523–530). Бердянск.
67. Королюк, М. А., Иванова, Л. И. & Майорова, И. Г. (1988). Метод определения активности каталазы. Лабораторное дело, 1, 16–19.
68. Коцюмбас, Г.І., Самсонюк, І.М. & Шкіль, М.І. (2017). Відтворювальна здатність і структурно-функціональний стан матки щурів, які споживали корми з 20% вмістом ГМ-сої. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького, 19 (73), 126–130. doi:10.15421/nvlvet7326
69. Коцюмбас, І.Я. (2006). Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів (pp. 360). Львів.
70. Кравченко, О., Тимошенко, М. & Гайдо, Л. (2012). Вміст різних форм глутатіону та активність глутатіонредуктази в клітинах слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу. Вісник Київського національного університету імені Т. Шевченка, 61, 34–37.

71. Кузнецов, В. В. (2005). Генетически модифицированные риски и продукты, полученные из них: реальные и потенциальные риски. *Российский Химический Журнал*, 69(4), 70–83.
72. Кузнецова, Е. М. & Чмиль, В. Д. (2010). Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков современные проблемы токсикологи, 1, 87–95.
73. Кулик, М. Ф., Кулик, Я. М., Обертюх, Ю. В. & Хіміч, В. В. (2015). Вплив довготривалого згодовування трансгенної сої на відтворювальну здатність свиней. *Розведення і генетика тварин*, 49, 213–220.
74. Кулик, М. Ф., Скоромна, О. І., Обертюх, Ю. В., Жуков, В. П. & Гончар, Л. О. (2016). Ефективність використання сої в годівлі високопродуктивних корів та різна біологічна цінність соєвого білка і молока в молочний період вирощування телят. *Корми і кормовиробництво*, 82, 210–219.
75. Кулик, М.Ф., Корнійчук, О.В., Бугайов, В.Д., Обертюх, Ю.В., Хіміч О.В., Лілик, Т.В. & Кулик, Я.М. (2013). Пригнічення росту проростків зерна пшениці, тритикале і жита під впливом водної витяжки раундапостійкої ГМ сої порівняно з не ГМ соєю. *Вісник аграрної науки*, 6, 21–25.
76. Кулик, Ю. М., Рауцкієне, В. Т., Обертюх, Ю. В. & Хіміч, О. В. (2015). Наявність у потомства щурів невстановленого фактора трансгенної сої під час її годування протягом кількох поколінь. *Вісник біологічних та медичних проблем*, 4(124), 105–109.
77. Кулик, Я. М., Хіміч, О. В. & Дідоренко, Т. О. (2018). Негативний вплив довготривалого згодовування курчатам і куркам-несучкам генетично модифікованої раундапостійкої сої на виводимість курчат і їх життєздатність. *Вісник проблем біології і медицини*, 2 (147), 110–112. doi 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-110-112

78. Кулик, Я. М., Гаврилюк, А.О., Рауцкієне, В.Т. & Хіміч, О. В. (2014). Морфофункціональні зміни печінки, нирок та наднирників експериментальних тварин при довготривалому згодовуванні раундапостійкої генетично модифікованої сої. Вісник морфології, 20(1), 149–153.
79. Кулик, Я. М., Кулик, М. Ф., Хіміч О. В., Обертюх Ю. В. & Власенко В. В. (2015). Згодовування поросятam генетично модифікованої сої впродовж трьох поколінь викликає відсутність статевого потягу в кнурів. Аграрна наука та харчові технології, 1(90), 25–36.
80. Кулик, Я. М., Рауцкієне, В.Т., Гаврилюк, А. О. & Борейко, М. Р. (2014). Морфофункціональні зміни тучних клітин легень та серця при довготривалій дії гербицидів дипиридилфосфату та раундапу в малих дозах. Вісник морфології, 20(2), 392–395.
81. Кулик, Я. М. & Чернолата, Л. П. (2018). Наявність неприродних пептидів у білку бобів генетично модифікованої раундапостійкої сої. Вісник проблем біології і медицини, 2(144), 114–117. doi 10.29254/2077-4214-2018-2-144-114-117
82. Куріліна, Т.В. (2006). Інтенсивність окисної модифікації білків у доношених новонароджених при звичайному ендокринному невиношуванні вагітності у матерів. Педіатрія, 2, 73–76.
83. Кучерявченко, В. В. (2009). Роль маркерів ендогенної інтоксикації в ідентифікації тяжкості перебігу травматичної хвороби у постраждалих із травмою печінки при політравмі. Медицина сьогодні і завтра, 3–4, 96–99.
84. Лавришин, Ю. Ю., Вархоляк, І. С. & Мартишук, Т. В. (2016). Біологічне значення системи антиоксидантного захисту організму тварин. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького, 18(2), 100–111. doi:10.15421/nvlvet6622

85. Левченко, В. І., Влізло, В. В. & Кондрахін, І. П. (2002). Ветеринарна клінічна біохімія (13–16). Біла Церква.
86. Лисенко, В.Ф. (2008). Використання сої в комбікормах для молочних корів. Проблеми зоінженерії та ветеринарії. Харків, зб. Наук перспект КДЗВА, 17 (42), 61–65.
87. Лифинц, В. М. & Сидельков, В. И. (2002). Биохимические анализы в клинике. Справочник. (pp. 208). Москва.
88. Ляхович, Р. М., Джус, М. Я., Кіцак, Я. М. & Нецюк, О. Г. (2017). Отруєння фосфорорганічними сполуками: варіанти перебігу, діагностична та лікувальна тактика бригади екстреної (швидкої) медичної допомоги. Медична та клінічна хімія, 19(1), 87–94. doi 10.11603/mcch.2410-681X.2017.v0.i1.7683
89. Макаrchук, В. А., Ушакова, Г. О. & Кирилова, О. О. (2013). Системи глутатіону крові щурів та морфологічні зміни підшлункової залози в умовах експериментального гострого та хронічного панкреатиту. Український біохімічний журнал, 85(1), 71–78.
90. Максимовских, С. Ю., Кудрин, Б. И. & Евдокимов, А. Н. (2015). Исследование острой токсичности глифосата. АПК России, 72(1), 102–105.
91. Максимовских, С. Ю., Кудрин, Б. И. & Плотникова, О. М. (2015). Изменение морфологических и биохимических параметров крови мелких млекопитающих под влиянием глифосата. Известия оренбургского государственного аграрного университета, 4 (54), 93–95.
92. Малик, О. Г. (2006). Фітоестрогени. (pp. 140), Львів.
93. Маніщенкова, Ю. О., Орлова, О. А., Шкала, Л. В. (2010). Окиснювальна модифікація білків у хворих з коморбідною патологією. Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 5(1), 126–129.

- 94.Меньшиков, В. В., Делекторская, В. В. & Золотницкая, Л. Н. (1987). Лабораторные методы исследования в клинике (pp. 368). Москва.
- 95.Меньшикова, Л. Д. (2008). Лабораторные методы исследования в клинике. Клиническая лабораторная диагностика. 3, 43–48.
- 96.Меркулов, Г. А. (1969). Курс патологической техники (pp. 240). Москва.
- 97.Мирошникова, Д. И., Кирюшин, В. А. & Моталова, Т. В. (2018). Вопросы применения гербицидов на основе глифосата. Наука молодых, 6(2), 318–325.
- 98.Моин, В. М. (1986). Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. Лабораторное дело, 12, 724–727.
- 99.Мосьондз, Н. П. (2014). Вплив технологічних заходів на вміст сирого протеїну і жиру у насінні сої в умовах північної частини лісостепу. Збірник наукових праць ННЦ “Інститут землеробства НААН”, 3, 94–99.
100. Муравлева, Л. Е., Молотов-Лучанский, В. Б., Муравлева, Л. Е. & Ключев, Д. А. (2010). Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования. Фундаментальные исследования, 1, 74–78.
101. Назаренко, О. А., Сергеева, Т. А. & Солдаткін, П. (2009). Креатинін та методи його визначення креатинін та методи його визначення. Біотехнологія, 2(1), 107–116.
102. Нетюхайло, Л. Г. & Харченко, С. В. (2014). Активні форми кисню (огляд літератури). Молодий вчений, 9(12), 131–135.
103. Ничитайло, М. Ю., Годлевський, А. І., Саволук, С. І. & Кацал, В. А. (2011). Особливості метаболічних змін та обґрунтування принципів перед операційної підготовки хворих з непухлинною обтураційною жовтяницею в залежності від вихідного ступеню печінкової дисфункції. Український журнал хірургії, 5, 48–54.

104. Нікуліна, Т. Г. & Черниш, О. Є. (2000). Показники протеолізу та його плазмених інгібіторів крові у хворих з імунозалежними захворюваннями нирок. *Лабораторна діагностика*, 1, 3–5.
105. Обертюх, Ю. В. (2012). Антипоживні речовини сої, їх інактивація та технології переробки соєвих бобів на промисловій основі й в умовах господарства. *Корми і кормовиробництво*, 71, 62 – 71.
106. Обертюх, Ю. В. (2001). Інактивація антипоживних речовин у соєвому молоці. *Корми і кормовиробництво*, 47, 250–253.
107. Обертюх, Ю. В. & Кулик, М. Ф. (2002). Основні способи знешкодження антипоживних речовин зерна сої. *Корми і кормовиробництво*, 49, 148–155.
108. Олексійчук, О. В. Удосконалення технології солоду із сої (2007): автореф. дис. канд. техн. наук: 05.18.07; Нац. ун-т харч. технологій. (пр. 19). Київ.
109. Паласюк, Б. О. (2011). Перекисне окиснення ліпідів та окисна модифікація білків в ротовій рідині в дітей середнього шкільного віку з хронічним катаральним гінгівітом. *Вісник ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»*, 12(4), 50–54.
110. Паолики, А., Франзини, М. & Корти, А. (2008). Новый маркер развития атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний — ферментативная активность гамма-глутамилтрансферазы. *The new American medical journal*, 2(3), 35–42.
111. Параняк, Р. П., Вудмаска, І. В., Параняк, М. Р. & Кульчинський, В. В. (2009). Оцінка композиційної еквівалентності генетично модифікованої (GTS 40-3-2) та немодифікованої сої за амінокислотним і жирокислотним складом. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини*, 1, 118–120.

112. Пахомов, О. Є. (2006). Виготовлення зоологічних наочних посібників та наукових колекцій: Навч. посіб. (пр. 318). Дніпропетровськ.
113. Пашовкина, М. С. & Акоев, И. Г. (2001). Исследования изменений активности аспаратаминотрансферазы сыворотки крови человека при низких амплитудно-модулированных СВЧ ЭММ-воздействиях. Радиационная биология. Радиоэкология, 41(1), 59 – 61.
114. Петибская, В. С. (2012). Соя: химический состав и использование (пр.432). Майкоп.
115. Петриченко, В. Ф. (2011) Наукові основи сталого соєсіяння в Україні. Корми і кормовиробництво, 69, 3-10.
116. Петриченко, В. Ф., Кулик, М.Ф. & Мельник, Ю.Ф. (2010). Рекомендації щодо використання бобів сої в годівлі свиней, телят і птиці (пр. 58). Вінниця.
117. Плотникова, О. М., Савинова, И. В. & Матвеев, Н. Н. (2011). Особенности влияния различных доз метилфосфоновой кислоты на основные биохимические показатели метаболизма лабораторных мышей. Вестник Челябинского государственного педагогического университета, 1, 307–316.
118. Поликарпова, А. В., Перский, Е. Э. (2009). Сравнительное изучение динамики перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы при ожогах различной природы. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, 878 (10), 40–47.
119. Рагино, Ю. И. Баум, В.А. & Полонская, Я. В. (2006). Атеросклероз и окислительные процессы. Новые способы оценки окислительной модификации белков. Бюллетень СО РАМН, 122(4), 67–73.
120. Романовська, Т.І. (2012). Контроль якості та безпеки продуктів галузі: Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для

студентів напряму 6.051701 «Харчова технологія та інженерія» ден. та заочної форм навчання. Київ. НУХТ, 25.

121. Салига, Н. О. & Снітинський, В. В. (2010). Генетично модифіковані рослини та їх вплив на організм тварин. Біологія тварин, 12(2), 67–74.
122. Самсонюк, І. М. & Коцюмбас, Г. І. (2014). Ультраструктурна характеристика печінки щурів третього покоління за впливу генетично модифікованої та традиційної сої. Біологія тварин, 16 (2), 93–100
123. Самсонюк, І. М. (2013). Структурно-функціональний стан шлунково-кишкового тракту щурів першого покоління за згодовування генетично модифікованої та традиційної сої. Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок, 14 (3-4), 238–243.
124. Самсонюк, І. М. & Стронський, Ю. С. (2013). Активність трансаміназ та лужної фосфатази сироватки крові щурів трьох поколінь, що харчуються генетично модифікованою соєю. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицький, 15(57), 279–283.
125. Сафронова, О. В., Самофалова, Л. А. & Бобков, С. В. (2013). Биологическая модификация семян сои и получение целевых напитков. Вестник ВГУИТ, 2, 195–199.
126. Семенов, С. О., Біндюг, О. А., Зінов'єв, С. Г., Басова, Л. В. & Семенов, Є. С. (2014). Інтенсивність росту та відтворювальна здатність свиней за умов споживання ГМ-сої. Свинарство, 64, 143–152.
127. Сеченова, И. М. (2010). Влияние терапии β -блокаторами на процессы окисления липидов и белков у больных с хронической сердечной недостаточностью. Сердечная недостаточность, 1, 45–51.

128. Сохор, Н. Р. (2014). Активність супероксиддисмутази при різних підтипах ішемічного інсульту у гострому періоді. Здобутки клінічної та експериментальної медицини, 2, 168–172.
129. Сохор, Н. Р., Шкробот, С. І., Бударна, О. Ю. & Мусієнко, А. М. (2014). Активність різних підтипів супероксиддисмутази у гострому періоді ішемічного інсульту. Буковинський медичний вісник, 4 (72), 147–151.
130. Спиридонов, В. Г., Хоменко, Я. В., Іщенко, В. Д., Гончаренко, В. С., Шимко, Н. М. & Рибальченко, Д. Ю. (2015). Конструювання імуноферментного діагностикуму для виявлення гліфосат-резистентної генетично-модифікованої сої. Scientific Journal «ScienceRise», 6(16), 12–17.
131. Сторчоус, І. М. (2018). Обговорення актуальних проблем гербологами. Карантин і захист рослин, 4(5), 24–28.
132. Сторчоус, І. М. Заходи щодо зменшення побічного впливу пестицидів на культури. Журнал агроном, 2016, 4, 48–52
133. Сторчоус, І. М. & Сторчоус, І. М. (2016). Вплив фосфорорганічних гербіцидів на мікроорганізми та збудників хвороб. Журнал агроном, 3, 12–15.
134. Сторчоус, І. М. & Тищук, О. П. (2015). Побічний вплив фосфорорганічних гербіцидів на ґрунтові мікроорганізми та збудників листових хвороб. Карантин і захист рослин, 7, 10–13.
135. Супонько, Ю. В. & Штеменко, Н. І. (2010). Вплив нанопрепаратів кластерних сполук ренію на активність ферментів печінки в моделі пухлинного росту. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина, 2(1), 76–80.
136. Темченко, І. О. (2002). Зміни вмісту молекул середньої маси після хірургічного лікування хворих з пухлинами яєчників. Медична хімія, 4(3), 87 – 88.

137. Тимошенко, М., Гайда, Л., Кравченко, О. & Остапченко, Л. (2012). Вміст різних форм глутатіона та активність глутатіонредуктази в клітинах слинової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу. Біологія, 61, 34–37.
138. Турыцина, И. М., Росток, Л. М., Федорович, Т. М. & Турыница, С. М. (1991). Среднемолекулярные пептиды сыворотки крови крыс при остром повреждении печени и введения йодированного масла. Украинский биохимический журнал, 63, 102–104.
139. Хиггинс К. (2008). Расшифровка клинических лабораторных анализов (pp. 376). Москва.
140. Черний, В. И., Момот, Н.В., Колесникова Т.И. & Кузнецова И.В. (2013). Клиренс свободной воды как критерий оценки нормализации функционального состояния почек при острой почечной недостаточности в стадии восстановления диуреза и периоде реабилитации. Лабораторная диагностика, 4 (66), 3–10.
141. Чернолата, Л. П. (2012). Хімічний склад генетично модифікованих рослинних організмів та їх аналогів. Тваринництво України, 9, 27–31.
142. Чернолата, Л. П., Запарнюк, В. І., Галемба, Т. М. & Герасименко, З. І. (2011). Насіння сої цінне джерело амінокислот для тваринного організму. Корми і кормовиробництво, 69, 200–204.
143. Чернолата, Л. П., Килимнюк, О. І. & Германюк, О. А. (2015). Порівняння поживної цінності продуктів переробки сої та використання їх у годівлі свиней. Вісник аграрної науки лютий, 2, 32–36.
144. Чубар, О. М. (2006). Глутатіонова ланка системи антиоксидантного захисту тканин печінки перепелів при хронічному навантаженні нітратом натрію та застосуванні зерна амаранту. Наук. вісник Львів. нац. акад. ветеринар. медич. ім. С.З. Гжицького, 2(29), 174–179.

145. Шамелашвілі, К. Л., Леус І. В., Сергієнко, Т. І., Горіла М. В. & Семенко, Н. І. (2015). Супероксиддисмутаза та каталаза крові: активність ферментів в умовах оксидативного стресу. Науковий журнал «ScienceRise», 5(10), 11–15. doi: 10.15587/2313-8416.2015.42526
146. Шеманська, Є. І., Радзієвська, І. Г. & Бабенко, В. І. (2011). Загальні технології харчової промисловості: Методичні рекомендації Лабораторних робіт з розділу “Технологія жирів і жирозамінників” для студентів напряму 6.051701 , “Харчові технології та інженерія” усіх форм навчання. Київ, НУХТ, 43 .
147. Шепельова, І.А., Деркач, Є.А. & Мельникова, Н.М. (2006). Амінокислотний склад крові та показники азотового обміну у щурів, отруєних кадмію сульфатом. Современные проблемы токсикологии, 4, 35–37.
148. Шерман, Б. С. & Трещинский, А. И. (2001). Взгляд на проблему токсикоза и интоксикации. Современные проблемы токсикологии, 1, 3–9.
149. Шостя, А. М. (2014). Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз в спермії кнурців Миргородської породи у період становлення статевої функції. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького, 16(2), 227–234.
150. Яровая, А. Г., Нешкова, Е. А. & Мартынова, Е. А. (2011). Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза. Лабораторная медицина, 11, 39–52.
151. Яровая, А.Г., Нешкова, Е.А. & Мартынова, Е.А. (2011). Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза. Лаб. Медицина, 11, 39–52.
152. Ященко, Ю. Б. (2005). Окисна модифікація білків легеневого експірату у новонароджених при критичних станах. Современная педиатрия, 9(4), 129–131.

153. Anne, C., Cornille, F. & Lenoir, C. (2001). High-Throughput Fluorogenic Assay for Determination of Botulinum Type B Neurotoxin Protease Activity. *Analytical Biochemistry*, 291(2), 253–261.
154. Bardocz, S., Grant, G. & Pusztai, A. (1996). The effect of phytohaemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat. *British Journal of Nutrition*, 76, 613–626.
155. Bedard, K. & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87 (1), 245–313.
156. Benachour, N. (2009). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22 (1), 97–105.
157. Bohn, T. (2014). Compositional differences in soybeans on the market: glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. *Food chemistry*, 153, 207–215. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.054
158. Bus, J.S. (2015). Analysis of Moms across America report suggesting bioaccumulation of glyphosate in U.S. mother's breast milk: Im-plausibility based on inconsistency with available body of glyphosate animal toxico-kinetic, human biomonitoring, and physico-chemical data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 758–764. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.10.022.
159. Choe, E. & Min, D. B. (2006). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(1), 1–22.
160. Clair, É., Mesnage, R. & Travert, C. (2012). A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicology in Vitro*, 26(2), 269–279.

161. Dallegrave, E., Mantese, F. D. & Oliveira, R. T. (2007). Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Archives of Toxicology*, 81, 665–673.
162. De Liz Oliveira Cavalli, V. L., Cattani, D. & Heinz Rieg, C. E.(2013). Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 335–346. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.043.
163. Dimov, D. M. & Kulhanek, V. (1967). Comparison of Four Methods for the Estimation of glutamyl Transpeptidase Activity in Biological. *Clinica Chimica Acta*, 16, 271–277.
164. Dmukhalska, Ye. B. & Honskyi, Ya. I. (2016).Effect of peptides on antioxidant system enzymes in rats with heavy metals, phosphoorganic pesticides intoxication. *Медична та клінічна хімія*, 18(2), 22–27. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2016.v0.i2.6666>
165. Ermakova, I. V. (2007). Most offspring of rats fed Roundup Ready soy died within three weeks. In *Genetic Roulette. The Documented Health Risks of Genetically Engineered Foods*. USA, Fairfield, IOWA, 48–50.
166. European convention for the protection of vertebrate animals used forexperim. and other scientific purposes. Coun. of Europe-Strasbourg, 1986, 53.
167. Ewen, S. W. (1999). Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine. *Lancet*, 354, 9187–9196.
168. Fedketik, K. *Biochemistry and physiology of action of herbicides*. Moscow, 1985, 223.
169. Habig, H. W., Pabst, M. J. & Jacoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130–7139.
170. Jayasumana, C., Paranagama, P., Agampodi, S. et al. (2015). Drinking well water and occupa-tional exposure to Herbicides is

- associated with chronic kidney disease, in Padavi-Sripura, Sri Lanka. *Environmental Health*, 14, 6.
171. Landrigan, I. & Philip, J. (2015) GMOs, Herbicides, and Public Health. *New England Journal of Medicine*, 373(8), 693–695. doi: 10.1056/NEJMp1505660.
 172. Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A. & Virkel, G. (2012). Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 811–818. doi: 10.1016/j.etap.2012.09.005
 173. Lowry, O. H., Rosenbrough, M. J., Farr A. L. & Rendal, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265–275.
 174. Murphy, M. E. & Kehrer, J.P. (1989). Oxidation of Tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with Inherited muscular. *Biochemical Journal*, 260 (2), 359–364.
 175. Natarajan, S. (2007). Proteomic and genetic analysis of glycinin subunits of sixteen soybean genotypes. *Plant Physiol Biochem*, 45 (6–7), 436–444.
 176. Reitman, S. A. & Frankel, S. Colorimetric (1957). Method for the Determination of Serum lumatic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*, 28–56.
 177. Richard, S. Moslemi, S. & Sipahutaret, H. (2005). Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ health perspect*, 113(6), 716–720.
 178. Saz, J. M. & Marina, M. L. (2007). High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis in the analysis of soybean proteins and peptides in foodstuffs. *Journal of Separation Science*, 30 (4), 431–451.

179. Séralini Gilles-Eric, Clair E., Mesnage R., Gress S., Defarge N, Malatestab M. & Hennequin D., Joël (2012). Spiroux de Vendômois Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4221–4231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.005>
180. Sorensen, M. T., Hojberg, O. & Poulsen, H. D. (2016). Glyphosate in the food - can it prevent the animal health? The NOAH environmental organization «GMO Is there still cause for caution?». Slotsholmen, 2-20.
181. Tolstrup, K. (2014). Feed of livestock with products from genetically modified soy Center for Food Production and Farming. 2-4
182. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
183. Vecchio, L. & Cisterna, B. (2003). Ultrastructural analysis of testes from mice fed on genetically modified soybean. *European Journal of Histochemistry*, 48, 449–453.
184. Vencill, W. K., Nichols, R. L., Webster, T. M., Soteres, J. K., Mallory-Smith C., Burgos, N. R., Johnson, W. G. & McClelland, M. R. (2012). Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicideresistant crops. *Weed Science*, 60 (1), 2–30. <https://doi.org/10.1614/WS-D-11-00206.1>
185. Volchov, V. A. & Kirillov, Y. A. (1998). Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy of the Domestic Preparation of Lung Surfactants. *Journal of Liposome Research*, 8, 120 – 121.

Додаток А



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

УКРАЇНСЬКА ЛАБОРАТОРІЯ ЯКОСТІ І БЕЗПЕКИ ПРОДУКЦІЇ АПК

Фактична адреса: вул. Машинобудівників, 7, смт Чабани, Києво-Святошинський р-н, Київська область, 08162, Україна.
Юридична адреса: вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна. Тел./факс: +38(044) 5264502, 5264503
E-mail: info@quality.ua http://www.quality.ua/



218724
ДСТУ ISO/IEC 17025

ПРОТОКОЛ ВИПРОБУВАНЬ №
ДАТА ВИДАННЯ ПВ
ЗАМОВЛЕННЯ №
ДАТА ОТРИМАННЯ ЗРАЗКІВ
ДАТИ ПРОВЕДЕННЯ
ВИПРОБУВАНЬ

1691-Н
04.12.17
6065
26.10.17
27.10-17.11.17

НАЗВА ТА АДРЕСА ЗАМОВНИКА:

Приватні особи: Омельченко Наталія Миколаївна та Чорна Ірина Віталіївна
вул. Хотинська, 49 М, кв. 29, м. Чернівці

ОПИС ОБ'ЄКТІВ ВИПРОБУВАНЬ ТА ЇХ ІДЕНТИФІКАЦІЯ:

Зазначена інформація про зразки вказана згідно з супровідними документами та їх маркуванням. Місце відбору: Буковинська дослідна станція агропромислового виробництва. Зразки відібрані та доставлені Замовником у неопломбованих поліетиленових пакетах.

6065/1 Соеві боби

Обсяг наданого зразка на випробування: 3 кг.

6065/2 Соеві боби

Обсяг наданого зразка на випробування: 3 кг.

СУПРОВІДНІ ДОКУМЕНТИ:

Лист-Заявка № 6/н від 26.10.2017 р., яка зареєстрована в УЛЯБП АПК за № 6065 від 26.10.2017 р.
Акт відбору зразків не надано.

РЕЗУЛЬТАТИ ВИПРОБУВАНЬ

Реєстраційний код зразка: 6065/1

Визначення показників якості:

Найменування показників, одиниці вимірювань	Результати випробувань	Похибка випробувань	⁽¹⁾ Норми за НД
Вологість, %	10,47	±0,05	не більше 12,0
Масова частка білка в перерахунку на суху речовину, %	40,67	±0,23	не менше 35,0
Масова частка олії, на натуральну вологість, %	18,17	±0,03	не нормується
Масова частка олії, в перерахунку на суху речовину, %	22,17	±0,03	не менше 12,0
Масова частка сирової клітковини, на натуральну вологість, %	11,92	±0,38	не нормується

Виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їх вмістом:

Скринінг фрагментів ДНК	Результати випробувань	Межа виявлення, %
Цільова послідовність 35 S промотору (вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV))	не виявлено	0,05
Цільова послідовність Nos термінатора (нопалінсинтази (Nos) Agrobacterium tumefaciens)	не виявлено	0,05
Цільова послідовність ГМ-лінії MON 89788	не виявлено	0,05

Реєстраційний код зразка: 6065/2

Визначення показників якості:

Найменування показників, одиниці вимірювань	Результати випробувань	Похибка випробувань	⁽¹⁾ Норми за НД
Вологість, %	9,97	±0,01	не більше 12,0
Масова частка білка в перерахунку на суху речовину, %	34,63	±0,16	не менше 35,0
Масова частка олії, на натуральну вологість, %	21,49	±0,07	не нормується
Масова частка олії, в перерахунку на суху речовину, %	25,65	±0,07	не менше 12,0
Масова частка сирової клітковини, на натуральну вологість, %	14,51	±0,01	не нормується

Оформила: Артюх Н.К.
тел.: +38 (044) 526-45-02

Протокол випробувань № 1691-Н
стор 1 з 2

Продовження додатка А

Виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їх вмістом:		
Скринінг фрагментів ДНК	Результати випробувань	Межа виявлення, %
Якісний аналіз:		
Цільова послідовність 35 S промотору (вірусу мозаїки цвітної капуста (CaMV))	виявлено	0,05
Цільова послідовність Nos термінатора (нопаїнсинтази (Nos) Agrobacterium tumefaciens)	виявлено	0,05
Цільова послідовність ГМ-лінії MON 89788	не виявлено	0,05

Найменування показників, одиниці вимірювань	Результати випробувань	Цільова послідовність, за якою проводили кількісне визначення	Межа кількісного визначення, %
Кількісний аналіз:			
Масова частка ГМО, %	більше 10,0%	ГМ лінія сої GTS 40-3-2 (стійкість до гліфосату, гербіцид Roundup®)	0,1%

МЕТОДИ ВИПРОБУВАНЬ:

Визначення вологості – ДСТУ 4811:2007 Насіння олійних культур. Методи визначення вологості.
Визначення масової частки білка на натуральну вологість – ГОСТ 10846-91 Зерно и продукты его переработки. Методы определения белка (Зерно і продукти його переробки. Методи визначення білка).
Визначення масової частки олії – ДСТУ 7577:2014 Насіння олійне. Визначення вмісту олії методом екстракції в апараті Сокслета.

Визначення масової частки сирової клітковини – ГОСТ 13496.2-91 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения сырой клетчатки (Корми, комбикорми, комбикормова сировина. Метод визначення сирової клітковини).

Скринінг фрагментів ДНК проводили на обладнанні CFX96™ Real-Time System (Bio Rad) відповідно до ДСТУ ISO 21569:2008 Продукты харчування. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їх вмістом. Якісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти (ISO 21569:2005, IDT). ДСТУ ISO 21571:2008 Продукты харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їх вмістом. Екстрагування нуклеїнової кислоти (ISO 21571:2005, IDT).

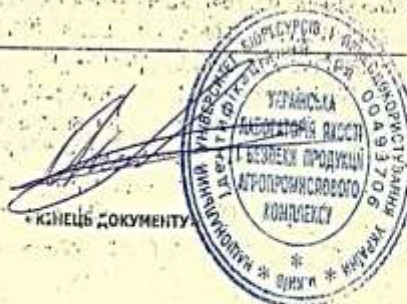
Кількісне визначення проводили на обладнанні CFX96™ Real-Time System (Bio Rad) відповідно до ДСТУ ISO 21570:2008 Продукты харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їх вмістом. Кількісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти (ISO 21570:2005, IDT). ДСТУ ISO 21571:2008 Продукты харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їх вмістом. Екстрагування нуклеїнової кислоти (ISO 21571:2005, IDT).

Прийняти:

1. Протокол випробувань стосується тільки зразків, які представлені на випробування.
2. Протокол випробувань не підлягає повному або частковому передрукуванню без дозволу Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК.
3. Без оригіналу відписку печатки і оригіналу підпису Директора УЛЯБП АПК Протокол випробувань не дійсний.

¹ ДСТУ 4564:2008 Соя. Технічні умови.

Директор УЛЯБП АПК



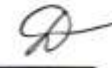
В.С. УШКАЛОВ

* КІНЕЦЬ ДОКУМЕНТУ *

Додаток Б

ВЦ ДУ «Харківський ОЛЦ МОЗ України»

Ф 12 ПЯ 7.2-3.3 (редакція 1-2019)

Міністерство охорони здоров'я України Випробувальний центр ДУ «Харківський ОЛЦ МОЗ України» Санітарно-гігієнічна лабораторія 61038, м. Харків, вул. Самсонівська, буд. 43		 201129		МЕДИЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ ФОРМА № 343/о Затверджена наказом МОЗ України 11.07.2000 р. № 160	
ПРОТОКОЛ ВИПРОБУВАННЯ № СГЛ ВТПс 2111/2021 від "03" березня 2021 року					
Замовник, юридична адреса: <u>гр. Чорна І.В., м. Чернівці, вул. Хотинська, буд. 49-М, кв. 29</u>					
Місце відбору зразка: <u>Буковинська державна сільськогосподарська дослідна станція НААН, м. Чернівці, вул. Богдана Крижанівського, 21, лабораторія</u>					
Виробник: <u>Буковинська державна сільськогосподарська дослідна станція НААН, м. Чернівці, вул. Богдана Крижанівського, 21</u>					
Час відбору зразка: <u>24.02.2021 12-15</u> дата надходження зразка: <u>24.02.2021 14-30</u>					
Назва зразка: <u>СГЛ ВТПс 2111 - насіння генетично модифікованої сої (дослідний зразок №1)</u>					
величина партії _____ дата виготовлення _____ врожай 2020					
номер партії _____					
Стан отриманого зразка: <u>задовільний та придатний до випробування</u>					
Кількість: <u>1025 г</u>					
Мета випробування зразка: <u>перевірка зразка за санітарно-хімічними показниками на відповідність ДСанПІН 8.8.1.2.3.4-000-2001</u>					
Додаткова інформація: <u>зразок відібрано представником замовника, направлення від 24.02.2021 № 2111 згідно з договором від 15.02.2021 № 83/3.1</u>					
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ					
Назва показників інгредієнтів та інше	Виявлена концентрація	Одиниці вимірювання	Норма по НД на продукт	Невизначеність*	НД на методи випробування
Гліфосат**	<0,3	мг/кг	0,3	-	МВ № 4413-87
<i>Результати стосуються зразків, що були випробувані</i> <i>Результати не підлягають повному або частковому передрукуванню без дозволу ВЦ ДУ «Харківський ОЛЦ МОЗ України»</i> * За вимогою замовника ** Поза сферою акредитації					
Випробування проводив біолог "ЗАТВЕРДЖУЮ"			 Івченко Н.В. (підпис)		
Завідувач санітарно-гігієнічної лабораторії			 Зверєва Л.В. (підпис)		
ВИСНОВОК ЛІКАРЯ <u>Досліджений зразок за визначеними показниками відповідає вимогам ДСанПІН 8.8.1.2.3.4-000-2001 "Допустимі дози, концентрації, кількості та рівні вмісту пестицидів у сільськогосподарській сировині, харчових продуктах, повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді водоймищ, ґрунті."</u>					
Лікар			 (підпис)		

Протокол випробування

Додаток В

ВЦ ДУ «Харківський ОЛЦ МОЗ України» Ф 12 ПЯ 7.2-3.3 (редакція 1-2019)

Міністерство охорони здоров'я України Випробувальний центр ДУ «Харківський ОЛЦ МОЗ України» Санітарно-гігієнічна лабораторія 61038, м. Харків, вул. Самсонівська, буд. 43	 201129	МЕДИЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ ФОРМА № 343/о Затверджена наказом МОЗ України 11.07.2000 р. № 160
---	---	---

ПРОТОКОЛ ВИПРОБУВАННЯ № СГЛ ВТПс 3053/2021
 від "23" березня 2021 року

Замовник, юридична адреса: гр. Чорна І.В., м. Чернівці, вул. Хотинська, буд. 49-М, кв. 29

Місце відбору зразка: Буковинська державна сільськогосподарська дослідна станція НААН, м. Чернівці, вул. Богдана Крижанівського, 21, лабораторія

Виробник: Буковинська державна сільськогосподарська дослідна станція НААН, м. Чернівці, вул. Богдана Крижанівського, 21

Час відбору зразка: 12.03.2021 12-15 дата надходження зразка: 12.03.2021 14-30

Назва зразка: СГЛ ВТПс 3053 - насіння генетично модифікованої сої (дослідний зразок №1)
 величина партії _____ дата виготовлення _____ врожай 2020
 номер партії _____

Стан отриманого зразка: задовільний та придатний до випробування

Кількість: 1 кг

Мета випробування зразка: перевірка зразка за санітарно-хімічними показниками на відповідність ДСанПіН 8.8.1.2.3.4-000-2001

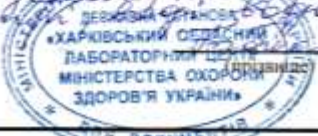
Додаткова інформація: зразок відібрано представником замовника, направлення від 12.03.2021 № 3053 згідно з договором від 09.03.2021 № 132/3.1

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ					
Назва показників інгредієнтів та інше	Виявлена концентрація	Одиниці вимірювання	Норма по НД на продукт	Невизначеність*	НД на методи випробування
Гліфосат**	0,78	мг/кг	0,3	-	МВ № 4413-87

Результати стосуються зразків, що були випробувані
 Результати не підлягають помилці або частковому передрукуванню без дозволу ВЦ ДУ «Харківський ОЛЦ МОЗ України»
 * За вказом замовника
 ** Показ сферою акредитації

Випробування проводив біолог Івченко Н.В. (підпис)
 "ЗАТВЕРДЖУЮ" Зверева Л.В. (підпис)
 Завідувач санітарно-гігієнічної лабораторії

ВИСНОВОК ЛІКАРЯ Досліджений зразок за висхідним гліфосату № 3053 відповідає вимогам ДСанПіН 8.8.1.2.3.4-000-2001, (додатковий доз, концентрації та рівні) висхідного фосфату у зразку сільськогосподарської продукції харчового призначення, родючої рослин, агросферному навколишньому середовищу, ґрунті.
 Лікар Д - (підпис)



Протокол випробування