

УДК 577.175.52/.53:57.084:604.6:582.736.3

*Г.И. Губина-Вакулик, С.А. Денисенко, Т.В. Горбач, Н.Г. Колоусова,  
А.В. Андреев*

*Харьковский национальный медицинский университет*

## **МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ У ВЗРОСЛЫХ ПОТОМКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ В РАЦИОН ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННОЙ СОИ**

Поставлен эксперимент на крысах линии Вистар с введением в рацион немодифицированной и генно-модифицированной сои беременным самкам в период вынашивания потомства и потомкам в течение 2–3 месяцев жизни. Сделан вывод, что употребление немодифицированной и генно-модифицированной сои вызывает напряженность адаптационных реакций, что изучено морфологически на надпочечнике. Генно-модифицированная соя требует более выраженных адаптационных реакций.

**Ключевые слова:** *генно-модифицированная соя, питание, надпочечники, потомки.*

В настоящее время широкое распространение получили продукты, содержащие сою и генно-модифицированную сою. Дополнительный растительный белок, поступающий в организм, вызывает определенную нагрузку на пищеварительную систему. Известно, что избыточное количество аминокислот расщепляется под действием микрофлоры кишечника с образованием токсических веществ, которые обезвреживаются в печени [1]. Противоречивые данные об отсутствии или наличии эффектов в организме при употреблении генно-модифицированных продуктов делают актуальным изучение влияния на организм длительного употребления генно-модифицированной сои. Особую актуальность приобретают исследования, направленные на изучение влияния генно-модифицированных продуктов на организм в период закладки и формирования основных органов и систем, то есть в период внутриутробного развития, с выяснением последствий в постнатальном онтогенезе.

Дискуссия между сторонниками и противниками употребления генно-модифицированных продуктов в пищу человека и для кормления животных не завершена [2–7].

Поскольку использование в пищу генно-модифицированной сои рассматривается как возможный фактор, к которому организм должен адаптироваться, обязательным для исследования является изучение морфофункци-

онального состояния надпочечника, поскольку его гормоны воздействуют на все звенья метаболизма, обеспечивая адекватный ответ. В связи с изложенным целью данного исследования была оценка морфофункционального состояния надпочечников взрослых потомков крыс при употреблении генно-модифицированной сои крысой-матерью во время вынашивания потомства и непосредственно потомками.

**Материал и методы.** Эксперимент проведен на трехмесячных крысах линии Вистар, потомках крыс-матерей, которые за месяц до спаривания, во время вынашивания, молочного кормления потомков имели специфический рацион. Интактные крысы – будущие матери (группа Инт) находились на стандартном рационе вивария, рацион животных группы Соя включал немодифицированную сою сорта Рядова в количестве, покрывающем 50 % потребности в белках. Рацион животных группы ГМ-соя включал в аналогичном соотношении генно-модифицированную сою (сорт Roundup Ready линии 40-3-2, которая содержала трансгены *ср4ерpsps* и регуляторные элементы – промотор *E35S* и терминатор *NOS*). Потомки-крысята после перехода на самостоятельное питание получали такой же рацион, как и их матери. Таким образом, были сформированы три группы животных-потомков, по 6 особей в каждой, которые получали свой рацион внутриутробно, в период

© Г.И. Губина-Вакулик, С.А. Денисенко, Т.В., Горбач и др., 2014

новорожденности – с молоком, а затем обычным образом *per os*: Инт, Соя, ГМ-соя. Животных содержали в стандартных условиях освещения и температурного режима и манипуляции над ними проводили в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Из эксперимента животных-потомков выводили путем декапитации под легким тиопенталовым наркозом в возрасте 3 месяца.

Для морфологического исследования надпочечники потомков-самцов обрабатывали по обычной методике: фиксация в 10 %-ном растворе формалина, спиртовая проводка, заливка в парафин и изготовление срезов, взятых из «экваториальной» части железы. Окраску срезов осуществляли гематоксилин-эозином и галлоцианином по Эйнарсону (суммарные нуклеиновые кислоты). Полученные гистологические препараты изучали с помощью микроскопа «Axiostar-plus» (Zeiss, ФРГ) с последующей морфометрией (кариометрия и количество эндокриноцитов на фиксированной площади препарата) на компьютерных изображениях микропрепаратов с помощью программы «ВидеоТест» (Санкт-Петербург). Статистический анализ выполнен методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Во всех группах надпочечники округло-треугольной формы с четким делением на зоны.

Клубочковая зона коры надпочечников у самцов группы Соя местами широкая, местами уже, чем в группе Инт. Ядра клеток овально-округлые, цитоплазма с мелкими и крупными прозрачными вакуолями, что свидетельствует о наличии запасов холестерина. Кариометрические измерения не выявили достоверных различий с группой Инт (табл. 1). Между

клубочковой и пучковой зонами местами ярко выражена камбиальная зона, тогда как в группе Инт она мало заметна.

Пучковая зона надпочечников этой группы животных представлена правильными параллельными пучками; спонгиоциты – преимущественно со светлыми овальными ядрами, с центрально расположенным ядрышком и мелко глыбчатым хроматином. Цитоплазма интенсивно эозинофильна, с небольшим количеством вакуолей, что является очень заметным отличием от группы Инт, так как у контрольных животных запасы холестерина в цитоплазме спонгиоцитов намного больше, что свидетельствует о некоторой морфофункциональной активации спонгиобластов коры надпочечника в группе Соя, что подтверждается также наличием более крупноядерных эндотелиоцитов в капиллярах пучковой зоны. Изредка в пучковой зоне встречаются небольшие пустоты, что, вероятно, является последствием апоптоза одного–двух спонгиоцитов.

Сетчатая зона многоклеточная, а эндокриноциты имеют мелкие ядра по сравнению с пучковой зоной. Однако кариометрия эндокриноцитов показала, что в группе Соя ядра эндокриноцитов достоверно крупнее, чем в группе Инт, что свидетельствует о стимуляции их функционирования в связи с введением немодифицированной сои в рацион животных и их матерей в период вынашивания потомства.

На экваториальных срезах можно наблюдать в целом сужение зон коры на фоне значительного увеличения площади, занимаемой мозговым веществом. Паренхима мозгового вещества многоклеточна, нейроэндокриноциты имеют эу- и гетерохромные ядра. Цитоплазма эозинофильная, мало вакуолизирована. Кариометрия позволила выявить увеличение размеров ядер в группе Соя по сравне-

Таблица 1. Площадь ядер эндокриноцитов надпочечников, ( $M \pm m$ )  $\mu\text{км}^2$

| Группа | Клубочковая зона            | Пучковая зона                | Сетчатая зона                | Мозговое вещество           |
|--------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Инт    | 14,0 $\pm$ 0,4              | 16,8 $\pm$ 0,5               | 14,6 $\pm$ 0,5               | 18,8 $\pm$ 0,6              |
| Соя    | 14,7 $\pm$ 0,3              | 17,4 $\pm$ 0,5               | 16,3 $\pm$ 0,5*              | 20,6 $\pm$ 1,0              |
| ГМ-соя | 13,4 $\pm$ 0,5 <sup>#</sup> | 14,0 $\pm$ 0,2 <sup>**</sup> | 13,3 $\pm$ 0,5 <sup>**</sup> | 17,1 $\pm$ 0,7 <sup>#</sup> |

Примечание.  $p < 0,05$ ; \* в сравнении с группой Инт; # в сравнении с группой Соя. Здесь и в табл. 2.

нию с группой Инт, однако недостоверное, так как из-за большой варибельности значений ошибка среднего показателя оказалась высокой.

Вторым изученным морфометрическим показателем является количество эндокриноцитов в фиксированной площади микропрепарата в каждой зоне коры и в мозговом веществе надпочечника. Сравнение плотности расположения эндокриноцитов выявило изменения во всех изучаемых зонах в группе Соя по сравнению с группой Инт (табл. 2).

Таблица 2. Количество эндокриноцитов в фиксированной площади микропрепаратов ( $S=500 \text{ мкм}^2$ ) надпочечников крыс-потомков мужского пола, ( $M\pm m$ ) экз.

| Группа | Клубочковая зона | Пучковая зона | Сетчатая зона | Мозговое вещество |
|--------|------------------|---------------|---------------|-------------------|
| Инт    | 9,5±0,2          | 4,9±0,2       | 7,5±0,2       | 6,8±0,2           |
| Соя    | 8,4±0,3*         | 4,3±0,2*      | 6,0±0,3*      | 4,2±0,3*          |
| ГМ-соя | 5,6±0,3*#        | 5,3±0,3#      | 6,8±0,2#      | 5,5±0,3*#         |

Оценивая гистологические и морфометрические особенности надпочечника у потомков группы Соя, можно предположить наличие адаптационной реакции организма в ответ на употребление животными начиная с внутриутробного периода жизни нового высокобелкового корма – немодифицированной сои. Надпочечник крыс-потомков группы Соя имеет увеличенный объем мозгового вещества, эндокриноциты во всех зонах коры расположены более рыхло, то есть, предположительно, часто происходит форсированный апоптоз в связи с более интенсивной гормонопродукцией, ядра эндокриноцитов более крупные, чем у животных группы Инт.

В группе ГМ-соя надпочечники макроскопически несколько меньшего размера по сравнению с надпочечниками животных остальных групп, имеют «бобовидную» форму. Клубочковая зона коры надпочечников местами очень узкая, истончается до одного слоя клеток, местами эндокриноциты располагаются в несколько слоев. Выявлено достоверное уменьшение количества клеток в этой зоне на фиксированной площади (табл. 2). Цитоплазма эозинофильная, маловакуолизована, ядра вытянутой формы интенсивно базофильные, мелкие, при кариометрии обнаружено достоверное уменьшение размеров ядер по сравнению с наблюдаемым в группе Соя (см. табл. 1), что в целом позволяет оце-

нить морфофункциональное состояние клубочковой зоны надпочечника у молодых крыс, выношенных и выкормленных в условиях введения в рацион самок генно-модифицированной сои и получавших такой же рацион после молочного кормления, как резко сниженное.

Камбиальная зона, расположенная между клубочковой и пучковой зонами, среди всех групп максимально широкая и многоклеточная, что прямо свидетельствует о высоком потенциале пролиферации кортикоцитов в группе ГМ-соя.

В пучковой зоне коры животных группы ГМ-соя паренхима рыхлая, наблюдаются многочисленные мелкие пустоты и очаги цитолиза. В беспустотных участках пучковой зоны количество спонгиоцитов в фиксированной площади микропрепаратов оказалось больше, чем в группе Соя, так как спонгиоциты в этой группе небольших размеров, что обусловлено маловыраженным накоплением холестерина в цитоплазме. Размеры ядер спонгиоцитов в среднем достоверно меньше, чем в группе Соя, изредка наблюдаются пикнотичные ядра, характерные для погибающих клеток. «Неправильная» форма надпочечников животных этой группы сочетается с эксцентрично расположенным мозговым веществом, поэтому ширина зон коры сильно меняется; из-за этого невозможно сравнить ширину зон коры в этой группе с таковой в других группах. Происхождение указанной морфологической особенности коры надпочечников может быть связано с большой морфофункциональной нагрузкой начиная с внутриутробного периода, что реализуется в массивный апоптоз и активную пролиферацию. Соотношение этих процессов местами может быть не пропорциональным, что и приводит к появлению «неправильной» формы надпочечника.

Сетчатая зона объемная, эндокриноциты многочисленны, имеют в среднем более мел-

кие ядра, чем в группе Соя, эозинфильную цитоплазму, то есть отмечаются микроскопические признаки повышенной активности сетчатой зоны коры, связанной в первую очередь с ее гиперплазией.

Общая площадь мозгового вещества на «экваториальном» срезе заметно меньше, чем в группе Соя, обнаруживаются большие пустоты в ткани мозгового вещества, что указывает на большие потери нейроэндокриноцитов в прошлом. Тем не менее, в наличии большое количество нейроэндокриноцитов с разными по величине ядрами: как мелкими, так и крупными, даже гигантскими (полиплоидия), средняя площадь ядер достоверно меньше, чем в группе Соя. Количество нейроэндокриноцитов на фиксируемой площади увеличено, что обусловлено малым объемом их цитоплазмы, в которой запасы катехоламинов отсутствуют. То есть и мозговое вещество в надпочечнике животных-потомков группы ГМ-соя гиперплазировано и, вероятно, морфофункционально гиперактивно.

В ранее проведенных исследованиях [6, 7] у крыс-матерей, длительно (6 месяцев) употреблявших тот же специфический рацион (распределение на группы аналогичное), в возрасте 9 месяцев была выявлена морфофункциональная картина активации зон коры и мозгового вещества, свидетельствующая о развитии адаптационной реакции. Причем при употреблении генно-модифицированной сои уже имелись признаки истощенности пролиферативного материала коры, запаса нейроэндокриноцитов мозгового вещества. Сравнивая эти возрастные группы, а именно матерей (6 месяцев воздействия рациона) и взрослых потомков (внутриутробное и с молоком матери действие метаболитов, затем 2 месяца прямое воздействие рациона), мы обнаружили одинаково направленные изменения, свидетельствующие о том, что организм животного вынужден адаптироваться к использованным рационам. Адаптация к ГМ-сое труднее, чем к немодифицированной сое. Внутриутробно начинающаяся адаптация к этим рационам обуславливает у потомков

#### Литература

1. *Гаркави Л.Х.* Антистрессорные реакции и активационная терапия / Л.Х. Гаркави, Е.Б. Квакина, Т.С. Кузьменко. – М.: ИМЕДИС, 1998. – 565 с.
2. *Ермакова И.В.* Трансгенезация – новый виток эволюции или генная бомба? / И.В. Ермакова // Эволюция. – 2005. – № 2. – С. 34–39.

формирование высокого пролиферативного потенциала коры и гиперпластичность мозгового вещества, то есть гиперактивного надпочечника.

#### Выводы

Выявленные изменения позволяют предположить, что длительное употребление нового растительного белка в виде немодифицированной или генно-модифицированной сои (причем начало влияния метаболитов сои приходится на внутриутробный период жизни) вызывает морфофункциональные изменения в надпочечниках. Употребление немодифицированной сои обуславливает повышение морфофункциональной активности пучковой зоны и мозгового вещества, что свидетельствует о развитии общей адаптационной реакции.

На фоне употребления генно-модифицированной сои отмечаются такие изменения гистологии надпочечника, которые можно объяснить происходящей внутриутробно и на ранних этапах онтогенеза гиперплазией эндокриноцитов пучковой зоны коры и мозгового вещества. Гиперпластичность такова, что для общей повышенной продукции гормонов нет надобности повышать морфофункциональную активность отдельного эндокриноцита, о чем свидетельствует факт уменьшения средних размеров ядер кортикоцитов и нейроэндокриноцитов. Такая направленность изменений свидетельствует о том, что у потомков сформирован повышенный адаптационный потенциал надпочечников, но и функционирование пучковой зоны коры и мозгового вещества осуществляется на высоком уровне, поэтому можно ожидать и ускоренную их истощенность.

Гиперплазия сетчатой зоны коры или гипертрофия отдельных кортикоцитов сетчатой зоны свидетельствует об активации продукции надпочечниковых эстрогенов.

Напряженность выявленных реакций надпочечника на наличие генно-модифицированной сои в рационе не способствует формированию адекватной ответно-приспособительной реакции организма в случае действия стрессора любой другой природы.

3. A long-term study on female mice fed on a genetically modified soybean: effects on liver ageing / M. Malatesta, F. Boraldi, G. Annovi [et al.] // *Histochem Cell Biol.* – 2008, Nov. – Vol. 130 (5). – P. 967–977.
4. *Cichosz G.* Genetically modified food-great unknown / G. Cichosz, S.K. Wiackowski // *Pol. Merkur Lekarski.* – 2012; Aug. – Vol. 33 (194). – P. 59–63.
5. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize / G.E. Seralini, E. Clair, R. Mesnage [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2012, Nov. – Vol. 50 (11). – P. 4221–4231.
6. Морфофункциональное состояние надпочечников самок крыс Вистар при включении в рацион генно-модифицированной сои / Г.И. Губина-Вакулик, С.А. Денисенко, Т.В. Горбач [и др.] // *Таврический медико-биологический вестник.* – 2013. – Т. 15, № 3, ч. 1. – С. 85–88.
7. *Дильман В.М.* Четыре модели медицины / В.М. Дильман. – Л.: Медицина, 1987. – 288 с.

***Г.І. Губіна-Вакулик, С.А. Денисенко, Т.В. Горбач, Н.Г. Колоусова, А.В. Андрєєв***

**MORPHOFUNCTIONAL STATE OF ADRENAL GLANDS IN ADULTS DESCENDANTS WITH THE DIET BY GENETICALLY MODIFIED SOY**

Поставлений експеримент на щурах Вістар з введенням в раціон немодифікованої і геномодифікованої сої вагітним самицям в період виношування потомства і нащадкам протягом 2–3 місяців життя. Зроблено висновок, що вживання немодифікованої і геномодифікованої сої викликає напруженість адаптаційних реакцій, які було вивчено морфологічно на надниркових залозах. Геномодифікована соя вимагає більш виражених адаптаційних реакцій.

***Ключові слова:*** геномодифікована соя, харчування, наднирникові залози, нащадки.

***G.I. Gubina-Vakulik, S.A. Denisenko, T.V. Gorbach, N.G. Kolousova, A.V. Andreev***

**MORPHOFUNCTIONAL ADRENAL STATE IN ADULTS DESCENDANTS WITH THE DIET BY GENETICALLY MODIFIED SOY**

The experiment on Wistar rats with the using of genetically modified and non-modified soy in the diet of pregnant females during gestation and of descendants for 2–3 months life. It was concluded that the foods of genetically modified and unmodified soy are environmental factors that cause stress adaptative reactions that was studied morphologically on the adrenal gland. Genetically modified soybean requires more severe adaptive reactions.

***Key words:*** genetically modified soy, diet, adrenal glands, descendants.

*Поступила 17.04.14*