

**МІНІСТЭРСТВА
ПРЫРОДНЫХ РЭСУРСАЎ І АХОВЫ
НАВАКОЛЬНАГА АСЯРОДДЗЯ
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
МІНПРЫРОДЫ**

вул. Калектарная, 10, 220048, г. Мінск
тэл. (37517) 200-66-91; факс (37517) 200-55-83
E-mail: minproos@mail.belpak.by
р/р № 3604900000111 ААБ «Беларусбанк»
г. Мінск, код 795, УНП 100519825; АКПА 00012782

**МИНИСТЕРСТВО
ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ОХРАНЫ
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
МИНПРИРОДЫ**

ул. Коллекторная, 10, 220048, г. Минск
тел. (37517) 200-66-91; факс (37517) 200-55-83
E-mail: minproos@mail.belpak.by
р/с № 3604900000111 АСБ «Беларусбанк»
г. Минск, код 795, УНП 100519825; ОКПО 00012782

06.03.2018 г. № 10-236/237-10-АП-ч

На № _____ ад _____

РУП «Научно-практический
центр Национальной академии
наук Беларуси по
животноводству»

О направлении информации

Руководствуясь Положением о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения, утвержденным постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 8 сентября 2006 г. № 1160, Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь направляет заключение государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и рекомендации о допустимости использования трансгенной линии коз со встроенной генной конструкцией, отвечающей за выработку рекомбинантного лактоферрина человека в молочной железе в хозяйственных целях, отраженные в протоколе заседания Экспертного совета по безопасности генно-инженерных организмов Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь от 28.02.2019 г.

Приложение: на _____ л. в 1 экз.

Заместитель Министра



А.Н.Корбут

ПРОТОКОЛ

заседания Экспертного совета по безопасности генно-инженерных организмов Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь

28.02.2019

г. Минск

Председательствовал: Заместитель Министра природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь А.Н.Корбут

Присутствовали: список участников прилагается

Выступили: Корбут А.Н., Будевич А.И., Железнова Т.В., Алещенкова З.М., Гапеева Т.А., Дмитриева С.А., Красько А.Г., Мозгова Г.В., Макеева Е.Н., Минина Н.Г., Трепашко Л.И., Шукевич В.А.

С повесткой заседания Экспертного совета по безопасности генно-инженерных организмов Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь членов совета и приглашенных экспертов ознакомил заместитель Министра природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь Корбут А.Н.

Будевич А.И. проинформировал присутствующих о созданной трансгенной линии коз со встроенной генной конструкцией, отвечающей за выработку рекомбинантного лактоферрина человека в молочной железе.

В частности, доложено о том, что в республике продолжается работа по реализации (развитию) результатов, полученных в рамках программ Союзного государства «БелРосТрансген» и «БелРосТрансген-2», касающихся вопросов изучения биологической активности рекомбинантного лактоферрина человека, а также государственной регистрации стада коз-продуцентов как источника получения данного уникального белка.

В 2018 году Минприроды РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству» (далее- заявитель) было выдано разрешение на высвобождение непатогенных генно-инженерных организмов (трансгенной линии коз со встроенной генной конструкцией, отвечающей за выработку рекомбинантного лактоферрина человека в молочной железе) в окружающую среду (от 23.04.2018 № 4).

Заявителем в соответствии с «Инструкцией о порядке проведения испытаний непатогенных генно-инженерных организмов при их

высвобождении в окружающую среду», утвержденной постановлением Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды от 29.08.2006 года № 57, были организованы испытания непатогенных генно-инженерных организмов трансгенной линии коз со встроенной генной конструкцией, отвечающей за выработку рекомбинантного лактоферрина человека в молочной железе, секретируемый с молоком животных-продуцентов, содержащихся на территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, расположенного на территории Жодинского сельского совета в д. Будагово Смолевичского района Минской области.

Целью указанных испытаний являлась последующая регистрация стада трансгенных коз, как источника получения рекомбинантного лактоферрина человека с молоком животных-продуцентов для создания продуктов различного назначения для оздоровления людей. Итоги испытаний представлены в Минприроды письмом РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству» от 21.08.2018 № 420-10-01-07/841 и свидетельствуют об отсутствии рисков негативного воздействия стада животных-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека на здоровье человека и окружающую среду, а разработанные меры мониторинга за состоянием поголовья, наличие квалифицированного персонала, огражденной территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных и др. являются эффективными средствами контроля за использованием непатогенных генно-инженерных организмов (козы-продуцентки).

Также Будевич А.И. сообщил, что по состоянию на 1 января 2019 года общее стадо Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству» составляло 370 голов, в т.ч. трансгенных – 179 голов (из них 175 гол. – самки разных возрастов, 4 производителя), 191 голова – нетрансгенные козы разных возрастов (из них 181 гол. – самки разных возрастов, 10 производителей).

Встроенная конструкция по гену лактоферрина человека стабильно наследуется из поколения в поколение (47-48%). Среднее содержание рчЛФ в молоке – 2-3 г/л. Банк спермы составляет 12397 доз.

Национальной академией наук Беларуси принят Комплексный план научных работ по получению и применению рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов в 2018-2021 годах, предполагающий выполнение заданий по следующим основным направлениям:

совершенствование стада коз-продуцентов лактоферрина человека;

использование лактоферрина человека в животноводстве и ветеринарии;

переработка молока, выделение лактоферрина человека;

оценка и характеристика лактоферрина человека;

биологическая активность лактоферрина человека и его производных;

использование лактоферрина человека для разработки пищевых продуктов;

использование лактоферрина человека в направлении создания лекарственных средств (в фармакологии и медицине). Изучение целевой биологической активности.

В реализации задач Комплексного плана участвуют РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству», РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», Институт микробиологии НАН Беларуси, РУП «Институт мясо-молочной промышленности», Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Институт физиологии НАН Беларуси, РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию», Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси.

Подано ряд проектов по изучению действия рекомбинантного лактоферрина человека в рамках Государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» на 2016-2020 годы, Государственной программы научных исследований на 2016-2020, поданы проекты по исследованию рчЛФ на конкурс совместных белорусско-индийских научно-технических проектов, на конкурс Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, идет подготовка и других.

В Институте физиологии НАН Беларуси защищена диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по теме «Влияние рекомбинантного лактоферрина человека на уровень тестостерона и регуляцию его биосинтеза у крыс». Результаты работы рекомендуются после проведения доклинических и клинических испытаний белка для создания лекарств с рчЛФ в комплексном лечении болезней Паркинсона, Альцгеймера рассеянного склероза у людей.

В свою очередь Минина Н.Г., доцент кафедры генетики и разведения с.-х. животных УО «Гродненский государственный аграрный университет» (эксперт) доложила о результатах проведенной УО «Гродненский государственный аграрный университет» государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов (далее – государственная экспертиза) по заявлению РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству» непатогенных генно-инженерных организмов (трансгенной линии коз со встроенной генной конструкцией, отвечающей за выработку

рекомбинантного лактоферрина человека в молочной железе) на допустимость их использования в хозяйственных целях.

Государственная экспертиза проводилась в соответствии с требованиями Картахенского протокола по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии, Закона Республики Беларусь «О безопасности генно-инженерной деятельности», «Положения о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения», утвержденного постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 8 сентября 2006 г. № 1160, а также инструкции «Порядок проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 25 августа 2006., «Руководства по оценке рисков в отношении живых измененных организмов», разработанного международными экспертами по биобезопасности при Секретариате Конвенции о биологическом разнообразии и методическими рекомендациями «Оценка рисков воздействия ГМО на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия, с учетом рисков для здоровья человека», 2014 г.

Экспертами дано заключение о том, что риск использования в хозяйственных целях трансгенной линии коз со встроенной генной конструкцией, отвечающей за выработку рекомбинантного лактоферрина человека в молочной железе **крайне незначителен**, вследствие чего козы-продуценты рекомбинантного лактоферрина человека могут быть допущены для государственной регистрации и использования в хозяйственных целях.

В ходе обсуждения представленной информации выступили:

Красько А.Г., который обратил внимание на необходимость проведения оценки присутствия встроенной новой генетической последовательности в геном коз-продуцентов в конечном продукте.

Макеева Е.Н., обратила внимание на необходимость использования стада трансгенных коз в контролируемой среде, препятствующей обмену генетическим материалом с нетрансгенными особями, а также проведения необходимого мониторинга окружающей среды экспертами ботаниками и зоологами. В хозяйственных целях может использоваться только конечный продукт - лактоферрин.

Экспертами было отмечено отсутствие методики проведения токсикологической и аллергологической оценки рисков на здоровье человека для создаваемых пищевых продуктов нового вида.

Также на рассмотрение Экспертного совета Национальным координационным центром биобезопасности Республики Беларусь были представлены результаты общественных обсуждений оценки рисков

возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов (трансгенной линии коз со встроенной генной конструкцией, отвечающей за выработку рекомбинантного лактоферрина человека в молочной железе) на здоровье человека и окружающую среду, а также о мерах по предупреждению таких рисков.

В установленные законодательством сроки после опубликования уведомления о проведении общественных обсуждений замечаний и предложений не поступило.

Были высказаны комментарии Корбутом А.Н., Железновой Т.В., Гапеевой Т.А., и другими.

Руководствуясь Положением об экспертном совете по безопасности генно-инженерных организмов Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь, утвержденным постановлением Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь от 17 августа 2006 г. № 52, основываясь на заключении государственной экспертизы, рекомендациях членов экспертного совета о допустимости использования в хозяйственных целях непатогенных генно-инженерных организмов (трансгенной линии коз со встроенной генной конструкцией, отвечающей за выработку рекомбинантного лактоферрина человека в молочной железе) открытым голосованием большинством голосов (за – 12, против – 1, воздержалось – 6) приняты рекомендации о допустимости использования вышеуказанных непатогенных генно-инженерных организмов в хозяйственных целях с соблюдением рекомендаций членов Экспертного совета, высказанных в ходе обсуждения.

По итогам заседания Экспертного совета по безопасности генно-инженерных организмов Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь РЕШИЛИ:

принять рекомендации о допустимости использования трансгенной линии коз со встроенной генной конструкцией, отвечающей за выработку рекомбинантного лактоферрина человека в молочной железе в хозяйственных целях с соблюдением рекомендаций членов Экспертного совета и направить их и заключение государственной экспертизы в Минприроды.

Председатель

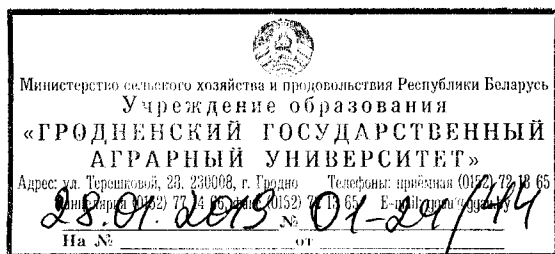


А.Н.Корбут

Секретарь



Т.В.Железнова



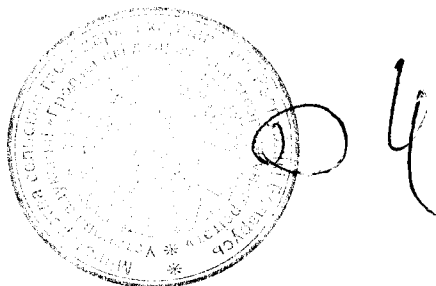
Министру природных ресурсов и
охраны окружающей среды
Республики Беларусь
Худыку А.П.

Уважаемый Андрей Павлович!

Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет» в соответствии с договором № _____ года направляет Заключение государственной экспертизы биобезопасности непатогенных генно-инженерных организмов (трансгенных коз по гену лактоферрина человека) по вопросу получения разрешения на хозяйственное использование непатогенных генно-инженерных организмов с целью регистрации стада коз-производителей как источника получения рекомбинантного лактоферрина человека.

Приложение: на 17 л. в 1 экз.

Ректор



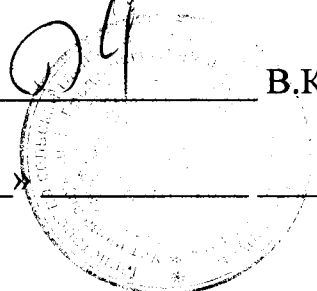
В.К. Пестис

Н.Г. Минина
80152743927

УТВЕРЖДАЮ:

Ректор УО «Гродненский
государственный аграрный
университет»



В.К. Пестис
« ____ » _____ год


**Заключение
государственной экспертизы
о допустимости хозяйственного использования
генно-инженерных организмов**

1. Общие положения

Эксперт – Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет».

Заказчик – Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Исполнитель – Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь.

Цель экспертизы – получение разрешения на хозяйственное использование непатогенных генно-инженерных организмов (трансгенных коз) с целью регистрации стада коз-продуцентов как источника получения рекомбинантного лактоферрина человека (рчЛФ).

На территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных проведены долгосрочные испытания животных-продуцентов на выживаемость, размножение и использование в потенциальной принимающей среде. Передача трансгена в поколениях исследовалась методом ПЦР к последовательностям целевого (встроенного в геном) гена.

Объект экспертизы – трансгенные козы со встроенным геном лактоферрина человека.

Основание для проведения экспертизы – договор № / от

г.

Экспертом на основании представленной Заказчиком информации о проведенных испытаниях непатогенных генно-инженерных организмов при их первом высвобождении в окружающую среду, а также об оценке риска допустимости хозяйственного использования генно-инженерных организмов (оформленных в соответствии с Приложением 2 к «Положению о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения»), руководствуясь Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 8.09.2006 №1160 «Об утверждении положений о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения, и выдачи разрешений на высвобождение непатогенных генно-инженерных организмов в окружающую среду для проведения испытаний» [1], методических рекомендаций [2, 3], руководства и данных Механизма посредничества по биобезопасности ВСН [5, 6], проведена экспертиза биобезопасности допустимости хозяйственного использования генно-инженерных организмов – трансгенных коз со встроенным геном, кодирующим рекомбинантный лактоферрин человека, секретируемый с молоком животных-продуцентов, – содержащихся на территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных (Жодинский сельский совет, д. Будагово Смолевичского района Минской области) с целью регистрации заявленного Заказчиком объекта экспертизы как источника получения рекомбинантного лактоферрина человека.

2. Методология проведения оценки риска допустимости хозяйственного использования трансгенных коз со встроенным геном лактоферрина человека

Оценка риска допустимости хозяйственного использования трансгенных коз со встроенным геном лактоферрина человека проводилась на основании данных Заказчика, полученных в результате проведенных испытаний непатогенных генно-инженерных организмов при их первом высвобождении в окружающую среду в соответствии с Приложением 2 к «Положению о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения» [1].

Этап 1. Выявление любых новых генотипических и фенотипических характеристик, связанных с генетически модифицированным организмом (ГМО), которые могут оказать неблагоприятное воздействие при хозяйствен-

ном использовании на биологическое разнообразие в вероятной потенциальной принимающей среде, с учетом также рисков для здоровья человека.

Этап 2. Оценка степени вероятности фактического возникновения таких неблагоприятных последствий с учетом интенсивности и характера воздействия ГМО на вероятную потенциальную принимающую среду.

Этап 3. Оценка последствий в том случае, если такое неблагоприятное воздействие действительно будет иметь место.

Этапы 2 и 3 проведены одновременно.

Этап 4. Оценка совокупного риска, вызываемого ГМО при хозяйственном использовании, на основе оценки вероятности возникновения и последствий выявленного неблагоприятного воздействия.

Этап 5. Вынесение рекомендаций относительно того, являются ли риски допустимости хозяйственного использования приемлемыми или регулируемы, включая, если это необходимо, определение стратегий для регулирования таких рисков.

Выдвигались гипотезы в отношении потенциальных рисков ГМО, научно-достоверные сценарии реализации рисков, а также определялись пути дифференциации риска и вредного воздействия. С целью установления, какие новые характеристики ГМО могут стать причиной неблагоприятного воздействия хозяйственного использования при взаимодействии с вероятной потенциальной принимающей средой (установление экологического риска) и какие новые характеристики могут представлять риск для здоровья человека, была проанализирована информация, представленная в Досье. Информация касается особенностей вектора, встраиваемых последовательностей, особенностей организма-реципиента (*Домашняя коза*), ГМО. Проведен сравнительный анализ генотипических и фенотипических характеристик ГМО и организма-реципиента (*Домашняя коза*), особенностей потенциальных принимающих сред и информации, касающейся предполагаемого вида использования ГМО.

При выявлении потенциальных экологических рисков хозяйственного использования особое внимание было уделено следующим особенностям ГМО, потенциальной принимающей среды и взаимодействия ГМО с потенциальной принимающей средой, которые могут привести к возникновению такого риска:

- особенности ГМО (по сравнению с реципиентными организмами), которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение и использование в потенциальной принимающей среде;

– известные и прогнозируемые условия потенциальной принимающей среды, которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение, использование ГМО;

– способность к переносу генетической информации: наличие в потенциальной принимающей среде диких или культурных родственных видов, способных к гибридизации с ГМО, вероятность переноса трансгенов от ГМО к таким организмам;

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия оценивалась качественно с использованием следующих терминов: **«высоко вероятно»**, **«вероятно»**, **«маловероятно»** и **«весьма маловероятно»**.

Оценка последствий неблагоприятного воздействия была выражена качественно с использованием следующих терминов: **«существенное»**, **«среднее»**, **«незначительное»** или **«маргинальное»**, **«полное отсутствие»**.

Была дана качественная оценка совокупного риска, вызываемого ГМО. Оценка совокупного риска дана с использованием следующих терминов **«высокий»**, **«средний»**, **«низкий»**, **«крайне незначительный»** или **«неопределенный»** (вследствие отсутствия ясности относительно уровня риска или недостаточности знаний).

Оценка рисков для здоровья человека проводилась по установленной в Республике Беларусь инструкции «Порядок проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека» [2].

3. Оценка рисков допустимости хозяйственного использования трансгенных коз со встроенным геном лактоферрина человека

3.1. Информация, имеющая существенное отношение к оценке риска.

3.1.1. Характеристика реципиентного организма.

Полное название: *Домашняя коза / Capra hircus*

семейство; *Полорогие / Bovidae*

род; *Горные козлы / Capra*

вид; *Домашняя коза / Capra hircus*

подвид; *Capra hircus hircus*

обычное название; *Коза*

другие названия - *нет*

Вид распространен на всех континентах, за исключением Антарктиды. Естественными хищниками коз являются представители семейства псовых

(*Canidae*), такие как Волк (*Canis lupus*), и одичавшие домашние собаки (*Canis lupus familiaris*). Естественных жертв не имеет.

К эндопаразитам Козы домашней относятся представители Простейших, различные гельминты. К эктопаразитам относятся некоторые виды класса Членистоногие.

К симбионтам коз относят бактериальные симбионты, которые составляют нормальную микрофлору. Они живут в кишечнике, на коже, на слизистых, обеспечивая либо защиту (конкурентным способом не давая другим бактериям заселить эти участки), либо участвуя в переваривании пищи и синтезе некоторых необходимых витаминов.

Биологических хозяев у представителей вида Коза домашняя не существует.

Для вида Коза домашняя (*Capra hircus*) половое созревание наступает в возрасте 5-9 месяцев. Наиболее благоприятный возраст для случки коз считается 9-15 месяцев. Беременность (сукозность) у коз длится в среднем 150 дней. Плодов 1-2, беременности тройней или четвернёй встречаются в 13,5% и 2% случаев соответственно. Козой домашней освоены биотопы от экваториальных до субарктических широт. Структуры (споры, склероции и т.п.), необходимые для выживания, отсутствуют.

3.1.2. Молекулярные характеристики генетически модифицированного организма, относящиеся к модификации.

Наличие чужеродного ДНК у трансгенных животных определяется с помощью ПЦР анализа с использованием следующих праймеров:

F: TTGTCAGCTATCTCCCCAAGCTCA,

R: GCCACAACGGCATGAGAAGGGACC.

Первый праймер находится в интроне перед 7 экзоном лактоферрина человека, второй праймер – в 7 экзоне. Результаты ПЦР оцениваются путем нанесения продуктов амплификации на 2% ТАЕ агарозный гель. В трансгенных животных присутствует ПЦР-продукт размером 237 п.н. В качестве положительного контроля используется геномная ДНК человека, в качестве отрицательного - геномная ДНК нетрансгенных коз.

3.1.3. Способность переноса вектора в другие организмы.

Способность приобретения мобильности встроенного вектора или переноса в другие организмы **отсутствует**, так как отсутствуют последовательности, обладающие генетической мобильностью. Кроме этого отсутствуют факторы, которые могут влиять на способность вектора адаптироваться в других организмах-хозяевах.

3.1.4. Характеристика генетически модифицированного организма

На 01.12.2017 года общее стадо Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных составляло 403 головы, в т.ч. трансгенных – 218 голов (из них 185 гол. – самки разных возрастов, 6 производителей, 27 гол. – молодняк 2017 года рождения), 185 голов – нетрансгенные козы разных возрастов (в т.ч. 10 производителей.).

На 01.07.2018 года общее стадо Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных составляло 440 голов, в т.ч. трансгенных – 229 голов (из них 175 гол. – самки разных возрастов, 6 производителей, 48 гол. – молодняк 2017-2018 годов рождения), 211 голов – нетрансгенные козы разных возрастов (из них 165 гол. – самки разных возрастов, 10 производителей, 36 гол. – молодняк 2018 года рождения.) *(информация о движении поголовья трансгенных животных прилагается).* Таким образом, численность, половая и возрастная структура популяции постоянно мониторится и контролируется.

Трансгенные козы отличаются от реципиентного организма только по одному целевому гену – hLf5, который находится под контролем бета-казеинового промотора – и по одному признаку – синтезируют в молочной железе трансгенных животных молоко с рекомбинантным лактоферрином человека. Встроенная конструкция по гену лактоферрина человека стабильно наследуется из поколения в поколение. В ходе проведенных испытаний отмечена тенденция к усилению доли наследования: 2017 г. – 54,2%, 2018 г. – 65,8 % *(документация прилагается).*

3.1.5. Проведение научно-исследовательских и практических работ по трансгенезу и изучение свойств рекомбинантного лактоферрина человека

В период времени с 01.10.2017 по 30.11.2017 г. было прооперировано 16 коз-доноров, пересажено 20 эмбрионов подготовленным реципиентам.

С 01.05.2018 г. по 20.05.2018 г. было прооперировано 20 коз-доноров, пересажено 23 эмбриона козам-реципиентам, 50 зародышей криоконсервировано на программном замораживателе Cryologic 8800 (исследования проводились в рамках выполнения задания 102 «Разработать систему биотехнологических приемов и методов генетического совершенствования стада коз-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека на основе использования искусственного воспроизводства, трансплантации эмбрионов и ДНК-тестирования животных» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии – 2020» ГП «Наукоемкие технологии и техника» на 2016-2020 годы).

В Институте физиологии Национальной академии наук Беларуси» 27.06.2018 г. была проведена защита кандидатской диссертации Рудниченко Юлией Анатольевной на тему «Влияние рекомбинантного лактоферрина человека на уровень тестостерона и регуляцию его биосинтеза у крыс» (Совет по защите диссертаций Д01.36.01). Показано, что системное введение *per os* рекомбинантного лактоферрина человека, полученного от коз-продуцентов, подопытным животным на протяжении 2,5 мес. в экспериментальной модели гипогонадизма приводит к существенной активации биосинтеза тестостерона у двухлетних особей, восстанавливая его концентрацию до физиологических значений молодых крыс.

Полученные результаты служат основанием для дальнейшего хозяйственного использования животных-продуцентов с целью проведения до- и клинических испытаний рекомбинантного лактоферрина человека для применения его в качестве биологически активной добавки и/или лекарственного средства при необходимости коррекции андрогенного дефицита различной этиологии, а также в условиях нейропатологии, связанной с нарушением стероидогенеза для восстановления и поддержания уровня эндогенного тестостерона длительный период.

Разработан и утвержден Председателем Президиума национальной академии наук Беларуси В.Г. Гусаковым «Комплексный план научных работ по получению и применению рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов в 2018-2021 годах» (*копия плана прилагается*).

Таким образом, дальнейшее хозяйственное использование генно-инженерных организмов научно обосновано и подтверждено разработанной биотехнологией размножения трансгенных животных, отработанными идентичными методическими подходами получения эмбриоматериала у коз-продуцентов rhLf и нетрансгенных особей, их способности к репродукции с использованием гормональных средств и их комплексов.

3.1.6. Изучение качества молока коз-продуцентов и его технологических свойств

Отбор проб молока проводился во время дневной дойки один раз в месяц от каждого животного-продуцента. Способ доения – мобильная доильная установка GEA Farm Technologies (Германия). Перед доением каждого животного аппарат промывалось горячей водой при температуре 85-95°C и подготавливалось в соответствии с гигиеническими требованиями машинного доения и зоотехнических норм. Полученное молоко фильтровалось, тщательно перемешивалось и проводился отбор образцов – в стерильную посуду 50-60 см³ на микробиологические исследования, 1,5 мл – для определения кон-

центрации лактоферрина, 200 мл – на проведение физико-химических исследований.

Исследования козьего молока с рекомбинантным лактоферрином человека проводились в ГУ «Жодинский городской центр гигиены и эпидемиологии» по показателям КОЕ и наличия патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл. Результаты исследований подтвердили результаты, полученные при первом высвобождении в 2017 г, и показали, что представленные на испытания образцы соответствуют требованиям безопасности действующих НПА, содержание общего количества микроорганизмов в молоке опытной и контрольной групп не достигало даже порогового значения, принятого для коровьего молока сорта «Экстра», и было меньше более чем в 17,5 раз (*копии протоколов прилагаются*).

Концентрация лактоферрина в молоке коз-продуцентов определялась ИФА-методом с применением набора реагентов, предоставленного ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» («МБЛ-Диагностикум-ЛФ»), г. Санкт-Петербург), согласно методике, предложенной производителем набора, заключающейся в последовательной сорбции ЛФ из образцов с известными концентрациями (6,25-400 нг/мл) и тестируемых проб разведенного молока в лунках планшета, поверхность которых предварительно покрыта аффинными антителами крыс против ЛФ; сорбции вторичных антител против антигенов кролика, конъюгированных с пероксидазой из корней хрена. Раствор антител кролика против ЛФ подкрашен синим красителем, раствор вторичных антител не содержал красителя. После каждого этапа избыток реагентов удалялся промывкой физиологическим раствором. В конце ИФА с помощью хромогенного субстрата выявлялась пероксидазная метка, после чего реакция останавливается серной кислотой. По калибровочной зависимости A_{492} от концентрации ЛФ производился расчет концентрации ЛФ в тестируемых образцах.

Концентрацию рекомбинантного лактоферрина человека также можно определить с помощью ИФА-набора «Human Lactoferrin Elisa Kit» (Bethyl Laboratories, Ins, www.bethyl.com) (*копии инструкций прилагаются*).

Проведенные испытания позволяют утверждать о стабильном синтезе рекомбинантного белка в молочной железе коз-продуцентов, что подтверждает допустимость дальнейшего хозяйственного использования генно-инженерных организмов с целью проведения исследований. Так, среднее значение изучаемого показателя в 4 квартале 2017 года составило 6,7 г/л, во 2 квартале 2018 года – 6,4 г/л (*акт прилагается*).

Комплекс исследований по изучению качества молока коз-продуцентов rhLf проводили в рамках выполнения задания 5.23 «Разработка методики от-

бора коз-продуцентов лактоферрина человека на основе изучения уровня экспрессии рекомбинантного белка во взаимосвязи с количественными и качественными показателями молока животных» ГПНИ «Качество и эффективность агропромышленного производства» на 2016-2020 годы, подпрограмма «Животноводство и племенное дело».

3.1.7. Работы по получению, заморозке и хранению спермы

С целью проведения биотехнологических работ за 9 месяцев 2018 года проведено взятие эякулята у трансгенных и нетрансгенных козлов-производителей. Всего заморожено 57 спермодоз, из них 32 – от трансгенных животных.

В настоящее время постоянно обновляющийся и используемый банк спермы производителей составляет 12 397 доз (12150 доз в 2017 г.), чем обеспечивается сохранение генофонда популяции (*акт наличия криобанка прилагается*).

3.1.8. Ветеринарно-санитарные мероприятия согласно Плана проведения противозoonотических мероприятий

В течение года постоянно проводятся плановые мероприятия в соответствии с ветеринарным законодательством Республики Беларусь по ветеринарному обслуживанию животных, а также в целях недопущения заноса различных заболеваний (*копия плана проведения противозoonотических мероприятий прилагается*).

В период 28.05-03.06.2018 г. проведено взятие образцов крови у всего поголовья мелкого рогатого скота, содержащегося на территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, для проведения исследований на наличие заболеваний (лептоспироз, бруцеллез, листериоз, хламидиоз, лейкоз). Положительно на лептоспироз прореагировало около 20 животных, что составляет менее 5% от всего стада. Эти животные будут повторно подвергаться исследованию на лептоспироз с последующим лечением или выбраковкой. По остальным заболеваниям все результаты отрицательны (*копия протокола испытаний прилагается*). Данные исследования подтверждают идентичность биохимических показателей крови трансгенных животных крови нетрансгенных сородичей. Морфологических изменений у коз-продуцентов rhLf в сравнении с обычными (родительскими особями) не выявлено.

В период 28.05-03.06.2018 г. проведена туберкулинизация всего поголовья мелкого рогатого скота. Прореагировавших животных не установлено.

В период с 11.06.2018 по 30.06.2018 гг. проведена дегельминтизация, профилактическая обработка против кокцидиоза, экто и эндо-паразитов у поголовья мелкого рогатого скота, содержащегося на территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, с применением «Ампролиума», «Альбендазена», «Экоmekтина» согласно инструкциям по применению препаратов. Дезинфекция производственных помещений была проведена в период с 01.08.2018 г. по 16.08.2018 г. аэрозольно «Микроцидом», выгульные дворики были обработаны методом полива «Эстодезом». Дезинсекция и дератизация производственных помещений проводилась согласно Плана противоэпизоотических мероприятий с использованием препаратов «Агита» – против насекомых и «Крысиная смерть» – против грызунов (*копии актов прилагаются*).

3.1.9. Условия принимающей среды

Хозяйственное использование планируется в помещениях Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, на которое оформлен Паспорт опытного поля. Общая площадь огороженного земельного участка, расположенного на территории Жодинского сельского совета в д. Будагово Смолевичского района Минской области, составляет 5,3571 га. На его территории находятся здания и сооружения, необходимые для полного, закрытого цикла содержания и обслуживания животных. Возделывание культур сельскохозяйственного назначения не производится.

Общая численность постоянно проживающего на территории Жодинского сельского совета населения составляет 3624 человек. На территории сельсовета расположено 25 садовых товариществ, сельскохозяйственное предприятие – ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» со специализацией – мясомолочное производство с развитым растениеводством.

3.2. Общее описание процедуры оценки рисков и вынесение рекомендаций.

3.2.1. Оценка экологического риска.

3.2.1.1. Гипотеза. Миграция и последующая интрогрессия трансгенов в дикие популяции в результате хозяйственного использования генно-инженерных организмов, принадлежащим к одному или разным видам животных (перенос генов).

Оценка вероятности миграции трансгенов. Козы – животные, размножающиеся только половым путем. В условиях Республики Беларусь от-

существуют дикие сородичи данного вида животных. Ареал их распространения находится в средней Азии, Азии и Африке, в странах Центральной и Северной Америки. Также, в основном, в этих климатических зонах ведется разведение домашних коз, и располагаются крупные козоводческие и овцеводческие хозяйства.

Вероятность миграции трансгенов в дикие популяции и появление нового потомства в условиях Республики Беларусь, кроме указанных выше регионов, в которых проживают и размножаются дикие сородичи, оценивается весьма маловероятно. Оценка последствия – маргинальное.

Вероятность передачи трансгенов домашним козам в результате хозяйственного использования генно-инженерных организмов. На территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных (д. Будагово) на протяжении последних 10 лет осуществляется разведение трансгенных животных путем скрещивания их с нетрансгенными особями **при полном отсутствии негативных последствий для животных и окружающей среды.** Биотехнологическое научно-экспериментальное производство по трансгенезу животных – охраняемая огороженная территория с обслуживающим персоналом – соответствует всем требованиям высокотехнологичного содержания животных.

Вероятность передачи трансгена – весьма маловероятно. Оценка последствия – маргинальное.

3.2.1.2. Гипотеза. Воздействие продукта трансгенов в результате хозяйственного использования генно-инженерных организмов на организмы, не являющиеся мишенью их заданного действия.

В опытах *in vivo* на крысах показано, что рекомбинантный человеческий лактоферрин обнаруживает противовоспалительные эффекты в отношении токсического действия бактериального агента – эндотоксина кишечной палочки (*Escherichia coli*).

В условиях *in vitro* на культуре клеток HeLa выявлена способность рекомбинантного человеческого лактоферрина проявлять протекторные эффекты в отношении токсического действия эндотоксина кишечной палочки.

На первичной культуре клеток атипичной тератоидной/рабдоидной опухоли человека продемонстрировано усиление гибели опухолевых клеток после сочетанной аппликации химиопрепаратов и рекомбинантного человеческого лактоферрина (1, 10, 100,0 мкг/мл).

Рекомбинантный лактоферрин человека является хелатором железа и путем его связывания предотвращает развитие цепных реакций перекисного

окисления, для протекания которых необходимы ионы двухвалентного железа.

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия – весьма маловероятно. Оценка последствия – маргинальное.

3.2.1.3. Гипотеза. Появление живых организмов в результате хозяйственного использования генно-инженерных организмов, резистентных или толерантных к продуктам трансгенов.

Отличительной чертой рекомбинантного лактоферрина человека является его способность связывать ионы двухвалентного железа, используемые бактериальной клеткой для своей жизнедеятельности (реакция перекисного окисления) (*копии обзорных статей прилагаются: «Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор)», Биофармацевтический журнал, 2010, Т.2, № 3, С. 3-19; «Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов и его физиологические эффекты», Доклады Национальной академии наук Беларуси, 2016, Т. 60, №1, С.72-81).*

Реализация такого механизма действия сводит к нулю вероятность появления толерантных и резистентных штаммов патогенов.

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия – весьма маловероятно. Оценка последствия – маргинальное.

На основании данных оценки вероятности отдельных возможных экологических рисков, суммарный экологический риск при хозяйственном использовании генно-инженерных организмов, несущих ген рекомбинантного лактоферрина человека оценен, **как крайне незначительный.**

3.2.2. Оценка риска здоровью человека.

Гипотеза. Рекомбинантный лактоферрин человека оказывает неблагоприятное воздействие на здоровье человека.

В рамках проведения государственной экспертизы биобезопасности непатогенных генно-инженерных организмов (трансгенных коз по гену лактоферрина человека) по вопросу получения разрешения на их высвобождение в окружающую среду были показаны результаты исследований ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси» (*копия письма от 16 ноября 2015 года № 301-01-01/642 прилагается*), что полученный из молока трансгенных коз и очищенный человеческий рекомбинантный лактоферрин, оказывает положительное воздействие на микрофлору кишечника, способствуют ее нормализации при антибиотик-ассоциированных дисбактериозах; активируют процессы метаболизма, выражающиеся в снижении

уровня глюкозы, холестерина и липопротеидов низкой плотности при увеличении содержания тестостерона; стимулируют углеводный, белковый и жировой обмен в органах пищеварительной системы, активируют клетки иммунной системы и секреторные процессы в желудочно-кишечном тракте; снижают выраженность дистрофических и некротических процессов язвообразования в тонкой кишке при экспериментальных колитах, препятствуют развитию воспалительных процессов в кишечной стенке. Лактоферрин способствует снижению количества клеток костного мозга с повреждениями хромосом после воздействия циклофосфана и уменьшению количества индуцированных уретаном аденом в легких у мышей.

Также были показаны результаты исследований Института биологии гена РАН (Учреждение Российской академии медицинских наук Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАН) субхронической токсичности рекомбинантного лактоферрина человека, острой, хронической и специфической токсичности, местно-раздражающего и алергизирующего действия (Государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования Нижегородская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации), специфической, острой и подострой токсичности (ООО «Центр медицинских биотехнологий», Российская Федерация) (*копии отчетов прилагаются*).

Вышеизложенные результаты подтверждают отсутствие потенциальной токсичности и алергенности рекомбинантного лактоферрина человека.

В результате хозяйственного использования генно-инженерных организмов Заявителем предполагается проведение в рамках государственных программ исследование потенциальной токсичности «белка интереса» по установленным в Республике Беларусь стандартам [2], исследование алергенности и др. с целью регистрации стада коз-производителей как источника получения рекомбинантного лактоферрина человека.

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия хозяйственного использования генно-модифицированных организмов – весьма маловероятно. Оценка последствия – крайне незначительное, общий риск – крайне незначительный.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате проведенной экспертизы биобезопасности допустимости хозяйственного использования генно-инженерных организмов – трансгенных коз со встроенным геном, кодирующим рекомбинантный лактоферрин человека, секретируемый с молоком животных-продуцентов, – содержащихся на территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных (Жодинский сельский совет, д. Будагово Смолевичского района Минской области), выводы которой основываются на результате анализа данных Досье, представленных Заявителем (РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству»), а также посещения Экспертом вышеуказанного Биопроизводства для ознакомления с технологическими вопросами содержания, кормления, разведения, доения трансгенных и нетрансгенных животных, работой обслуживающего персонала, сторожей, ветеринарных врачей, Эксперт считает, что **вероятность возникновения неблагоприятных последствий хозяйственного использования трансгенных животных (коз-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека) весьма маловероятна.**

2. Мероприятия по разведению, содержанию, доению и тестированию стада животных-продуцентов рекомбинантного лактоферрина, являющегося основной составной частью в технологической цепочке разработки и создания инновационной продукции с использованием указанного «белка интереса», показали высокий научный и производственный потенциал, а условия разведения объекта экспертизы и сам объект соответствуют требованиям безопасности к объектам, предназначенным для хозяйственного использования и регистрации.

3. Работа в части трансплантации эмбрионов коз, получения спермы от козлов с целью пополнения криобанка и последующего использования для искусственного осеменения коз, взятия образцов крови у всего поголовья для проведения исследований на наличие ряда заболеваний, отбора проб молока животных-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека и нетрансгенных коз для проведения микробиологических, физико-химических и биохимических исследований, передачи гена лактоферрина потомству, определения концентрации лактоферрина методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) подтверждают данные, полученные при первом высвобождении генно-инженерных организмов, что отражено в прилагаемых документах, и соответствуют действующему законодательству, касающемуся, в частности, биобезопасности трансгенных коз по гену лактоферрина человека при их хозяйственном использовании.

4. Результаты проведенной экспертизы биобезопасности допустимости хозяйственного использования генно-инженерных организмов свидетельствуют о **полном отсутствии рисков** неблагоприятного воздействия стада животных-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека на здоровье человека и состояние окружающей среды, а разработанные меры мониторинга за состоянием поголовья, наличие квалифицированного персонала, огражденной территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, постоянное освещение информации в СМИ, ежегодное предоставление в Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды учетного листа созданных непатогенных генно-инженерных организмов является эффективными средствами **направленного хозяйственного использования** непатогенных генно-инженерных организмов (козы-продуценты) для создания высокотехнологических производств в стране.

5. Представленные Заявителем непатогенные генно-инженерные организмы – трансгенные козы со встроенным геном, кодирующим рекомбинантный лактоферрин человека, секретируемый с молоком животных-продуцентов, содержащиеся на территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, соответствующего требованиям безопасности, **могут быть допущены для хозяйственного использования с целью регистрации стада коз-продуцентов как источника получения рекомбинантного лактоферрина человека в соответствии с действующим законодательством.**

ВЫВОДЫ

О ДОПУСТИМОСТИ ХОЗЯЙСТВЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕПАТОГЕННЫХ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ОРГАНИЗМОВ (ТРАНСГЕННЫХ КОЗ)

1. В результате проведенной экспертизы биобезопасности допустимости хозяйственного использования генно-инженерных организмов – трансгенных коз со встроенным геном, кодирующим рекомбинантный лактоферрин человека, установлено, что **риск при хозяйственном использовании непатогенных генно-инженерных организмов (трансгенных коз) в потенциальной принимающей среде, содержащихся на территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, крайне незначителен**, вследствие чего козы-продуценты рекомбинантного лактоферрина человека могут быть допущены для государственной регистрации, а также для целей проведения соответствующих испытаний и последующего использования целевого белка [7].

2. Биотехнологическое научно-экспериментальное производство по трансгенезу животных, где содержатся козы-продуценты рекомбинантного лактоферрина человека, соответствует требованиям безопасности к объектам, предназначенным для хозяйственного использования непатогенных генно-инженерных организмов (коз-продуцентов лактоферрина человека), и их регистрации [7].

Список литературы

1. Постановление Совета Министров Республики Беларусь «Об утверждении Положений о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения, и выдачи разрешений на высвобождение непатогенных генно-инженерных организмов в окружающую среду для проведения испытаний» от 8 сентября 2006 г. № 1160 // Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь. – 2006 – № 151. – Рег. № 5/22922.

2. Порядок проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека: Инструкция по применению / В.Г.Цыганков [и др.] // Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 25 августа 2006. – Регистрационный №076-0806. – Минск, 2006. – 15 с.

3. Мозгова Г.В. Оценка рисков воздействия ГМО на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия, с учетом рисков для здоровья человека: методические рекомендации. Мн: Право и экономика, 2014, 58с.

4. Consensus document on the biology of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (potato). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 8. – Режим доступа: <http://www.oecd.org/science/biotrack/46815598.pdf>

5. Руководство по оценке рисков в отношении живых измененных организмов» // Электронный ресурс. Режим доступа: <http://www.cbd.int/doc/meetings/bs/mop-06/official/mop-06-13-add1-ru.pdf>.

6. Механизм посредничества по биобезопасности. База данных: ЖИО, гены и организмы – Режим доступа: <https://bch.cbd.int/database/organisms/>.

7. Постановление Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь «О требованиях безопасности к опытным полям и другим объектам, предназначенным для проведения испытаний непатогенных генно-инженерных организмов при их первом высвобождении в окружающую среду» от 29 августа 2006 г. № 56 // Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь.-2006.-№ 151.-Рег.№ 8/14993.

Доцент кафедры генетики и разведения
с.-х. животных УО «Гродненский
государственный аграрный
университет»

Подпись Н.Г. Мининой удостоверяю
Начальник отдела кадров



Минина Н.Г.

Мельник Л.М.