

ТЕСТИРОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДУКТОВ ИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО РИСА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА КРЫСАХ СПРАГ-ДОУЛИ

© 2019 г. М. Ширдели^{1,2}, Ю. Л. Орлов^{3,4,*}, Г. Ислами^{1,5,**}, Б. Хаджимохаммади^{1,2,***}, Л. Э. Табиханова³, М. Х. Ихрампуш¹, М. Э. Резвани⁶, Х. Фаллахзаде⁷, Х. Занди^{1,8}, С. С. Хоссейни¹, С. Ахмадиан^{1,5}, Ш. Мортазави¹, Р. Фаллахи⁹, С. Л. Асади-Юсефабад¹⁰

¹Научно-исследовательский центр безопасности продуктов питания и гигиены, Школа здравоохранения, Университет медицинских наук им. Шахида Садуги, Йезд, 8916188638 Иран

²Университет медицинских наук им. Шахида Садуги, департамент безопасности продуктов питания, Школа здравоохранения, Йезд, 8916188638 Иран

³Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, 119991 Россия

⁵Университет медицинских наук им. Шахида Садуги, департамент паразитологии и микологии, Йезд, 8916188638 Иран

⁶Университет медицинских наук им. Шахида Садуги, департамент физиологии, Школа медицины, Йезд, 8916188638 Иран

⁷Университет медицинских наук им. Шахида Садуги, департамент биостатистики и эпидемиологии, Школа здравоохранения, Йезд, 8916188638 Иран

⁸Университет медицинских наук им. Шахида Садуги, департамент микробиологии, Медицинский факультет, Йезд, 8916188638 Иран

⁹Научно-исследовательский институт вакцины и сыворотки Рази, департамент вирусных заболеваний животных, Организация сельскохозяйственного образования и развития, Кередж, 3197619751 Иран

¹⁰Университет медицинских наук им. Шахида Садуги, Студенческий исследовательский комитет, Йезд, 8916188638 Иран

*e-mail: orlov_yury@yahoo.com

**e-mail: eslami_g2000@yahoo.com

***e-mail: b.hajimohammadi@gmail.com

Поступила в редакцию 09.02.2019 г.

После доработки 28.02.2019 г.

Принята к публикации 19.03.2019 г.

Данная работа представляет экспериментальное исследование питания лабораторных животных — крыс линии Спраг-Дуоли — генетически модифицированным рисом. Нами было оценено присутствие последовательностей ДНК трансгенов *CryIA(b)*, *T35* и *P35* в печени этих крыс. 20 самцов и 20 самок крыс получали корм в виде гранул, приготовленных с помощью генетически модифицированного риса, в 50% необходимого состава углеводов в течение 90 дней. Выделение ДНК выполнялось по стандартному протоколу. Качество и количество экстрагированной ДНК определяли электрофорезом в агарозном геле и спектрофотометрией соответственно. Поиск остатков генетически модифицированных генов, включая *CryIA(b)*, *P35* и *T35*, был выполнен с помощью полимеразной цепной реакции с использованием специфических пар праймеров. Результаты анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле с градацией ДНК в 50 пп в сравнении с контрольной группой, которую кормили стандартными гранулами немодифицированного риса. Все тесты амплификации были сделаны трижды. Анализ амплификации *P35*, *CryIA(b)* и *T35* не выявил остатков этих генов внутри ткани печени крыс. Результаты не показали существенного различия между контрольной и экспериментальной группами. Таким образом, на рассмотренной модели лабораторных животных настоящее исследование опровергает возможность попадания остаточных фрагментов генов генетически модифицированного риса в ткани печени.

Ключевые слова: генетически модифицированный рис, трансгены, безопасность продуктов питания, крысы Спраг-Дуоли, печень, *CryIA(b)*, *P35*, *T35*.

DOI: 10.1134/S0016675819080137

Генная инженерия растений является основой защиты злаков, в том числе риса, от насекомых-вредителей посредством вставки новых генов в зерно. В то же время встают вопросы безопасности продуктов питания из трансгенных растений, связанные с возможным переносом генетического материала. Важно экспериментально проверить наличие или отсутствие каких-либо дополнительных генов растений или их фрагментов в тканях животных после употребления генетически модифицированных (ГМ) продуктов.

Рис — один из основных продуктов питания для большей части населения мира, более чем для 3.5 млрд [1]. Более того, согласно прогнозам уже к 2025 г. рис станет основным продуктом питания для 4.3 млрд человек в мире. Для этого ежегодно будет производиться более 880 млн тонн риса, что намного выше нынешнего мирового производства. Более 53% населения мира, страдающего от голода и бедности, проживает в странах, где преобладает рисоводство, и, следовательно, повышение производства риса в этих районах актуально как никогда [2–4].

Однако рис, как и другие злаки, подвержен сильному повреждению насекомыми [5]. Около 200 видов насекомых повреждают растение риса на протяжении всего его вегетационного периода, к концу которого от 15 до 25% риса оказываются поврежденными [6]. Для сокращения потерь используются различные методы. Одними из самых инновационных являются методы генной инженерии, которые модифицируют геном риса, вводя гены устойчивости к насекомым путем переноса генетического материала от других растений, животных, микроорганизмов или синтетических конструкций [5, 6]. После таких генетических изменений исходные растения проявляют новые свойства, в том числе приобретают повышенную устойчивость к насекомым, что помогает в значительной степени снижать наносимый последними ущерб [7]. Полученные при помощи таких методов растения становятся генетически модифицированными. Возникающие проблемы безопасности генетически модифицированных продуктов вызвали широкое обсуждение в мире [3, 7–9]. В настоящей работе мы рассматриваем пример экспериментального тестирования безопасности питания с точки зрения возможности переноса трансгенов в организм для одного из сортов ГМ-риса.

Bacillus thuringiensis (Bt) — микроорганизм, который естественным образом вырабатывает активный белок против определенных насекомых [10]. *B. thuringiensis* формирует кристаллы инсектицидных δ-эндотоксинов (кристаллические белки, или Сгу-белки), которые кодируются *cry*-генами. После переноса его генетического материала в геном риса он придает последнему устойчивость к насекомым, в том числе к видам моли *Sesamia inferens*,

Chilo suppressalis, *Tryporyza incertulas* и *Snaphalocrocis medinalis* [11]. Последующие тестирования безопасности ГМ-риса использовали крыс линии Спраг-Доули [11, 12], цыплят и других животных [13].

В целом технология генетической модификации широко применялась с середины 1990-х гг. и привела к повышению экономической эффективности производства риса [14–16], так, к примеру, уже в 2012 г. объем торговли зерном увеличился на 3%. Доля производства ГМ зерновых очень велика. К настоящему времени Китай стал крупнейшим производителем трансгенного риса. В других странах, таких как США, Пакистан, Испания и Индия, такая культура выращивается в тестовых объемах на фермах [1]. В России трансгенные растения используются только как модели для биотехнологических исследований [17, 18], особенно на табаке [19, 20].

Гены *Cry* бактерии *B. thuringiensis* были успешно введены в геном риса [21]. Первый устойчивый к насекомым-вредителям рис из Ирана называется Таром Молайи (*Tarom Molaii Cry1Ab*), он был создан в 1998 г. [22] Иранским институтом сельскохозяйственных исследований [23].

Тем не менее стали появляться исследования, показывающие вероятность сохранения трансгенов в живом организме при потреблении, особенно у человека [3]. Кроме этого, не исключалась возможность появления вероятных рисков при потреблении трансгенных пищевых продуктов, заключающихся в выработке трансгенами неизвестных токсинов, приводящих к аллергии и канцерогенезу [24, 25]. Предполагалось, что такое может произойти после введения этих генов в геном хозяина путем активации молчащих генов, снижения активности генов, при нарушении метаболизма или при выработке новых белковых токсинов у потребителя ГМ-продуктов. Опубликованные данные показывают, что достаточно большие фрагменты ДНК, способные нести целые гены из съеденных продуктов, могут избегать деградации в пищеварительном пути и попадать в систему кровообращения человека [26] через неизвестные механизмы передачи. Такая проблема требует тестирования безопасности питания ГМ-продуктами на лабораторных животных [27, 28], включая модели *cry*-генов на крысах [29, 30] и обезьянах [31, 32].

Наше исследование базируется на предположении о том, что вредоносность любого съедобного продукта обуславливается, во-первых, способностью его всасывания через кишечник и, во-вторых, наличием метаболитов, целых фрагментов ДНК и белков в печени и других тканях потребителя. В данном исследовании оценивалась возможность сохранения остатков гена *CryIA(b)* наряду с *P35* и *T35* в печени крыс, получавших иранский генно-модифицированный рис. Как нам известно, это

Таблица 1. Пары праймеров, использованные в данной работе [22, 33–36]

Праймер	Последовательность праймера (5' → 3')	Ген-мишень	Длина ПЦР-продукта, пн	Ссылка
aCryIA(b)-FI	CGGCCCCGAGTTCACCTT	<i>CryIA(b)</i>	189	[33]
CryIA(b)-RI	CAACAACATCATCCCAGCAG			
CryIA(b)-FII	CCGCACCCTGAGCAGCAC	<i>CryIA(b)</i>	420	[34]
CryIA(b)-RII	CCCCTCAGAACAACAACGTGCCACC			
T35-F	CGGGGGATCTGGATTTTAGTA	35S терминатор	137	[35]
T35-R	AGGGTTCCTATAGGGTTTCGCTC			
T35S-F	AGGGTTTCTTATATGCTCAACACATG	35S терминатор	118	[35]
T35S-R	CACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCAC			
P35-F	GCTCCTACAAATGCCATCA	35S промотор	194	[36]
P35-R	GATAGTGGGATTTGTGCGTCA			
CryIA(b)-FIII	ACCGGTTACTCTCCCATCGA	<i>CryIA(b)</i>	1400	[22]

одно из первых исследований такого рода для ГМ-риса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Настоящая работа представляет собой экспериментальное исследование. Исследуемая популяция, включающая 20 самцов и 20 самок крыс Спраг-Доули, получала при кормлении 50% гранул риса ГМ в составе необходимых углеводов. Контрольную группу из 20 самцов и 20 самок крыс кормили стандартными гранулами того же риса сорта Таром Молайи без модификации. Обе группы животных были отобраны полностью случайно. Возраст крыс был от четырех до пяти недель, вес — около 200 г. Крысы были предоставлены Научно-исследовательским институтом вакцины и сыворотки Рази, Иран. Чтобы уменьшить стрессовое влияние смены среды, всех крыс предварительно держали в лаборатории в течение пяти дней перед экспериментами. Кормление проводилось в течение 90 дней для обеих групп без ограничений (*ad libitum*). На протяжении всего времени эксперимента влажность и температура поддерживались на уровне 40–60% и 15–22°C. Световой цикл был установлен на 12 ч света и 12 ч темноты. Крыс ежедневно оценивали клинически (изменения шкурки, меха, глаз, функции дыхательной, кровеносной и центральной нервной систем, моторная активность и стандартные паттерны поведения).

Продукты питания изготавливались Научно-исследовательским институтом вакцины и сыворотки Рази. Гранулы готовили двух видов — стандартные и с ГМ-рисом. Последние были изготовлены так, чтобы 50% необходимого углевода составлял ГМ-рис Таром Молайи. Рис сорта Таром Молайи был безвозмездно предоставлен Научно-исследовательским институтом биотехнологии сельского хозяйства Ирана. ГМ-рис Таром Молайи приобрел

устойчивость к стеблевому червю при переносе *CryIA(b)* из *B. thuringiensis*.

Отбор проб. После 90 дней экспериментального кормления крысам была проведена анестезия кетамин гидрохлоридом. Пробы отбирали из печени. Образцы хранили при –20°C.

Выделение ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием набора Exgene Cell SV kit (GeneAll Biotech Korea, # 101-106) по протоколу производителя. Качество и количество экстрагированной ДНК определяли с использованием электрофореза в агарозном геле и спектрофотометрии соответственно.

Обнаружение трансгенных мишеней. Присутствие или отсутствие *P35*, *T35* и *CryIA(b)* определяли амплификациями с использованием ПЦР с помощью пары специфических праймеров (табл. 1).

Программы амплификации выполнены на основе табл. 2. Электрофорез в агарозном геле (1–2%) использовали для анализа амплификации с шагом ДНК 50 пн. Отрицательным контролем служили образцы с бидистиллированной водой вместо ДНК. Положительным контролем был образец с интересующими мишенями. Все тесты амплификации были повторены трижды.

Табл. 2 показывает время и температуру полимеразной цепной реакции для применяемых специфических праймеров. Время первого плавления для всех праймеров — 5 мин при 94°C, финальная элонгация — 5 мин при 72°C.

Статистический анализ. Обработку данных проводили с использованием программного обеспечения SPSS (версия 16). Поскольку фрагментов ДНК не было найдено ни в одной из групп, результаты статистических тестов не приведены.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническое обследование. На всем протяжении 90-дневного периода исследования не наблюда-

Таблица 2. Программа амплификации для специфичных праймеров, используемых в исследовании

Праймер	Денатурация	Отжиг	Элонгация
CryIA(b)I	30 с при 94°C	30 с при 62.5°C	30 с при 72°C
CryIA(b)II	»	30 с при 60°C	»
T35	»	30 с при 58°C	»
T35S	»	30 с при 59.3°C	»
P35	»	30 с при 55°C	»
CryIA(b)III	»	30 с при 60.5°C	»

Примечание. Число циклов для каждого праймера – 32.

лось никаких клинических симптомов в группах животных.

Качественный и количественный анализ извлеченной ДНК. В качественно выделенной ДНК наблюдался большой фрагмент ДНК без каких-либо примесей. Количественный анализ соответствовал стандартным значениям.

Обнаружение трансгенных мишеней. Оценка амплификаций всеми парами праймеров, использованными в этом исследовании, не выявила ампликонов по сравнению с положительным контролем (рис. 1). Количественный анализ показал стандартные значения (35 ± 5.6 нг/мкл при очистке 1.7 ± 0.16).

Рис. 1 показывает результаты электрофореза. Использовался метод пулирования образцов (пять животных на одну микротубу, всего четыре микротубы для группы из 20 животных).

ОБСУЖДЕНИЕ

Наше исследование не выявило какого-либо существенного подтверждения сохранности и присутствия трансгенов *cryIA(b)*, *P35* и *T35* в пе-

чени крыс как в контрольной, так и в экспериментальной группе.

В 2003 г. было проведено исследование по изучению возможного присутствия ДНК трансгенных растений в рубце, двенадцатиперстной кишке, молоке, кале и крови дающих молоко коров, вскармливаемых соевой мукой и семенами трансгенной кукурузы [37]. Результаты показали, что трансгены (*cp4epsr* и *cryIa(b)*) обнаружены только в рубце и двенадцатиперстной кишке, но не обнаружены ни в одном из образцов крови, что подтвердило результаты исследований, проведенных Einspanier et al. [38]. По мнению Phipps et al. [37] причиной отсутствия компонентов ДНК в образцах кала может стать разрушение ДНК в желудочно-кишечном тракте до очень маленьких фрагментов, что не согласуется с исследованиями Einspanier et al. [38]. На самом деле на обнаружение любой растительной ДНК в кале животных может влиять целый набор факторов, включая форму приема пищи (цельное зерно или переработанный корм), количество реплицированной ДНК, полученной из небольшого числа необнаруженных участков репликации [37].

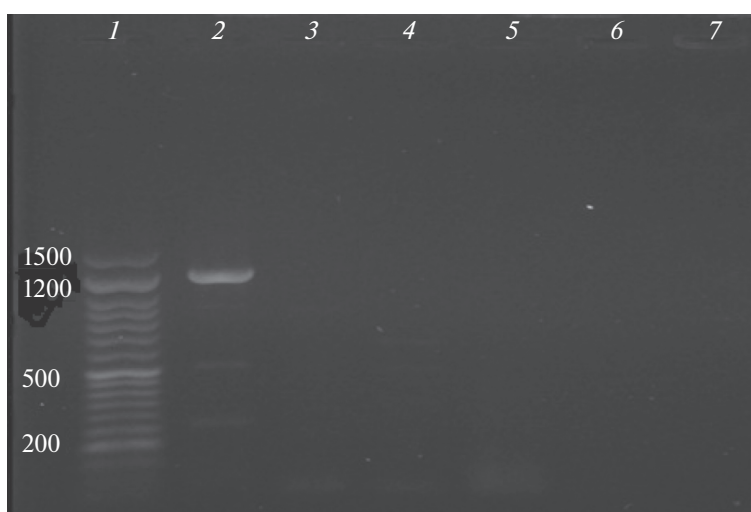


Рис. 1. Электрофорез в агарозном геле для оценки амплификации *CryIA(b)III* пар праймеров. 1 – маркер длин 50 bp DNA ladder; 2 – положительный контроль; 3–6 – экспериментальные образцы (пулирование для пяти животных); 7 – отрицательный контроль.

Nemeth et al. [39] провели ряд исследований на цыплятах-бройлерах, племенном скоте, дойных коровах и свиньях, которых кормили трансгенной кукурузой (MON810). Авторы показали, что ген *Rubisco (rbcl)* присутствует в мышечных образцах крупного рогатого скота, цыплят-бройлеров и свиней, а также в молоке крупного рогатого скота, но он не был обнаружен в печени экспериментальных животных. Кроме того, они показали, что *P35* не был найден ни в одной ткани всех исследованных животных. В нашем исследовании мы подтвердили такие выводы, так как также не нашли никаких остатков *P35* в печени крыс.

К настоящему времени уже есть несколько работ, которые показывают быструю деградацию генов и их взаимодействие в пищеварительном тракте животных [37, 39, 40]. В 2014 г. были проведены исследования на трансгенных крысах, которых кормили ген-модифицированной капустой (caMVP35S) [41]. Результаты эксперимента показали наличие фрагментов трансгенов в крови, печени и тканях мозга.

В противоположность вышеупомянутым исследованиям некоторые авторы сообщают, что фрагменты ДНК с генами кукурузы могут быть устойчивыми к полной деградации в пищеварительной системе при употреблении в пищу [40]. Согласно этим исследованиям такой результат указывает на кумулятивный эффект в крови, тканях печени и головного мозга и противоречит результатам Mazza et al. [42].

Результаты нашего исследования показали отсутствие существенных различий в сохранности трансгенов *cryIA(b)*, *T35* и *P35* в тканях печени контрольной и экспериментальной групп животных. Таким образом, наши результаты опровергают возможность переноса трансгенов в органы потребителя продуктов из ГМ-риса. Авторам известно, что крысы Спраг-Дуоли возможно не являются лучшей моделью для оценки токсичности продуктов, так как эта линия исходно использовалась для онкологических исследований [9, 43]. Детальный анализ должен опираться на современные технологии – высокопроизводительное секвенирование и биоинформационные подходы для оценки потенциальной опасности трансгенов [44, 45], включая изучение мРНК в трансгенных растениях [46].

Хотя результаты настоящего исследования показали, что трансгены из ГМ-риса Таром Молайи не переносятся в печень потребителя, мы не можем экстраполировать полученные данные на другие пары трансгенных организмов и их потребителей – необходимо проводить дальнейшие эксперименты. Последние работы по естественной генетической гетерогенности [47] показывают, что ряд факторов ведет к неправильной оценке варибельности, включая определение природного генотипа в от-

ношении трансгенных эффектов. Предложено использовать варибельность среди существующих сортов риса как критерий для оценки безопасности ГМ-риса [48].

Настоящий эксперимент был проведен в Научно-исследовательском центре безопасности продуктов питания и гигиены, Школа здравоохранения, Университет медицинских наук им. Шахида Садуги, Йезд, Иран. Авторы выражают благодарность этому Университету за поддержку исследования.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seck P.A., Diagne A., Mohanty S., Wopereis M.C. Crops that feed the world 7: Rice // Food Security. 2012. V. 4. № 1. P. 7–24. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0168-1>
2. Choi H., Moon J.-K., Park B.-S. et al. Comparative nutritional analysis for genetically modified rice, Iksan483 and Milyang204, and nontransgenic counterparts // J. Korean Soc. Applied Biol. Chem. 2012. V. 55. P. 19–26. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-0004-5>
3. Séralini G.-E., Clair E., Mesnage R. et al. RETRACTED: Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize // Elsevier. 2012. / Séralini G.E., Clair E., Mesnage R. et al. Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize // Environ. Sci. Eur. 2014. V. 26. P. 14. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0014-5>
4. Ezzaher A. Genetically modified foods against hunger in developing countries // J. Food Quality and Hazards Control. 2015. V. 2. № 4. P. 111.
5. Estruch J.J., Carozzi N.B., Desai N. et al. Transgenic plants: an emerging approach to pest control // Nat. Biotechnol. 1997. V. 15. № 2. P. 137. <https://doi.org/10.1038/nbt0297-137>
6. Matteson P.C. Insect pest management in tropical Asian irrigated rice // Annual Rev. Entomol. 2000. V. 45. № 1. P. 549–574.
7. Alderborn A., Sundström J., Soeria-Atmadja D. et al. Genetically modified plants for non-food or non-feed purposes: straightforward screening for their appearance in food and feed // Food Chem. Toxicol. 2010. V. 48. № 2. P. 453–464. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.049>
8. Zhang W., Shi F. Do genetically modified crops affect animal reproduction? A review of the ongoing debate // Animal. 2011. V. 5. № 7. P. 1048–1059. <https://doi.org/10.1017/S1751731110002776>
9. Panchin A.Y., Tuzhikov A.I. Published GMO studies find no evidence of harm when corrected for multiple

- comparisons // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017. V. 37. № 2. P. 213–217.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1130684>
10. Kumar P.A., Sharma R.P., Malik V.S. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* // *Adv. Appl. Microbiol.* 1996. V. 42. P. 1–43.
 11. Song H., He X., Zou S. et al. A 90-day subchronic feeding study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein in Sprague–Dawley rats // *Transgenic Res.* 2015. V. 24. № 2. P. 295–308.
<https://doi.org/10.1007/s11248-014-9844-6>
 12. Cao S., He X., Xu W. et al. Safety assessment of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice T1c-19 in Sprague–Dawley rats from metabolomics and bacterial profile perspectives // *IUBMB Life.* 2012. V. 64. № 3. P. 242–250.
<https://doi.org/10.1002/iub.601>
 13. Li Z., Gao Y., Zhang M. et al. Effects of a diet containing genetically modified rice expressing the Cry1Ab/1Ac protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) on broiler chickens // *Arch. Animal Nutrition.* 2015. V. 69. № 6. P. 487–498.
<https://doi.org/10.1080/1745039X.2015.1087749>
 14. Brookes G., Barfoot P. Economic impact of GM crops: the global income and production effects 1996–2012 // *GM Crops Food.* 2014. V. 5. № 1. P. 65–75.
<https://doi.org/10.4161/gmcr.28098>
 15. Brookes G., Barfoot P. Farm income and production impacts of using GM crop technology 1996–2015 // *GM Crops Food.* 2017. V. 8. № 3. P. 156–193.
<https://doi.org/10.1080/21645698.2017.1317919>
 16. Bhullar N.K., Gruissem W. Nutritional enhancement of rice for human health: the contribution of biotechnology // *Biotechnol. Advances.* 2013. V. 31. № 1. P. 50–57.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.001>
 17. Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Гибридологический анализ наследования мозаичного характера экспрессии *nptII*-гена у трансгенных растений табака // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 6. С. 641–649.
<https://doi.org/10.7868/S0016675816060084>
 18. Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Трансгенные растения как модели для изучения эпигенетической регуляции экспрессии генов // *Вавиловский журн. генетики и селекции.* 2015. Т. 19. № 5. С. 545–551.
<https://doi.org/10.18699/VJ15.071>
 19. Трифонова Е.А., Савельева А.В., Романова А.В. и др. Трансгенная экспрессия нативной и мутантной нуклеазы *Serratia marcescens* модулирует устойчивость табака *Nicotiana tabacum* L. к вирусу табачной мозаики // *Генетика.* 2015. Т. 51. № 7. P. 835–840.
<https://doi.org/10.1134/S1022795415070133>
 20. Жирнов И.В., Трифонова Е.А., Романова А.В. и др. Индуцированная экспрессия гена рибонуклеазы III *Serratia marcescens* в трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum* L. cv. SR1 // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 11. С. 1256–1261.
<https://doi.org/10.7868/S0016675816110175>
 21. Fujimoto H., Itoh K., Yamamoto M. et al. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* // *Biotechnology (N.Y.).* 1993. V. 11. № 10. P. 1151–1155.
 22. Ghareyazie B., Alinia F., Menguito C.A. et al. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cryIA(b)* gene // *Mol. Breeding.* 1997. V. 3. № 5. P. 401–414.
<https://doi.org/10.1023/A:1009695324100>
 23. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=221>. (Access date 08/02/2019).
 24. Yavari B., Sarami S., Shahgaldi S. et al. If there is really a notable concern about allergenicity of genetically modified foods? // *J. Food Quality and Hazards Control.* 2016. V. 3. № 1. P. 3–9.
 25. Wang Y., Wei B., Tian Y. et al. Evaluation of the potential effect of transgenic rice expressing Cry1Ab on the hematology and enzyme activity in organs of female Swiss rats // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 11. P. e80424.
 26. Spisák S., Solymosi N., Ittész P. et al. Complete genes may pass from food to human blood // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 7. P. e69805.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069805>
 27. EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials // *Food Chem Toxicol.* 2008. V. 46. № Suppl. 1. P. S2–S70.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.008>
 28. Zou S., Huang K., Xu W. et al. Safety assessment of lepidopteran insect-protected transgenic rice with *cry2A** gene // *Transgenic Res.* 2016. V. 25(2). P. 163–172.
 29. Schröder M., Poulsen M., Wilcks A. et al. A 90-day safety study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats // *Food Chem. Toxicol.* 2007. V. 45. № 3. P. 339–349.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.09.001>
 30. Hammond B., Dudek R., Lemen J., Nemeth M. Results of a 90-day safety assurance study with rats fed grain from corn borer-protected corn // *Food Chem. Toxicol.* 2006. V. 44. № 7. P. 1092–1099.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.01.003>
 31. Tan X., Zhou X., Tang Y. et al. Immunotoxicological evaluation of genetically modified rice expressing Cry1Ab/Ac protein (TT51-1) by a 6-month feeding study on cynomolgus monkeys // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 9. P. e0163879.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163879>
 32. Mao J., Sun X., Cheng J.H. et al. A 52-week safety study in cynomolgus macaques for genetically modified rice expressing Cry1Ab/1Ac protein // *Food Chem. Toxicol.* 2016. V. 95. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.015>
 33. Opara C.N., Elijah A.I., Adamu L.G., Uzochukwu S.V. Screening for genetically modified maize in raw and processed foods sold commercially in Southern Nigeria boarder states // *Applied Food Biotechnol.* 2016. V. 3. № 3. P. 150–158.
 34. Zaulet M., Rusu L., Kevorkian S. et al. Detection and quantification of GMO and sequencing of the DNA amplified products // *Romanian Biotechnol. Letters.* 2009. V. 14. № 5. P. 4733–4746.
 35. Debode F., Janssen E., Berben G. Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminators (t35S, tE9, tOCS, tg7) // *Eur. Food Res. Technol.* 2013. V. 236. № 4. P. 659–669.
<https://doi.org/10.1007/s00217-013-1921-1>

36. *International Organization for Standardization*. Foodstuffs: Methods of Analysis for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products: Qualitative Nucleic Acid Based Methods, Amendment 1: (ISO 21569:2005/Amd1:2013). 2013.
37. Phipps R., Deaville E.R., Maddison B.C. Detection of transgenic and endogenous plant DNA in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood, and feces of lactating dairy cows // *J. Dairy Sci.* 2003. V. 86. № 12. P. 4070–4078. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74019-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74019-3)
38. Einspanier R., Bieser B., Reischl J., Prella K. First identification of caldesmon transcripts in bovine oviduct epithelial cells in vitro by means of an RNA differential display technique examining culture-induced expression changes // *Reprod. Domest. Anim.* 2001. V. 36. № 5. P. 230–235.
39. Nemeth A., Wurz A., Artim L. et al. Sensitive PCR analysis of animal tissue samples for fragments of endogenous and transgenic plant DNA // *J. Agricultural Food Chem.* 2004. V. 52. № 20. P. 6129–6135. <https://doi.org/10.1021/jf049567f>
40. Tony M., Butschke A., Broll H. et al. Safety assessment of Bt 176 maize in broiler nutrition: degradation of maize-DNA and its metabolic fate // *Arch. Animal Nutrition.* 2003. V. 57. № 4. P. 235–252.
41. Oraby H.A.S., Kandil M.M.H., Hassan A.A.M., Al-Sharawi H.A. Addressing the issue of horizontal gene transfer from a diet containing genetically modified components into rat tissues // *Afr. J. Biotechnol.* 2014. V. 13(48). P. 4410–4418. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.14088>
42. Mazza R., Soave M., Morlacchini M. et al. Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues // *Transgenic Res.* 2005. V. 14. № 5. P. 775–784. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-0009-5>
43. Panchin A.Y. Toxicity of roundup-tolerant genetically modified maize is not supported by statistical test // *Food Chem. Toxicol.* 2013. V. 53. P. 475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.039>
44. Zhao K., Ren F., Han F. et al. Edible safety assessment of genetically modified rice T1C-1 for Sprague Dawley rats through horizontal gene transfer, allergenicity and intestinal microbiota // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 10. P. e0163352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163352>
45. Haddad N., Johnson N., Kathariou S. et al. Next generation microbiological risk assessment-Potential of omics data for hazard characterisation // *Int. J. Food Microbiol.* 2018. V. 287. P. 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.015>
46. Peng C., Chen X., Wang X. et al. Comparative analysis of miRNA expression profiles in transgenic and non-transgenic rice using miRNA-Seq // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 338. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18723-x>
47. Michno J.M., Stupar R.M. The importance of genotype identity, genetic heterogeneity, and bioinformatic handling for properly assessing genomic variation in transgenic plants // *BMC Biotechnol.* 2018. V. 18. № 1. P. 38. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0447-9>
48. Wang F., Dang C., Chang X. et al. Variation among conventional cultivars could be used as a criterion for environmental safety assessment of Bt rice on nontarget arthropods // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 41918. <https://doi.org/10.1038/srep41918>

Testing Safety of Genetically Modified Products of Rice: Case Study on Sprague Dawley Rats

M. Shirdeli^{a, b}, Y. L. Orlov^{c, d, *}, G. Eslami^{a, e, **}, B. Hajimohammadi^{a, b, ***}, L. E. Tabikhanova^c,
M. H. Ehrampoush^a, M. E. Rezvani^f, H. Fallahzadeh^g, H. Zandi^{a, h}, S. S. Hosseini^a,
S. Ahmadian^{a, e}, S. Mortazavi^a, R. Fallahiⁱ, and S. L. Asadi-Yousefabad^j

^aResearch Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

^bDepartment of Food Hygiene and Safety, School of Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

^cInstitute of Cytology and Genetics Siberian Branch Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^dSechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

^eDepartment of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

^fDepartment of Physiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

^gDepartment of Biostatistics and Epidemiology, Daneshjoo Boulevard, Health School,
Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

^hDepartment of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

ⁱAnimal Viral Diseases Research Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute,
Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran

^jStudent Research Committee, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

*e-mail: orlov_yury@yahoo.com

**e-mail: eslami_g2000@yahoo.com

***e-mail: b.hajimohammadi@gmail.com

This work presents an experimental study with the intervention of GM Tarom Molaii Cry1Ab rice feeding by Sprague Dawley rats. Therefore, in this study, the remaining of *CryIA(b)* gene and *P35* were assessed in the liver of rats fed with GM rice. Overall, 20 male and 20 female SD rats were fed by pellets made by GM rice in 50% of needed carbohydrate for 90 days. Then, sampling was done from rats liver. DNA extraction was done

based on the protocol. The quality and quantity of the extracted DNA was done by agarose gel electrophoresis and spectrophotometry, respectively. Detection of GM genes residues, including *CryIA(b)*, *P35*, and *T35* was done by Polymerase Chain Reaction using specific primer pairs. The results were analyzed by agarose gel electrophoresis alongside with 50 bp DNA ladder. The results were compared with the ones in control groups with feeding by standard pellet of non-modified rice. All amplification tests were done in triplicates. Analysis of the amplification of *P35*, *CryIA(b)* and *T35* showed no residues inside the liver tissue. The results showed no significant difference in the presence of transgenic gene of *cryIA(b)*, *T35*, and *P35* in the liver tissue between the control and experiment groups. Therefore, this study rejects the possibility of gene settle of GM rice gene residues in liver tissue of the animal model studied.

Keywords: genetically modified rice, transgene, food safety, Sprague Dawley rat, liver, *CryIA(b)*, *P35*, *T35*.