

УДК 575.22:58

**Б.В. СОРОЧИНСЬКИЙ, О.М. БУРЛАКА ,
В.Д. НАУМЕНКО, А.С. СЕКАН**
Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України», Київ
E-mail: bsorochinsky@yahoo.com

НЕПЕРЕДБАЧЕНІ ЕФЕКТИ ГЕНЕТИЧНИХ МОДИФІКАЦІЙ РОСЛИН ТА МЕТОДИ ЇХНЬОГО АНАЛІЗУ



Аналізується проблема непередбачених ефектів, які можуть бути обумовлені генетичними модифікаціями рослин. Обговорюються фактори, що спричиняють виникнення непередбачених ефектів в генетично модифікованих рослинах, наслідки, які вони можуть спричинити, та можливість мінімізації їх шляхом застосування вдосконалених методів генної інженерії. Описуються сучасні методичні підходи до аналізу непередбачених ефектів як етапу оцінки безпеки трансгенних рослин, зокрема методи молекулярного профілювання з використанням різних «-омік»-технологій.

© Б.В. СОРОЧИНСЬКИЙ, О.М. БУРЛАКА, В.Д. НАУМЕНКО,
А.С. СЕКАН, 2011

Створення та подальша комерціалізація генетично модифікованих (ГМ) рослин спровокували багато дискусій, які тривають і досі. Відбулося багато обговорень проблеми безпеки ГМ продуктів харчування та пов'язаних з цією проблемою питань, таких як право споживача на інформацію, маркування, етичні та релігійні аспекти тощо. Прийняття Закону України про біобезпеку, зростання числа ГМ продуктів харчування, що дозволені у Європейському Союзі, та збільшення світового обсягу торгівлі генетично модифікованими організмами потребує ревізії фактів та думок, що супроводжують цю технологію з метою підвищення інформованості населення для прийняття обґрунтованих рішень. Технології, що були нещодавно розроблені для аналізу якості їжі та для вивчення її впливу на здоров'я людей, а також раніше отримані наукові результати можуть підтвердити безпеку генетично модифікованої продукції та дозволяють ідентифікувати потенційні ризики для тих рослин і продуктів харчування, які зараз створюються.

Перше повідомлення про успішне створення ГМ рослини з'явилося у 1983 р., у ньому описувалось перенесення у рослини тютюну гена стійкості до комах [1].

ГМ продуктом, що вперше був дозволений для харчування людини, були FlavrSavr томати, створені каліфорнійською компанією Calgene. Ці томати мали покращену здатність до зберігання завдяки перенесенню антисенсового гена полігалактуронази [2]. Вперше вони були продані у 1994 р. в США, і хоча Адміністрація з продуктів харчування та медикаментів (US Food And Drug Administration) стверджувала, що немає жодних ризиків для здоров'я і склад поживних елементів був незмінним, вони були комерціалізовані лише протягом декількох років.

У 2009 р., через 15 років після початку комерціалізації, трансгенні рослини вирощувалися вже на 134 млн га (9 % від загальних 1,5 млрд га світових площ сільськогосподарських земель). Зараз трансгенні рослини вирощують у 25 країнах, в яких проживає 3,6 млрд, або 54 % світового населення. Шість країн з найбільшими площами вирощування генетично модифікованих культур – це США (64,0 млн га), Бразилія (21,4 млн га), Аргентина (21,3 млн га), Індія (8,4 млн га), Канада (8,2 млн га) та Китай (3,7 млн га). Решта 7 млн га площ посівів трансгенних рослин припадають на 19 інших країн

світу. З 1996 по 2009 рр. світові площі, на яких вирощуються ГМ рослини, зросли у 80 разів. Станом на 2009 р. ще у 32 країнах було дозволено ввезення та використання таких рослин для харчування людини і тварин. Прогнозується, що у проміжку між 2006 і 2015 рр. площа посівів під трансгенні рослини з різними ознаками подвоїться [4].

Основними ознаками, що привнесені в комерціалізовані рослини, є стійкість до гербіцидів, а також до шкідників. Ці характеристики забезпечують певні переваги при вирощуванні таких рослин. Зокрема було показано, що забезпечення стійкості до гербіцидів спричиняє менше шкоди для довкілля, ніж технології боротьби з бур'янами, які воно замінило, і веде до істотного зменшення забруднення поверхневих вод, ґрунту та повітря [5, 6]. Крім того, вирощування трансгенних рослин призвело до певних змін у технологіях обробки ґрунту [7], що дозволяє захистити ґрунт від нагрівання, зберегти вологість та запобігти ерозії. Це веде також до збереження часу, енергії, техніки і, як наслідок, до зменшення викидів вуглекислого газу [8]. Впровадження у рослини ознаки стійкості до шкідників також призвело до відчутних позитивних ефектів, серед яких зменшення використання інсектицидів та захист здоров'я фермерів завдяки зменшенню їхнього контакту з пестицидами [9]. Використання таких рослин також зменшило витрати енергії та техніки і зумовило покращення якості продуктів (за рахунок обмеження вмісту мікотоксинів) [10, 11].

Однак питання оцінки ризиків та користі від використання нової сільськогосподарської технології продовжує залишатися актуальним. Незважаючи на оприлюднені переваги як для виробників, так і для довкілля від використання ГМ рослин, стійких до гербіцидів та шкідників, громадські організації стверджують, що такі переваги не визнаються більшістю споживачів. Очікується, що так зване «наступне покоління ГМ рослин», які розробляються зараз, дозволить змінити таке сприйняття [12]. Ці нові рослини матимуть нові властивості, що будуть корисними для здоров'я людини, оскільки міститимуть більше вітамінів, будуть здатні зберігатися більш тривалий час, а також синтезуватимуть різні фармацевтичні сполуки,

такі як протипухлинні та терапевтичні агенти, істивні вакцини [13, 14].

Найбільше занепокоєння громадськості ще донедавна викликало питання про можливість перенесення маркерних генів, що забезпечують стійкість до антибіотиків, до геному інших організмів, насамперед мікрофлори, що живе у кишечнику ссавців, і, відповідно, подальшого набуття такими організмами стійкості до антибактеріальних сполук. Можливість горизонтального перенесення маркерних генів, які забезпечують стійкість до антибіотиків (гени стійкості до антибіотиків не впливають на поживний склад, алергенність і/або токсичність нових ГМ харчових продуктів), дійсно показана експериментально у невеликій кількості публікацій, однак переважна більшість досліджень свідчать про відсутність будь-яких ризиків для людини та тварин, позаяк перенесення маркерних генів стійкості до антибіотиків від ГМ рослин до бактерій, які не містять таких генів, надзвичайно малоімовірне [15–17]. Встановлено наприклад, що в оптимізованих умовах трансформації імовірність інтеграції гена стійкості до канаміцину в бактеріальний геном складає менше 10^{-13} [18]. За результатами експериментів *in vitro*, в яких вивчалася ймовірність горизонтального перенесення генів від ГМ рослин (трансгенна картопля з геном бета-лактамази) до бактерій, частота трансформації була оцінена як дуже низька або така, що прямує до нуля (менше $2 \cdot 10^{-17}$ на клітину) у природних умовах [19]. Селективний відбір ґрунтових бактерій з ділянок польових випробувань ГМ рослин, що містять маркерні гени стійкості до антибіотиків, також виявив відсутність трансформованих бактерій [20, 21].

Потенційні ризики для здоров'я детально обговорені у публікації [22], при цьому враховувалося, що ризик у 0 % є статистично неможливим. Перед вивільненням на ринок продукти, отримані з ГМ рослин, так само як і інші нові продукти, дуже детально вивчаються з метою встановлення їхнього потенційного впливу на здоров'я людини. У публікації Koenig et al. [23] узагальнено методи, що розроблені для оцінки безпечності продуктів, отриманих з ГМ рослин. Оцінка ризиків для передбачуваних ефектів здійснюється завдяки спеціальним тестам *in vitro* та клінічним тестам, однак деякі науко-

ві групи акцентують увагу на потребі аналізу непередбачених (або ж неочікуваних, нецільових, чи *unintended*) ефектів [24, 25], хоча при цьому немає жодних підстав стверджувати, що такі ефекти є більш характерними для ГМ рослин, ніж для традиційних культур.

Всі методи, що використовуються для селекції рослин або маніпулювання їхніми ознаками, включаючи самозапилення та перехресне запилення, гібридизацію, мутаційну селекцію (хімічний та радіаційний мутагенез), біотехнологічні методи (злиття протопластів і технології рекомбінантної ДНК), мають певний потенціал викликати неочікувані ефекти [26]. Існують експериментально підтвержені свідчення того, що різні методи обумовлюють різну імовірність виникнення таких ефектів, зокрема найменше їх виникає при використанні селекції в гомогенних популяціях, найбільше – при застосуванні методів хімічного, радіаційного мутагенезу, тоді як методи генної інженерії за цим показником займають проміжне місце [27, 28]. Застосування методів, що продукують менше неочікуваних ефектів, має більш обмежені можливості для створення нових рослин з певною ознакою, тоді як застосування методів, які забезпечують широкі можливості для прояву нової ознаки, пов'язане із більшою імовірністю виникнення також і нецільових ефектів. Прикладом виникнення негативних непередбачених ефектів при застосуванні традиційної селекції можуть бути публікації про те, що гарбузи, отримані методами традиційної селекції, спричинили харчові отруєння [29]; різновид традиційної селери, стійкої до пестицидів, спричинив захворювання у працівників сільського господарства (виявилось, що містить у сім разів більше псораленів, ніж звичайна селера) [30]; різновид картоплі *Lenape* містив дуже високі рівні токсичного соланіну і в результаті був вилучений з вирощування [31].

З огляду на це зараз приділяється велика увага вивченню, передбаченню та поясненню механізмів виникнення непередбачених (неочікуваних) ефектів, що можуть мати місце в трансгенних культурах [26, 32, 33]. До непередбачених ефектів, які проявляються у результаті генно-інженерних маніпуляцій з рослинами, слід віднести синтез нових метаболітів різної природи, що обумовлений трансформацією

рослини і може вплинути на її (рослини) властивості. Непередбачені ефекти також визначають як статистично достовірні відмінності фенотипу, метаболізму, хімічного складу генетично модифікованих рослин у порівнянні з батьківськими формами, за винятком відмінностей, які були прямою метою трансгенезу. Таке визначення вимагає, щоб ГМ і не ГМ рослини вирощувалися в однакових умовах. Окрім того, непередбачені ефекти генетичної трансформації класифікують на дві групи – прогнозовані і непрогнозовані [34]. Прогнозовані можуть бути пояснені з точки зору наявних відомостей про метаболізм рослини і функції трансгена, а також про умови та наслідки його інтеграції у ДНК хазяїна. Наприклад, трансгенний ріпак містив підвищені рівні каротиноїдів у насінні, що є цільовим ефектом трансформації, але поряд із цим виявився неочікуваним знижений вміст інших сполук (токоферолів та хлорофілів) [35]. Ці результати не стали повністю несподіваними, тому що відомо про зв'язок метаболічних шляхів продукції каротину та токоферолів і хлорофілів. Непрогнозовані ефекти, навпаки, не мають очевидного пояснення. В описаному експерименті з підвищеним вмістом каротину у трансгенному ріпаку склад жирних кислот був також змінений, а саме збільшився вміст олеїнової і зменшився вміст лінолевої та ліноленої кислот, тоді як про зв'язок між синтезом жирних кислот та каротиноїдів нічого не відомо.

При використанні технологій рекомбінантних ДНК неочікувані ефекти можуть виникнути через непередбачуваність взаємодії привнесених генів із генами організму-хазяїна та проявом цих нових поєднань генів на рівні фенотипу і в різних умовах навколишнього середовища. Включення багатьох копій трансгена у геном та ефект положення за умови випадкової інтеграції часто асоційовані із нестабільністю експресії трансгена [26]. Випадкове вбудовування послідовностей привнесеної ДНК може спричинити перебудови ДНК поряд із ділянкою вбудовування трансгена, модифікацію, послаблення чи припинення експресії, розрив існуючих генів, а також активацію генів, що «мовчать». Генетичні конструкції можуть розпадатися на фрагменти та вбудовуватися у різні ділянки геному хазяїна [36–39]. Після

того як трансген починає експресуватися, існує певна ймовірність того, що його продукт може вплинути на метаболізм рослини. Наприклад, організм може відреагувати припиненням експресії трансгена [40], або ж можливим є припинення синтезу сполук, які присутні в контролі, і тому ефект трансгенезу стає протилежним від бажаного [41]. Крім того, метод культури тканин *in vitro*, який використовується з метою регенерації рослин після успішного трансгенезу, сам по собі може спричинити збільшення кількості мутацій у геномі [42]. Оскільки організми одного виду генетично не ідентичні між собою, то привнесена генетична конструкція може проявлятися по-різному у різних екземплярів одного і того ж виду [43]. Неочікувані ефекти можуть виникати також, коли трансгенний організм зазнає впливу змінених умов середовища [44, 45].

Прикладом може бути трансгенний ячмінь, що містив привнесені гени *BAR*, *uidA* та ген термостабільної бета-глюканази і демонстрував незмінні рівні бета-глюканази, але за рядом фенотипових ознак, які визначаються взаємодією генотипу і середовища, мав гірші властивості, ніж традиційний ячмінь [46]. У рослин ріпаку насіння-специфічна посилена експресія фітоенсинтази спричинила зростання у 500 разів вмісту альфа- та бета-каротину, але не лютеїну, який був основним каротиноїдом для групи контрольних рослин [35]. Стебла *Vt* кукурудзи містили більше лігніну, ніж контроль, що впливає відповідно на деградацію біомаси таких рослин [47]. Ріпак з привнесеним геном *bar*, що знаходився під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти *CaMV*, став чутливим до гербіциду після інфікування цим вірусом [48]. Трансгенний рис з геном гліциніну сої мав на 20 % вищий вміст білка та на 50 % вищий вміст вітаміну B_6 [49].

Дослідження трансгенних ліній картоплі з модифікованим розщепленням вуглеводів [50] шляхом профілювання 88 метаболітів показало, що ГМ картопля характеризувалася змінним вмістом більшості з цих 88 речовин, навіть при тому, що продукція багатьох з них, наприклад амінокислот, не пов'язана з циклом розщеплення вуглеводів, який був об'єктом генетичної маніпуляції. При цьому різні трансгенні лінії відрізнялися між собою та від зви-

чайних рослин картоплі. Також було виявлено дев'ять речовин у ГМ рослинах, які не виявлялися у немодифікованих рослинах. В листі трансгенної картоплі, трансформованої генами лектинів, спостерігали зменшені рівні глікоалкалоїдів, які є токсичними для ссавців та багатьох комах, що може впливати на природну здатність картоплі протистояти кохам [51]. Неочікувані ефекти можуть іноді виявлятися лише у певних умовах. Так, було зазначено, що трансгенні інсектицид-продукуючі (*Vt*) рослини бавовнику не завжди стійкі до комах і особливо сприйнятливі до шкідників у період формування рослиною коробочок при підвищених температурах навколишнього середовища. Експериментально встановлено, що висока температура під час формування коробочок спричиняє істотне послаблення продукції *Vt*-токсину у листі *Vt*-бавовнику [45].

Виникнення та аналіз у складі ГМ рослин непередбачених змін, які можуть бути результатом трансформації рослин, є одним із ключових елементів процедури оцінки ризиків нових організмів. Випадкове включення генів у геном організму-хазяїна може призвести до неочікуваних змін в процесах метаболізму, що в свою чергу веде до накопичення вторинних метаболітів, серед яких можуть бути присутні і токсини [52]. Здійснюване завдяки сучасним інструментальним методам молекулярне профілювання трансгенів поступово стає важливим етапом в оцінці безпечності нових ГМ організмів. Стратегія проведення таких досліджень з використанням різних методик дозволяє встановити зміни в цих організмах на рівні складу і вмісту основних метаболітів, структури геному, експресії генів, трансляції та аналізу метаболічних шляхів. До сучасних методів, що дозволяють дослідити непередбачувані ефекти в генетично модифікованих організмах, варто віднести ДНК/РНК мікроарей-технології, методи аналізу протеому і транскриптому та інші аналітичні підходи, що допомагають сформулювати повну картину про молекулярну композицію трансгенного організму [25, 53–62]. Використання газової хроматографії (GC) з мас-спектрометрією (MS) дозволяє ідентифікувати та кількісно визначати відомі та невідомі компоненти, зокрема і метаболіти з низькою молекулярною масою [53].

Метод GC-TOFMS (time of flight) передбачає використання «часо-пролітного» мас-аналізатора і має власні переваги у чутливості та швидкості проведення аналізу [54]. Високо-ефективна рідинна хроматографія (HPLC) з мас-спектрометрією більш прийнятна, ніж газова хроматографія, для термолабільних та молекул з великою масою, що включають фосфати, ліпіди і численні вторинні метаболіти (алкалоїди, флавоноїди, глюкозинолати, ізопреноїди, оксиліпіни, фенілпропаноїди, пігменти, сапоніни). Розширені можливості для аналізу створює також використання Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) [55] та HPLC-ESI-MS (Electrospray Ionisation Mass Spectrometry) [56]. Метод FTICR-MS (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry) забезпечує більш точне визначення маси, ніж TOF [57]. Застосування DIMS (Direct Injection Mass Spectrometry) або FIE-MS (Flow Injection Electrospray-MS) не вимагає попереднього хроматографічного розділення досліджуваних сумішей. Ця методика швидка, але менш надійна для кількісного аналізу, ніж ті, що включають етап розділення [58]. Використання ЯМР-спектроскопії, що швидко поширюється в останні роки, зробило можливим прямий аналіз екстрактів або навіть інтактних тканин завдяки «magic angle spinning» (MAS) [59–62]. Потенційно, ЯМР-спектроскопія може виявити будь-яку молекулу, що містить один або більше атомів з відмінним від нуля магнітним моментом. Цей метод є недеструктивним і неінвазивним. З його використанням можна проводити аналіз зразків *in vivo*, але це не дає змоги виявити складові, що знаходяться в дуже низькій концентрації. Чутливість методу може бути підвищена завдяки застосуванню магнітних полів з дуже високою напруженістю, а також завдяки використанню криогенних зондів (cryogenic probe heads), що призводить до зростання співвідношення сигнал : шум в 3–4 рази внаслідок охолодження систем детекції (але не зразку) до 20 °K [59].

Для встановлення композиційного складу трансгенних рослин запропоновано два різних підходи [25]. Першим з них є так званий цільовий підхід, який постійно використовують для оцінювання нових комерціалізованих ГМ

продуктів. При ньому і вивчаються декілька поживних харчових елементів, і якщо їхній вміст змінився, можна говорити про зміну поживних властивостей і навіть про ризики модифікованих продуктів. При такому підході не враховуються ні невідомі антипоживні сполуки, ні природні токсини. Так, наприклад, було здійснено цільовий аналіз 50 ліній трансгенної картоплі за обраними компонентами (розчинні вуглеводи, глікоалкалоїди, вітамін С, жирні кислоти, вільний азот, інгібітори трипсину) з використанням методів високоефективної аніонообмінної хроматографії (НРАЕС), високороздільної рідинної хроматографії (HPLC), газової хроматографії, мас-спектрометрії. Проведений аналіз не виявив суттєвих відмінностей чи виникнення непередбачуваних ефектів у трансгенних рослин порівняно з їхніми контролями [63].

Інша стратегія заснована на нецільовому підході з використанням методів профілювання, які дозволяють встановити потенційні зміни у ГМ організмах на рівні геному, експресії генів, трансляції, метаболічних шляхів. Незважаючи на те, що цільовий підхід для оцінки потенційно небезпечних наслідків генетичної модифікації все ще широко використовується, у нещодавніх дослідженнях вже започатковано використання методів профілювання з метою детектування різних неочікуваних та непередбачуваних ефектів і, відповідно, підвищення ефективності оцінки безпечності ГМ продуктів.

Концепція композиційної еквівалентності, яка є початковим пунктом в оцінці безпечності ГМ рослин, передбачає таку подібність трансгенних та контрольних рослин, що вони можуть бути визнані однаковими [64, 65]. Але оскільки зараз відсутні спеціальні статистично обґрунтовані стандарти [66], виникає питання про те, яка саме різниця у складі продукту є допустимою, а яка – непринятною [67]. Використання методів широкомасштабного аналізу не ГМ різновидностей сільськогосподарських рослин дозволяє встановити межу природної варіації якісних та кількісних показників, що може бути використано для обґрунтованих і адекватних оцінок безпечності трансгенних продуктів. Загалом оцінка нецільових ефектів потребує комплексного підходу через

те, що часто доводиться, окрім відомих факторів ризику конкретного продукту, виявляти такі, що раніше не фіксувалися для нього [68].

Було здійснено всебічний порівняльний аналіз загальних метаболітів для ГМ та традиційної картоплі, що вирощувалась в польових умовах [69]. Для цього використовували ієрархічний підхід із застосуванням FIE-MS, GC-TOF-MS, починаючи з швидкого метаболомного фінгерпринтингу для того, щоб отримати більш детальні профілі тих метаболітів, для яких очікувалися істотні відмінності. Автори показали, що ГМ картопля, яку використали в дослідженнях, була композиційно еквівалентною традиційним сортам, за винятком змін, що обумовлені генетичною модифікацією.

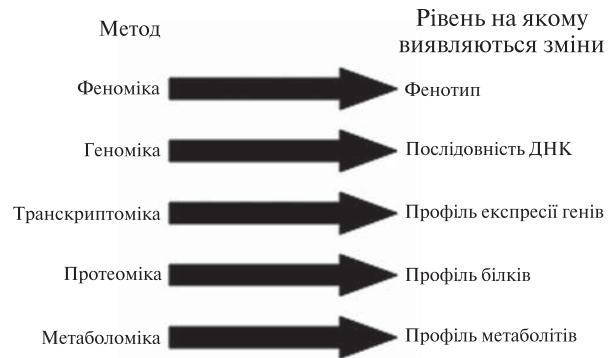
Згодом провели дослідження цих же зразків картоплі та зразків нового врожаю, використовуючи FIE-MS фінгерпринтинг, результати якого взагалі підтверджували попередні дані [70]. Профілювання генетично модифікованих за різними ознаками ліній картоплі двох різновидностей із використанням методів протонної (¹H) ЯМР-спектроскопії та HPLC-UV виявило більш суттєві відмінності між різновидностями, а не між ГМ лініями та їхніми контролями [60]. У половини ГМ ліній зі зміненим метаболізмом поліамінів спостерігалось значне відхилення фенотипових ознак від норми, але метаболічне профілювання виявило лише досить незначні зміни у біохімічному складі порівняно з контролями, які стосувалися підвищеного вмісту сполук, імовірно задіяних у осмотичному стресі. У подальшому з використанням ЯМР-спектроскопії, газової та рідинної хроматографії і мас-спектрометрії були досліджені ці та інші ГМ лінії. Здійснили також метаболомний аналіз традиційних сортів картоплі для визначення нормальних меж варіації [63]. Загалом не було відзначено істотних відмінностей між ГМ лініями та їхніми контролями, значно більшу варіацію зафіксували між різними сортами. Крім того, виявили клас фенольних поліамідних кон'югатів (кокоамінів), які раніше не ідентифікувалися у картоплі та інших видів *Solanaceae* [71], і які є очевидно безпечними для вживання в їжу, оскільки в результаті були знайдені в багатьох традиційних сортах картоплі, а дослідження їхньої біологічної активності викликало значний інтерес.

Порівняння композиційної еквівалентності генетично модифікованої пшениці з батьківськими лініями [72] із використанням ¹H ЯМР метаболічного профілювання виявило, що більш значна варіація була спричинена місцем та умовами вирощування, ніж генетичною модифікацією, додатковий аналіз з використанням GC-MS дозволив зробити висновки, що вплив навколишнього середовища на метаболічну варіацію більш значний, ніж генетична модифікація в даному випадку, і різниця між ГМ лініями та контролями знаходиться в таких же межах, як відмінності, що спостерігалися між лініями контролю, вирощуваних у різних місцях та у різні роки.

Для профілювання трансгенної та нетрансгенної кукурудзи, а також з метою характеристики окремих сортів було розроблено метод мас-спектрометрії, заснований на високороздільній рідинній хроматографії (RP-HPLC-ESI-MS (ion trap)) [73]. Цей метод було використано для профілювання різних білкових фракцій (альбуміни, глобуліни, проламіни та глютеніни), що були виділені з трансгенної Vt-кукурудзи та нетрансгенних сортів. Як приклад досліджень, що акцентовані на вивченні безпечності ГМ рослин, варто навести публікацію [74], де описані аналіз та характеристика шести різних трансформованих ліній *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn, які мали певні модифікації в біосинтезі флавоноїдів. Аналіз трансформантів та порівняльний аналіз для характеристики передбачуваних ефектів був здійснений із використанням ПЛР, кількісної ПЛР реального часу та високоефективної рідинної хроматографії. Для ідентифікації потенційних непередбачуваних ефектів, що викликані трансформацією, у ролі нецільового методу використали аналіз мікроареїв кДНК. Незважаючи на те, що трансгенні лінії містили різні привнесені елементи, у них не було встановлено жодних непередбачуваних змін. Вивчалася можливість використання 400 МГц протонної ЯМР спектроскопії та рідинної хроматографії для порівняльного аналізу низькомолекулярних сполук (хімічний фінгерпринтинг), що містилися у рослинних тканинах [75]. У публікації [76] описано профіль експресії кукурудзи MON 810, що вирощувалася в культурі *in vitro* та в польових умовах, і відповідних традицій-

них сортів та показано, що найбільша відмінність існує між двома традиційними сортами. Ці результати ще раз підтверджують, що MON810 і відповідні не ГМ сорти є еквівалентними між собою за винятком привнесеної ознаки. Для аналізу різноманіття не ГМ сортів вивчали протеом картоплі (*Solanum tuberosum* L.) [77]. Крім цього, з метою вивчення непередбачуваних ефектів у профілі білків досліджували також ГМ лінії картоплі. Відмінності між ГМ лініями та їхніми контролями були встановлені лише для 9 білків з 730 проаналізованих. Цей показник є набагато меншим між ГМ лініями та їхніми не ГМ контролями у порівнянні з показниками відмінності, що отримані між різними сортами, вирощуваними у різних умовах. У цій роботі кількість білків встановлювали мас-спектрометрією і доповнювали картою двомірного електрофорезу білків. У роботі [78] вивчали протеомний профіль двох поколінь (T05 та T06) трансгенної кукурудзи (MON810) у порівнянні з відповідними ізогенними контролями (WT05 і WT06). Відмінність була показана для 100 білків, що зумовлено зміною рівня експресії внаслідок зовнішніх впливів (WT06 проти WT05), в той час як для трансгенних рослин у порівнянні з їхнім контролем (T06 проти WT06) відмінності були зафіксовані для 43 білків. З використанням технології Affymetrix GeneChip порівнювали загальний профіль експресії генів у перших справжніх листках двох трансгенних та трьох традиційних сортів сої і встановили, що профіль експресії генів набагато більше відрізняється між двома традиційними сортами у порівнянні з відмінностями для трансгенних і найближчих традиційних сортів. Результати порівняння транскриптомів ліній трансгенної пшениці, що експресує додаткові гени глютенів під контролем власного ендосперм-специфічного промотора, показали, що трансгени, присутні в цих лініях, не спричинили появу непередбачених ефектів на експресію ендогенних генів, і трансгенні рослини були композиційно еквівалентні до відповідних батьківських ліній [79].

Таким чином, технології профілювання, що використовуються зараз, можуть бути потужним доповненням при оцінюванні безпечності ГМ продукції, оскільки надають можливість здійснити широкий скринінг різних змін у мо-



Методи «-омік» та сфери їхнього застосування за [58]

дифікованих організмів на різних рівнях, і здійснюється це у неселективний та неупереджений спосіб. Центральним питанням стратегії профілювання є процедура аналізу даних для того, щоб забезпечити отримання прийнятних і відтворюваних результатів та їхнє порівняння з даними, що генеруються різними «-омік»-технологіями. Сфери застосування різних таких технологій наведено на рисунку.

З метою мінімізації виникнення непередбачених ефектів, що можуть бути обумовлені генно-інженерними маніпуляціями з геномом рослин, замість стандартних промоторів, таких як 35S, велику увагу нині приділяють пошуку нових регуляторних генетичних елементів, які є складовою частиною геному цільової рослини. Зокрема, у публікації [80] описано промотор гена LP2 рису, який виявився ефективним елементом контролю експресії генів у зелених тканинах рису і, можливо, буде корисною частиною генетичної конструкції в інших рослинах. Інтерес до пошуку нових регуляторних елементів у самих рослинах-господарях пов'язаний із можливим обмеженням імовірності виникнення непередбачених ефектів та контролем над роботою привнесених генетичних конструкцій в геномі рослини. Іншим прикладом контролю за експресією генетичних вставок є використання PhiC31-рекомбінаційної системи, що виділена з різних помірних фагів *Streptomyces* [81]. Згадана система забезпечує сайт-специфічну рекомбінацію в зародкових тканинах, що надає перспективу для створення стабільних ГМ ліній. Використання такої системи відкидає потребу в маркерних генах, які є обов'язковими для створення трансгенних ліній рослин. Пошук

нових молекулярних інструментів регуляції експресії дозволить підвищити ефективність роботи чужорідних генів, зменшить ризик вивільнення ГМ вставок у навколишнє середовище і, ймовірно, полегшить процес генетичного модифікування рослин та відкриває нові перспективи у створенні генетично модифікованих рослин.

Узагальнюючи, варто сказати, що питання всебічної оцінки безпечності ГМ організмів залишається актуальним. З цією метою зараз використовують комплексний методологічний підхід для аналізу непередбачених наслідків генетичної модифікації, який дозволяє з високою точністю та детальністю виявляти зміни на різних рівнях функціонування рослинного організму. Результати, що отримані завдяки використанню нових методів аналізу не завжди дають однозначну і загально прийнятну відповідь на питання про безпечність генетично-модифікованих рослин в цілому, а лише підтверджують, що кожна окрема подія генетичної модифікації є унікальною і вимагає всебічного вивчення, на основі якого має бути зроблений висновок про прийнятність або неприйнятність практичного використання конкретної рослини з новою привнесеною ознакою.

*B.V. Sorochinsky, O.M. Burlaka,
V.D. Naumenko, A.S. Sekan*

UNINTENDED EFFECTS OF GENETIC MODIFICATIONS IN PLANTS AND METHODS OF THEIR ANALYSIS

The problem of unintended effects caused by genetic modification of plants is analysed. Factors that can provoke the unintended effects in genetically engineered plants, their consequences and possibility of the avoiding of unintended effects with use of current methods of genetic modification are discussed. Modern methodological approaches applied to analyse the unintended effects during the safety assessment of transgenic plants, in particular methods of molecular profiling with different «-omic»-technologies are described.

*B.V. Sorochinsky, O.M. Burlaka,
V.D. Naumenko, A.S. Sekan*

НЕПРЕДВИДЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ РАСТЕНИЙ И МЕТОДЫ ИХ АНАЛИЗА

Анализируется проблема непредвиденных эффектов, которые могут быть обусловлены генетическими модификациями растений. Обсуждаются факторы,

вызывающие возникновение непредвиденных эффектов в генетически модифицированных растениях, а также последствия, к которым они могут привести, и возможность их минимизации путем использования усовершенствованных методов генетической модификации. Описываются современные методологические подходы к анализу непредвиденных эффектов как этапа в оценке безопасности трансгенных растений, в частности, методы молекулярного профилирования с использованием разных «-омик»-технологий.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G. et al. Inheritance of functional foreign genes in plants // *Science*. – 1984. – **223**. – P. 496–498.
2. Smith C.J., Watson C.F., Morris P.C. et al. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes // *Plant Mol. Biol.* – 1990. – **14**. – P. 369–379.
3. Джеймс К. Основные положения обзора «Статус коммерческих биотехнологических/ГМ культур в мире: 2009 год». <http://www.isaaa.org/publications/briefs/41/highlights/pdf/Brief41-Highlights-Russian.pdf>.
4. James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007 (ISAAA Brief No. 37). International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, 2007.
5. Cerdeira A.L., Duke S.O. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops : A review // *J. Environ. Qual.* – 2006. – **35**. – P. 1633–1658.
6. Devos Y., Cougnon M., Vergucht S. et al. Environmental impact of herbicide regimes used with genetically modified herbicide-resistant maize // *Transgen. Res.* – 2008. – **17**. – P. 1059–1077.
7. Dill G.M., Cajacob C.A., Padgett S.R. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations // *Pest. Manag. Sci.* – 2008. – **64**. – P. 326–331.
8. Brookes G., Barfoot P. Global impact of biotech crops: socioeconomic and environmental effects in the first ten years of commercial use // *AgBioForum*. – 2006. – **9**. – P. 139–151.
9. Pray C.E., Huang J., Hu R., Rozelle S. Five years of Bt cotton in China – the benefits continue // *Plant J.* – 2002. – **31**. – P. 423–430.
10. Hammond B.G., Campbell K.W., Pilcher C.D. et al. Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000 – 2002 // *J. Agric. Food. Chem.* – 2004. – **52**. – P. 1390–1397.
11. Bakan B., Melcion D., Richard-Molard D., Cahagnier B. Fungal growth and Fusarium mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. – **50**. – P. 728–731.
12. Lemaux P.G. Genetically engineered plants and foods:

- A scientist's analysis of the issues (Part I) // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2008. – **59**. – P. 771–812.
13. *European Technology Platform «Plants for the Future». Stakeholder Proposal for a Strategic Research Agenda 2025 Including Draft Action Plan 2010. Part I. Summary.* 9th August 2005.
 14. *European Technology Platform «Plants for the Future». Detailed Strategic Research Agenda 2025 and Action Plan 2007 – 2012.* 25th June 2007.
 15. *Gebhard F., Smalla K.* Transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 by Transgenic Sugar Beet DNA // *Appl. Env. Microbiol.* – 1998. – **64**, № 4. – P. 1550–1554.
 16. *Nielsen K.M., Bones A.M., van Elsas J.D.* Induced natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – **63**, № 5. – P. 1945–1952.
 17. *Dröge M., Pöhler A., Selbitschka W.* Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern // *J. Biotechnol.* – 1998. – **64**. – P. 75–90.
 18. *Wackernagel W., de Vries J.* Transformation von Bakterien durch Antibiotikum-Resistenzgene aus transgenen Pflanzen und Nahrungsmitteln // *Ernährungsforschung.* – 2001. – **46**. – P. 1–22.
 19. *Schlüter K., Fütterer J., Potrykus I.* Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs – if at all – at an extremely low frequency // *Bio/Technology.* – 1995. – **13**. – P. 1094–1098.
 20. *Smalla K.* Horizontal gene transfer from transgenic plants into plant associated microorganisms and soil microorganisms // *Safety of transgenic crops. Environmental and Agricultural Considerations.* Proc. Basel Forum of Biosafety. – BATS, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology, Basel, 1995. – P. 29–34.
 21. *Smalla K., Gebhard R., van Isas J.D. et al.* Bacterial communities influenced by transgenic plants // *Proc. 3rd International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms.* CITY – 1994. – P. 157–167.
 22. *Batista R., Oliveira M.M.* Facts and fiction of genetically engineered food // *Trends Biotechnol.* – 2009. – **27**. – P. 277–286.
 23. *Koenig A. et al.* Assessment of the safety of food derived from genetically modified (GM) crops // *Food Chem. Toxicol.* – 2004. – **42**. – P. 1047–1088.
 24. *FAO/WHO.* Safety Aspects of Genetically Modified Foods of Plant Origin: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Food and Agriculture Organisation of the United Nations/World Health Organization: 2000. (http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_june2000_en.pdf).
 25. *Kuiper H.A., Kok E.J., Engel K-H.* Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2003. – **14**. – P. 238–243.
 26. *Haslberger A.G.* Codex guidelines for GM foods include the analysis of unintended effects // *Nat. Biotech.* – 2003. – **21**, N 7. – P. 739–741.
 27. *Safety of Genetically Engineered Foods: Approaches to Assessing Unintended Health Effects* // Committee on Identifying and Assessing Unintended Effects of Genetically Engineered Foods on Human Health, N.R.C. – Washington : Acad. Press, 2004. – P. 1–15.
 28. *Baudo M.M., Lyons R., Powers S.* Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding // *Plant Biotechnol. J.* – 2006. – **4**. – P. 369–380.
 29. *Kirschmann J.C., Suber R.L.* Recent food poisonings from cucurbitacin in traditionally bred squash // *Food Chem. Toxicol.* – 1989. – **27**, N 8. – P. 555–556.
 30. *Ames B.N., Gold L.S.* Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1990. – **87**. – P. 7772–7776.
 31. *Prakash C.S.* The genetically modified crop debate in the context of agricultural evolution // *Plant Physiol.* – 2001. – **126**. – P. 8–15.
 32. *Kärenlampi S.O., Lehesranta S.J.* Proteomic Profiling and Unintended Effects in Genetically Modified Crops // *ISB News Report* January, 2006. – 3 p.
 33. *Kok E.J.* The application of transcriptomics in the comparative safety assessment of (GMO-derived) plant products. Proefschrift ter verkrijging van de graad van doctor. – Wageningen Univ., 2008. – 200 p.
 34. *Cellini F., Chesson A., Colquhoun I. et al.* Unintended effects and their detection in genetically modified crops // *Food Chem. Toxicol.* – 2004. – **42**. – P. 1089–1125.
 35. *Shewmaker C.K., Sheehy J.A., Daley M. et al.* Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects // *Plant J.* – 1999. – **20**. – P. 401–412.
 36. *Day C.D., Lee E., Kobayashi J. et al.* Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced // *Genes Dev.* – 2000. – **14**. – P. 2869–2880.
 37. *Freese W., Schubert D.* Safety testing and regulation of genetically engineered foods // *Biotech. and Genet. Engineer. Rev.* – 2004. – **21**. – P. 299–324.
 38. *Latham J.R., Wilson A.K., Steinbrecher R.A.* The mutational consequences of plant transformation // *J. Biomed. Biotech.* – 2006. – P. 1–7. Article ID 25376.
 39. *Holdrege C.* Understanding the unintended effects of genetic manipulation. An introduction // *Unintended Effects of Genetic Manipulation – A Project of The Nature Institute.* – New York, 2008.

40. Matzke M.A., Mette M.F., Matzke A.J.M. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – **43**. – P. 401–415.
41. Trethewey R.N., Geigenberger P., Riedel K. et al. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis // *Plant J.* – 1998. – **15**. – P. 109–118.
42. Filipecki M., Malepszy S. Unintended consequences of plant transformation: A molecular insight // *J. Appl. Gen.* – 2006. – **47**. – P. 277–286.
43. Zou J., Katavic V., Giblin E.M. et al. Modification of seed oil content and the acyl composition in the *Brassicaceae* by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene // *Plant Cell.* – 1997. – **9**. – P. 909–923.
44. Gertz J.M., Vencill W.K., Hill N.S. Tolerance of transgenic soybean (*Glycine max*) to heat stress // *Proc. of the 1999. Brighton Conference Weeds (The BCPC Conference)*. November 1999. Brighton, UK. – **3**. – P. 835–840.
45. Chen D., Ye G., Yang C. et al. The effects of high temperature on the insecticidal properties of Bt cotton // *Environ. Experiment. Bot.* – 2005. – **53**. – P. 333–342.
46. Horvath H., Jensen L.G., Wong O.T. et al. Stability of transgene expression, field performance and recombination breeding of transformed barley lines // *Theor. Appl. Genet.* – 2001. – **102**. – P. 1–11.
47. Saxena D., Stotzky G. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn // *Amer. J. Bot.* – 2001. – **88**, № 9. – P. 1704–1706.
48. Al-Kaff N.S., Kreike M.M., Covey S.N. et al. Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of 35S promoter-regulated transgene // *Nat. Biotechnol.* – 2000. – **18**. – P. 995–999.
49. Momma K., Hashimoto W., Ozawa S. et al. Quality and safety evaluation of genetically engineered rice with soybean glycinin: analyses of the grain composition and digestibility of glycinin in transgenic rice // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1999. – **63**. – P. 314–318.
50. Roessner U., Luedemann A., Brust D. et al. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems // *Plant Cell.* – 2001. – **13**. – P. 11–29.
51. Birch A.N.E., Geoghegan I.E., Griffiths D.W., McNicol J.W. The effect of genetic transformations for pest resistance on foliar solanidine-based glycoalkaloids of potato (*Solanum tuberosum*) // *Ann. Appl. Biol.* – 2002. – **140**. – P. 143–149.
52. Kuiper H.A., Kleter G.A., Noteborn H.P.J. M., Kok E.J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods // *Plant J.* – 2001. – **27**, № 6. – P. 503–528.
53. Lisek J., Schauer N., Kopka J. et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants // *Nat. Protocols.* – 2006. – **1**. – P. 387–396.
54. Santos F.J., Galceran M.T. Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis // *J. Chromatogr. A.* – 2003. – **1000**. – P. 125–151.
55. Grata E., Boccard J., Guillaume D. et al. UPLC-TOF-MS for plant metabolomics: A sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana* // *J. Chromatog. B.* – 2008. – **871**. – P. 261–270.
56. Kind T., Fiehn O. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm // *BMC Bioinformatics.* – 2006. – **7**. – P. 234.
57. Iijima Y., Nakamura Y., Ogata K. et al. Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information // *Nat. Biotechnol.* – 2008. – **54**. – P. 949–962.
58. Shintu L., Le Gall G., Colquhoun I.J. Metabolomics and the detection of unintended effects in genetically modified crops // *Plant-derived Natural Products / Eds A.E. Osbourn V. Lanzotti.* – Springer Sci., Business Media, LLC, 2009. – P. 505–531.
59. Colquhoun I.J. Use of NMR for metabolic profiling in plant systems // *J. Pestic. Sci.* – 2007. – **32**. – P. 200–212.
60. Defernez M., Colquhoun I.J. NMR approaches to detect unintended effects of genetic modification in plants // *Genomics for biosafety in plant biotechnology / Eds J.P.H. Nap, A. Atanassov, W.J. Stiekema.* – NATO science series, IOS press, 2004. – P. 47–57.
61. Holmes E., Tang H., Wang Y., Seger C. The assessment of plant metabolite profiles by NMR-Based methodologies // *Planta Med.* – 2006. – **72**. – P. 771–785.
62. Krishnan P., Kruger N.J., Ratcliffe R.G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR // *J. Exp. Bot.* – 2005. – **56**. – P. 255–265.
63. Shepherd L.V.T., McNicol J.W., Razzo R. et al. Assessing the potential for unintended effects in genetically modified potatoes perturbed in metabolic and developmental processes. Targeted analysis of key nutrients and anti-nutrients // *Transgenic Res.* – 2006. – **15**. – P. 409–425.
64. Bradford K.J., Van Deynze A., Gutterson N. et al. Regulating transgenic crops sensibly: lessons from plant breeding, biotechnology and genomics // *Nat. Biotechnol.* – 2005. – **23**, № 4. – P. 439–444.
65. Ramessar K., Peremarti A., Gymez-Galera S. et al. Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics // *Transgenic Res.* – 2007. – **16**, № 3. – P. 261–280.
66. Millstone E., Brunner E., Mayer S. Beyond substantial equivalence // *Nature.* – 1999. – **401**, N 6753. – P. 525–526.
67. Kok E.J., Kuiper H.A. Comparative safety assessment for the biotech crops // *Trends Biotechnol.* – 2003. – **21**, № 10. – P. 439–444.
68. Hoekenga O.A. Using metabolomics to estimate unin-

- tended effects in transgenic crop plants: problems, promises, and opportunities // *J. Biomol. Tech.* – 2008. – **19**. – P. 159–166.
69. *Catchpole G.S., Beckmann M., Enot D.P. et al.* Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2005. – **102**. – P. 14458–14462.
70. *Enot D., Beckmann M., Draper J.* Detecting a difference – assessing generalisability when modelling metabolome fingerprint data in longer term studies of genetically modified plants // *Metabolomics.* – 2007. – **3**. – P. 335–347.
71. *Parr A.J., Mellon F.A., Colquhoun I.J., Davies H.V.* Dihydrocaffeoyl polyamines (kukoamine and allies) in potato (*Solanum tuberosum*) tubers detected during metabolite profiling // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – **53**. – P. 5461–5466.
72. *Baker J.M., Hawkins N.D., Ward J.L. et al.* A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat // *Plant Biotech. J.* – 2006. – **4**. – P. 381–392.
73. *García-López M.C., García-Cacas V., Marina M.L. et al.* Reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry profiling of transgenic and non-transgenic maize for cultivar characterization // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – **1216**, № 43. – P. 7222–7228.
74. *Metzdorff S.B., Kok E.J., Knuthsen P. et al.* Evaluation of a non-targeted «omic» approach in the safety assessment of genetically modified plants // *Plant Biol.* – 2006. – **8**. – P. 662–672.
75. *Noteborn H.P., Lommen A., van der Jagt R.C. et al.* Chemical fingerprinting for the evaluation of unintended secondary metabolic changes in transgenic food crops // *J. Biotechn.* – 2000. – **77**. – P. 103–114.
76. *Coll A., Nadal A., Collado R. et al.* Gene expression profiles of MON810 and comparable non-GM maize varieties cultured in the field are more similar than are those of conventional lines // *Transgenic Res.* – 2009. – **18**. – P. 801–808.
77. *Lehestranta S.J.* Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines // *Plant Physiol.* – 2005. – **138**. – P. 1690–1699.
78. *Zolla L., Rinalducci S., Antonioli P., Righetti P.G.* Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications // *J. Proteome Res.* – 2008. – **7**. – P. 1850–1861.
79. *Baudo M.M., Powers S.J., Mitchell R.A.C., Shewry P.R.* Establishing Substantial Equivalence: Transcriptomics // *Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats.* – Humana Press, 2009. – **478**. – P. 247–272.
80. *Thilmony R., Guttman M., Thomson J.G., Blechl A.E.* The LP2 leucine-rich repeat receptor kinase gene promoter directs organ-specific, light-responsive expression in transgenic rice // *Plant Biotechnol. J.* – 2009. – **7**, № 9. – P. 867–882.
81. *Thomson J.G., Chan R., Thilmony R. et al.* PhiC31 recombination system demonstrates heritable germinal transmission of site-specific excision from the Arabidopsis genome // *BMC Biotechnol.* – 2010. – **10**. – P. 17.

Надійшла 16.06.10