

УДК 613.2:664:581.5

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ МЕТОДОЛОГИИ ИЗУЧЕНИЯ МУТАГЕННЫХ И КАНЦЕРОГЕННЫХ СВОЙСТВ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ

<sup>1</sup>Нуралиев Н.А., <sup>1</sup>Гинатуллина Е.Н., <sup>2</sup>Шакирова Д.Н.,  
<sup>2</sup>Нуралиева Х.О., <sup>1</sup>Рахимова Н.Р.

<sup>1</sup>НИИ санитарии, гигиены и профзаболеваний МЗ РУз,  
Ташкент, e-mail: e-ginatullina@yandex.ru;

<sup>2</sup>Ташкентский фармацевтический институт, Ташкент

В статье приводится подробный обзор литературных источников последних лет по современному состоянию методологии изучения мутагенности и канцерогенности генно-модифицированных продуктов. По мнению многих исследователей, оптимальными методами оценки мутагенности на сегодня являются анализ хромосомных aberrаций в клетках костного мозга и учет доминантных леталей в половых клетках самцов млекопитающих.

**Ключевые слова:** генетически модифицированные продукты, мутагенность, канцерогенность, методы изучения

## CURRENT STATUS THE METHODS TO STUDY THE MUTAGENIC AND CARCINOGENIC PROPERTIES OF GENETICALLY MODIFIED PRODUCTS

<sup>1</sup>Nuraliev N.A., <sup>1</sup>Ginatullina E.N., <sup>2</sup>Shakirova D.N., <sup>2</sup>Nuralieva Kh.O., <sup>1</sup>Rahimova N.R.

<sup>1</sup>Institute of Sanitary, Hygiene and Professional Diseases, Tashkent, e-mail: e-ginatullina@yandex.ru;

<sup>2</sup>Pharmaceutical Institute, Tashkent

In the paper is provided a detailed review the literature of recent years on the current methodology of mutagenicity and carcinogenicity of genetically modified food. According to studies of authors, the best methods to evaluate the mutagenicity are the analysis of chromosomal aberration test in bone marrow cells and dominant lethal mutation assay in germ cells.

**Keywords:** genetically modified, mutagenicity, carcinogenicity, methods of study

Бурный рост народонаселения планеты и ограниченность площадей для сельскохозяйственного производства вынуждают для обеспечения населения продовольствием, заниматься поиском новых источников получения продуктов питания, например, генетически модифицированных (ГМ) продуктов [3, 6, 10].

На современном этапе изучение мутагенности и канцерогенности ГМ-продуктов, в том числе пищевых добавок является актуальным в связи с определением действительной биологической ценности новых продуктов питания и обеспечением надзора за безопасностью пищевых продуктов.

Известно, что мутагенность это способность химических и природных веществ вызывать наследственные или мутационные изменения, а канцерогенность это свойство факторов окружающей среды повышать вероятность возникновения злокачественных опухолей [21].

При изучении мутагенной активности веществ определяют минимально действующую дозу (МДД) мутагена, за которую принимается минимальная доза вещества, вызывающая достоверное повышение уров-

ня мутаций у лабораторных животных по сравнению с контролем [11, 19].

Известно, что под термином «пищевые добавки» понимают природные или синтезированные вещества, преднамеренно вводимые в пищевые продукты с целью придания им заданных свойств, и не употребляемые сами по себе в качестве пищевых продуктов или обычных компонентов пищи [3].

Необходимость применения пищевых добавок продиктована несколькими причинами: первая – наиболее рациональное использование, выращенных и произведенных сельскохозяйственных продуктов. Это связано с тем, что в процессе приготовления теряется ценная часть произведенного сельскохозяйственного сырья; вторая – невозможность использования ранее доступного сырья; третья – создание новых видов продуктов из нетрадиционного сырья [1, 12, 13].

Многими авторами отмечается, что возможно несколько принципиально различных путей попадания потенциальных мутагенов в продукт питания: аккумуляция из внешней среды в процессе жизнедеятельности растений и животных, загряз-

нение микотоксинами пищевого сырья при хранении, образование мутагенов в процессе тепловой обработки пищевого сырья, наличие в пище мутагенов естественного происхождения и в виде веществ, используемых в качестве консервантов, ароматизаторов, красителей, подсластителей, загустителей [6, 9, 10, 12, 14, 15].

В то же время, все большее распространение получает идея о том, что ряд пищевых добавок может одновременно с технологическими функциями выполнять и роль хемопревенторов, т.е. увеличивать устойчивость человека к разнообразным воздействиям веществ, в том числе мутагенным. К ним относятся антиоксиданты. Сегодня имеется достаточно большое количество сведений, что пропилгаллат (Е 310), бутилгидроксианизол (Е 320), бутилгидрокситолуол (Е 321), этоксиин (Е 324) обладают антимуtagenными свойствами [3, 4].

Достаточно сведений получено об антимуtagenности аскорбиновой кислоты, эффективно снижающей генотоксическое действие лекарства циклофосамида и инсектицида диметоата, пестицидов эндосульфана, фосфомедона, манкозеба, дийодгидроксихинолина (антиамебный препарат) и бенз(а)пирена [2].

Безвредность пищевых добавок определяется на основе широких сравнительных исследований, предпринимаемых такими органами, как Объединенный Комитет экспертов по пищевым добавкам ФАО/ВОЗ (JECFA) и Научный Комитет по продуктам питания Европейского Союза (SCF). При применении пищевых добавок действует принцип «запрещено все, что не разрешено». Международный опыт организации и проведения, системных токсиколого-гигиенических исследований пищевых добавок обобщен в специальном документе ВОЗ (1987/1991) «Принципы оценки безопасности пищевых добавок и контаминантов в продуктах питания» [16, 22].

Известно, что при проведении токсикологических исследований пищевых добавок определяют допустимое суточное потребление (ДСП), в миллиграммах на 1 кг массы тела в сутки, т.е. количество пищевой добавки, которое можно употреблять в пищу ежедневно в течение всей жизни, без риска для здоровья [14]. ДСП включает в себя не только количество добавляемого вещества, но и естественное содержание этого вещества в суточном наборе продуктов питания. ДСП для всех веществ определяет и утверждает JECFA, начиная с 1955 года.

Другая изучаемая токсикологическая величина это предельно-допустимая концентрация (ПДК), т.е., предельно-допу-

стимое, с точки зрения безопасности для здоровья человека, количество пищевой добавки в продукте питания, выражаемое в миллиграммах на 1 кг продукта [11], и регламентируется нормативно-правовыми актами (ГОСТ) страны.

В последние годы появилось большое количество генетически модифицированных организмов (ГМО), которые используют в качестве продуктов питания – картофель, кукуруза, помидоры, рыба и другие или включаются как ГМ-компоненты – крахмал, соевая мука, томатная паста и другие [23].

Получение ГМО связано с «встраиванием» целевого гена в ДНК других растений или животных (трансгенизация) с целью изменения свойств и параметров последних. Однако, все больше поступает данных как о токсичности ГМО, так и о снижении репродуктивности и патологических изменениях в органах тех животных, которые поглощают ГМО. Вредное влияние ГМ растений на млекопитающих было показано при добавлении в корм ГМ сои или ГМ картофеля [6, 10, 23].

#### **Токсикологическая безопасность пищевых добавок**

Определение безопасных доз пищевых добавок в пищевых продуктах имеет ряд особенностей, и делится на следующие этапы [7, 11, 13]:

I этап – проведение субхронического (подострого) эксперимента. В течение 90 дней лабораторным животным вскармливают пищевую добавку с обычной лабораторной пищей. Если крысы или мыши отказываются употреблять пищу с пищевой добавкой, то перед началом экспериментов, животных приучают в небольших дозах употреблять ее.

При этом общее воздействие на организм (функциональные проявления) пищевой добавки не должны снижать темпы набора веса животными или приводить к похудению, влиять на поведенческие реакции животного. Морфологические проявления неопухолевого характера, т.е. воздействия на органы и ткани, в первую очередь желудочно-кишечного тракта, или неопластические проявления (образование опухолей). Вещества, способствующие образованию опухолей, являются канцерогенными и запрещаются к использованию в качестве пищевых добавок. Изучают также влияние пищевой добавки на репродуктивную функцию, при этом норма – если за время проведения эксперимента лабораторное животное должна как минимум дважды приносить потомство.

На этом этапе изучения токсичности пищевой добавки обращают внимание и на то,

что, если пищевая добавка или продукты ее метаболизма не будут выводиться из организма в течение 24 часов, то это приведет к кумулятивному эффекту. Через определенное время, количество безопасной первоначальной добавки будет таковым, что она станет ядовитой

Таким образом, в ходе субхронического эксперимента определяется характер токсического действия, но в отличие от количественных расчетов вредных доз, уже на первом этапе некоторые исследуемые вещества могут быть запрещены для использования в качестве пищевой добавки.

II этап – хронический (острый) эксперимент. Если на стадии субхронического эксперимента даже очень большие дозы вещества не давали токсического действия, то этот этап не нужен и вещество может быть разрешено к использованию. На этом этапе определяется максимально недействующая доза (ДСП) – доза, которая не дает токсического эффекта на протяжении 104 недель. Во время этого эксперимента продолжают и субхронические исследования по изучению влияния на репродуктивную функцию и развитие потомства. Этот опыт продолжают на 6 поколениях животных.

III этап – на основании утвержденной структуры питания, а также естественного содержания вещества в данной категории продукта каждая страна определяет ориентировочную дозу в продукте питания. Структура питания изменяется от страны к стране, естественное содержание вещества в продукте также изменяется. Поэтому ориентировочная доза пищевой добавки в одном и том же продукте разных стран различна.

Санитарно-эпидемиологическое заключение о пищевой безопасности продукта питания с новыми пищевыми добавками выдается Министерством Здравоохранения РУз в соответствии с Законом Республики Узбекистан «О качестве и безопасности пищевой продукции» [20].

#### **Методы определения мутагенности и канцерогенности пищевых продуктов**

Согласно современным представлениям, гигиеническая оценка мутагенного действия факторов окружающей среды должна базироваться на этапности проведения исследований, использования для регламентации только данных опытов на млекопитающих, анализе зависимости мутагенного эффекта от дозы.

Журков В.С. [7] предложил следующую этапную схему оценки мутагенной активности факторов среды:

I этап. Выявление мутагенов: анализ литературных данных. На этом этапе анали-

зируются литературные данные последних лет. При отсутствии, или противоречивых, сомнительных результатах ставятся эксперименты с использованием быстрых, недорогих и информативных тестов (тест Эймса, микроядерный тест – анализ частоты полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге в острых опытах на млекопитающих, учет хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов человека *in vitro*). Результат I этапа: вещество не мутаген, регламентация без учета мутагенности.

II этап. Исследование веществ, у которых обнаружен мутагенный эффект. Производят метафазный учет хромосомных aberrаций и анализ доминантных летальных мутаций у самцов мышей или крыс. Вещества, вызывающие цитогенетический эффект только в высоких дозах, рассматриваются как сомнительные мутагены. В зависимости от степени мутагенной опасности вещества запрещают или регламентируют их использование. Результат II этапа: установление МДД и расчет допустимой дозы мутагена для обоснования гигиенического норматива.

Поскольку прямые методы, позволяющие установить способность химического вещества вызывать наследуемые мутации у человека, в настоящее время отсутствуют, информация о возможности возникновения мутаций в половых клетках человека может быть получена следующими несколькими путями:

- установлением факта повреждения ДНК, включающего ее изменения, стимулирование репарации ДНК, тесты на выявление генных мутаций, в том числе и на микроорганизмах;

- обнаружением точковых или генных мутаций на целом организме;

- определением хромосомных мутаций, включая цитогенетические тесты на млекопитающих, метод доминантных летальных на млекопитающих и тест наследуемой транслокации на грызунах [5, 10, 16].

Все методы исследования, использующиеся на II этапе делятся на экспресс и количественные методы.

Экспресс методы выявляющие мутагенность: тест Эймса, микроядерный тест в остром опыте на мышах (тест на цитогенетическую активность), анализ хромосомных aberrаций в лимфоцитах человека [8].

Количественная оценка мутагенной активности в опытах на млекопитающих: анализ хромосомных aberrаций в клетках костного мозга, учет доминантных летальных мутаций у самцов [18].

Мы сочли целесообразным привести краткую характеристику основных методов

изучения генетической активности химических веществ.

Тест Эймса (тест оценки мутагенной активности загрязнителей среды на *Salmonella typhimurium*) – позволяет оценить мутагенность по количеству ревертантов (мутант, у которого в результате обратной, супрессорной или компенсаторной мутации полностью или частично восстанавливаются признаки исходного (дикого) организма) среди клеток штамма *Salmonella typhimurium* при инкубации их с веществом в присутствии тканевых гомогенатов грызунов или человека, выполняющих функцию активатора. Этот метод предназначен для выявления способности химических веществ или их метаболитов индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*. По-видимому, мутации у бактерий могут быть чувствительным показателем для проверки повреждения ДНК, хотя использование этих результатов в целях гигиенической регламентации затруднено из-за различий в концентрации и распределении химических веществ, отличий в физиологии и метаболизме [8, 18].

Определение цитогенетической активности на клетках костного мозга мышей. Цитогенетическая активность – способность вещества вызывать структурные и численные хромосомные нарушения в соматических и зародышевых клетках. В основе метода лежит регистрация видимых структурных нарушений хромосом в клетках на стадии метафазы. Клетки костного мозга характеризуются высоким уровнем митотической активности, спонтанная частота клеток с хромосомными повреждениями, включая гены (ахроматические пробы), составляет 1-2,5% [8, 18].

Однако, высокая степень клеточной пролиферации в костном мозге не позволяет оценить истинную цитогенетическую активность веществ при длительном воздействии. Поэтому длительность эксперимента для учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга составляет 10-15 суток, Костный мозг фиксируют в конце митотического цикла, через 20-24 часа после воздействия. Каждую дозу проверяют не менее чем на 6 животных. От каждой мыши исследуют не менее 100 метафаз [7, 11].

Определение цитогенетической активности в культуре лимфоцитов периферической крови человека. Этот метод используют для выявления и количественной оценки потенциальной цитогенетической активности фармакологических средств в клетках периферической крови больных, подвергающихся лечению исследуемым лекарственным препаратом. Для оценки действия хи-

мических веществ на хромосомы обычно используют коротко живущую *in vitro* культуру лимфоцитов человека, куда добавляют вещество в виде раствора или суспензии в питательной среде. В случае обнаружения мутагенного эффекта дозу снижают. Структурная перестройка хромосом, происходящая вследствие неправильной репарации хромосомных разрывов, может привести к делециям, дупликациям и транслокациям. Наблюдается также aberrация числа хромосом вследствие их не-расхождения [11, 18].

Метод учета доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей и крыс. Доминантные летальные мутации – генетические изменения, индуцированные в родительских зародышевых клетках и приводящие к гибели первого поколения потомков на эмбриональных стадиях развития. В процессе эксперимента происходит выявление влияния исследуемого вещества на генетическую структуру зародышевых клеток. Мутагенный эффект проявляется в виде повышенной эмбриональной смертности. Если яйцеклетка оплодотворена сперматозоидом, несущим доминантную леталь, то смерть развивающегося эмбриона может произойти как до, так и после имплантации. Обычная схема проведения эксперимента включает обработку исследуемого вещества самцов с последующим спариванием их с интактными самками. Для анализа доминантных летальных мутаций у самцов мышей эксперименты продолжаются 5 недель, а у самцов крыс 7 недель. В опытах изучают 4-5 доз и определяют МДД мутагена. Метод основан на предположении, что в яйцеклетках или сперме происходит одиночная мутация, летальная для эмбриона и гетерозиготная в поражаемом локусе. Недостаток метода – большое количество мутагенов дает отрицательный ответ в этом месте. Кроме этого, химические вещества, прерывающие сперматогенез, могут дать ошибочные положительные результаты [17, 18].

### Заключение

Большое количество новых пищевых добавок, а также использование в пищевой промышленности ГМ продуктов ставят задачу тщательно исследовать как новые пищевые добавки, так и продукты полученные по новым технологиям. В то время, как существует несколько хорошо зарекомендованных методов определения мутагенности и канцерогенности веществ, по мнению исследователей, оптимальными методами оценки мутагенности на сегодня являются анализ хромосомных aberrаций

в клетках костного мозга и учет доминантных леталей в половых клетках самцов млекопитающих.

#### Список литературы

1. Атаханова Д.О. Гигиеническая характеристика качества и степени загрязнения пищевых продуктов, потребляемых населением Каракалпакстана // Медицинский журнал Узбекистана. – 2016. – № 1. – С. 67-71.
2. Берзиня Н. Воздействие повышенной дозы аскорбиновой кислоты на редокс-статус цыплят // Журнал Комбинорма. – 2012. – № 3. – С. 71-73.
3. Булдаков А. Пищевые добавки. – СПб.: «Въ», 1996, 198 с.
4. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты: вчера, сегодня, завтра // Биологическая кинетика. – 2005. – Т. 2. – С. 10-45.
5. Ванчугова Н.Н., Привалова Л.И., Комиссарова О.В., Гребенников С.А. Влияние некоторых канцерогенных веществ на клетки костного мозга у мышей // Экспериментальная онкология. – Москва, 1985. – Т. 7. – № 4. – С. 65-66.
6. Ермакова И.В. Заключение к отчету о кормлении крыс ГМ-картофелем Russe Burbank, устойчивым к колорадскому жуку // Аграрная Россия. – 2005. – № 4. – С. 62-64.
7. Журков В.С. Методология интегральной оценки мутагенности загрязнений водных объектов // Мутагены и канцерогены в окружающей среде. Новые подходы к оценке риска для здоровья. – СПб. – 1998. – С. 126-130.
8. Ковалева О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42. – № 1. – С. 58-72.
9. Коробчанский В.А., Герасименко О.И., Иваненко Т.А. Проблемы медико-биологической безопасности регулярно употребляемой в пищу пищевой продукции содержащей ГМО // Проблемы питания. – 2010. – № 3-4. – С. 38-43.
10. Кузнецов В.В., Куликов А.М., Митрохин И.А., Цыдендамбаев В.Д. Генетически модифицированные организмы и биологическая безопасность. – Выпуск «Экоинформ». – 2004. – № 10. – 64 с.
11. Курляндский Б.А., Филов В.А. Общая токсикология. – Москва, Изд-во «Медицина», 2002. – 307 с.
12. Прудников Т.Н., Ильчишин Н.В., Гаманченко А.И. Проблемы контроля пищевой безопасности генетически модифицированных продуктов питания // Известия вузов. Пищевая технология. – 2006. – № 2/3. – С. 110-112.
13. Рогов И.А., Дунченко Н.И., Позняковский В.М. Безопасность продовольственного сырья и пищевых продуктов // Современные проблемы науки и образования. – 2009. – № 1. – С. 42-48.
14. Сарафанова Л.А. Кострова И.Е. Применение пищевых добавок. – СПб, «Гиорд», 1997. – С. 45-58.
15. Смирнов Е.В., Викторова Г.К., Метелкина Н.М. Пищевые ароматизаторы и красители. – М.: Пищевая промышленность. – 1996. – С. 39-54.
16. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Принципы оценки безопасности пищевых добавок и загрязнителей в продуктах питания // Всемирная организация здравоохранения, Женева, 1991. – 160 с.
17. Шарипова Н.В., Худайбергенов А.С., Элинская О.Л. Требования к определению безопасности пищевых продуктов, содержащих генетически модифицированные источники (ГМИ) // СанПиН №0185-05 Руз. – Ташкент, 2005. – 27 с.
18. Элинская О.Л. Порядок и методология предрегистрационной токсиколого-гигиенической экспертизы пищевых добавок // Методическое руководство № 012-3/0244. – Ташкент, 2014. – 80 с.
19. Элинская О.Л. Гигиенические аспекты применения пищевых добавок // Справочно-методическое пособие. – Ташкент, 2011. – 192 с.
20. Закон Республики Узбекистан «О качестве и безопасности пищевой продукции» // Ведомости Олий Мажлиса Республики Узбекистан. – Ташкент, 2003. – № 9. – С. 239.
21. Свободная электронная энциклопедия: // <https://ru.wikipedia.org>.
22. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) (2004). Emerging risks related to the environment and new technologies (GF 02/12). Second FAO/WHO GlobalForum of Food Safety Regulators, Bangkok, Thailand, 12-14 October 2004. FAO, Rome. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/008/>.
23. Domingo J.L. Toxicity studies of genetically modified plants: review of the published literature // Critical review in food science and nutrition. – 2007. – № 47. – P. 721-733.