

ПРИНЦИПЫ ОЦЕНКИ РИСКА ВОЗМОЖНЫХ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ЭФФЕКТОВ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ОРГАНИЗМОВ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА И ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Ермишин А.П.

Национальный координационный центр биобезопасности

Для понимания природы рисков, связанных с генно-инженерными организмами (ГИО) важно реально представлять, что они (ГИО) из себя представляют, как их получают и чем они отличаются от обычных «немодифицированных» организмов. В Картахенском протоколе по биобезопасности содержится следующее определение ГИО: "живой измененный организм" означает любой живой организм, обладающий новой комбинацией генетического материала, полученной благодаря использованию современной биотехнологии» (Картахенский протокол по биобезопасности, ст.3). Типичная «новая комбинация генетического материала, полученная с помощью современной биотехнологии», показана на рис.1.

Рис.1 Типичная трансгенная конструкция, используемая в генетической инженерии растений

L	Промотор	Селект.	Терм. посл.	Промотор	Трансген	Терм.посл.	R
B	селект.	ген	селект. гена	трансгена		Трансгена	B
*	гена						

*LB – левый край, RB – правый край: фрагменты ДНК, содержащие по 25 пар нуклеотидов от Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, необходимые для переноса трансгенных конструкций в растительные клетки с помощью метода агробактериальной трансформации.

Как видим, генно-инженерное растение отличается от исходного только тем, что к 25-30 тысячам существующих генов последнего добавлено 1-2 новых гена с соответствующими регуляторными и терминальными генетическими элементами. Важно подчеркнуть, что место встраивания трансгенной конструкции в геном растения является в общем случайным. Если встраивание произойдет в кодирующую область какого-либо гена растения (рис. 2), то это приведет к тому, что выработка продукта этого гена (определенного структурного белка или фермента) прекратится. Соответственно это не может не отразиться на всем организме: во многих случаях растение окажется нежизнеспособным. Если встраивание произойдет в область ДНК, связанную с регулированием активности какого-либо гена (область энхансера, сайленсера или промотора), то, естественно, это отразится на интенсивности работы соответствующего гена. Последствия для всего организма могут быть не столь печальные, как в первом случае, но при этом следует ожидать и возможных негативных эффектов в смысле изменения потребительских свойств растения. Так, например, растение, которое изначально вырабатывало какое-либо токсичное вещество в безопасных для здоровья концентрациях, может существенно усилить его выработку в результате изменения активности соответствующего гена, произошедшего из-за встраивания трансгена. Таким образом, первая группа рисков возможных неблагоприятных эффектов ГИО для здоровья человека и окружающей среды может быть обусловлена, прежде всего, самим фактом вставки чужеродной ДНК, что может быть чревато:

- изменением активности отдельных генов реципиентного организма;
- появлением возможности передачи трансгенов другим организмам;

Рис 2. Структура гена высших организмов

Энхансер	Сайленсер	Промотор	Кодирующая последовательность	Терминальная последовательность
----------	-----------	----------	-------------------------------	---------------------------------

Вторая группа рисков связана с синтезом новых для реципиентного организма белков-продуктов трансгенов, которые могут быть токсичными и/или аллергенными для других организмов.

К настоящему времени разработана эффективная система оценки безопасности ГИО для здоровья человека и окружающей среды. Она содержит целый ряд подходов и методов, применяемых начиная с этапа планирования предполагаемой генетической модификации и заканчивая получением сертификата соответствия при использовании ГИО в хозяйственной деятельности.

Целью оценки риска возможных неблагоприятных эффектов ГИО (экспертизы безопасности ГИО) является идентификация, оценка вероятности и величины возможных неблагоприятных последствий использования ГИО на здоровье человека и окружающую среду, определение способов их минимизации. Результаты экспертизы безопасности ГИО являются основой для принятия соответствующим компетентным органом решений относительно ввоза-вывоза ГИО, проведения испытаний ГИО, связанных с высвобождением в окружающую среду, использованием ГИО в хозяйственной деятельности.

Экспертиза безопасности ГИО осуществляется научно-обоснованным и транспарентным образом. При ее проведении может учитываться информация, опубликованная в научно-технической литературе и содержащаяся в специализированных базах данных, результаты испытаний и сведения по предшествующему использованию ГИО, заключения экспертов, методические рекомендации, разработанные национальными и международными организациями.

Оценка рисков должна осуществляться на индивидуальной основе. Информация, необходимая для принятия заключения о безопасности ГИО, может варьировать по характеру и уровню детализации в каждом конкретном случае в зависимости от соответствующего ГИО, характера его предполагаемого использования и потенциальной принимающей среды.

Риски, связанные с ГИО или содержащими их продуктами, должны рассматриваться в контексте рисков, существующих при использовании интактных реципиентных организмов в потенциальной принимающей среде.

В общем, методика оценки риска возможных неблагоприятных последствий использования ГИО включает следующие этапы:

- Выявление любых новых генотипических и фенотипических характеристик, связанных с присутствием трансгенов, которые могут оказать неблагоприятное воздействие ГИО на здоровье человека и окружающую среду;
- Оценка вероятности возникновения таких неблагоприятных последствий, исходя из интенсивности и характера воздействия ГИО на потенциальную принимающую среду;
- Оценка последствий в том случае, если такое неблагоприятное воздействие действительно будет иметь место;
- Оценка совокупного риска, вызываемого ГИО, на основе оценки вероятности возникновения и последствий выявленных неблагоприятных последствий;
- Вынесение рекомендации относительно того, являются ли риски приемлемыми или регулируемые, включая, если это необходимо, определение стратегий для регулирования таких рисков.

Рассмотрим, как применяется эта методика на примере оценки риска горизонтального переноса селективных генов устойчивости к антибиотикам из пищевых продуктов трансгенного происхождения к патогенным микроорганизмам пищеварительного тракта человека (табл.1).

Таблица 1. Пример оценки риска, связанного с горизонтальным переносом селективного гена устойчивости к антибиотикам.

Ген устойчивости к антибиотику	Вероятность горизонтального переноса селективного гена	Последствия горизонтального переноса селективного гена	Оценка последствий горизонтального переноса селективного гена
<i>npt II</i> (Канамицин, неомицин, гентемицин)	Очень низкая	Несущественны	Несущественны
<i>amp</i> (ампицилин)	Очень низкая	Малосущественны	Несущественны
Уст. к ванкомицину	Очень низкая	Существенны	???

Ген *npt II* устойчивости к антибиотикам канамицину, неомицину, гентемицину весьма широко используется в генетической инженерии растений. С 1956 года, когда начали использовать в фармакопее канамицин, к этому антибиотику и близким ему по структуре аминогликозидам у микроорганизмов развилась устойчивость. Эта устойчивость обусловлена не только наличием у них упомянутого гена *npt II* (его выделили из транспозона Tn5 кишечной палочки человека *E.coli*), но и благодаря другим генам устойчивости, которые широко представлены у разных микроорганизмов (известно порядка 18 естественных способов дезактивации этого антибиотика). В связи с этим канамицин и аналоги в настоящее время не используется в медицинской практике для лечения людей. Антибиотик ампицилин пока еще используется, но устойчивость к нему также достаточно широко встречается среди микроорганизмов. Поэтому ген *amp* в качестве селективного гена используется в генетической инженерии растений в основном в фундаментальных исследованиях. Имеется всего несколько коммерческих трансгенных сортов растений с эти геном. Антибиотик ванкомицин является единственным антибиотиком, который еще способен подавлять стафилококковую инфекцию. Гены устойчивости к нему до настоящего времени не обнаружены и в генетической инженерии растений не используются.

При проведении оценки риска горизонтального переноса селективных генов обращают, прежде всего, внимание на вероятность этого события. Для того, чтобы рассматриваемое событие (горизонтальный перенос трансгенов) произошло, должно совпасть ряд очень редких событий. Фрагмент ДНК, содержащий трансгенную конструкцию, должен какое-то время находиться в пищеварительном тракте неповрежденным в ходе переваривания пищи. Эта ДНК должна поступить в бактериальные клетки и какое-то время в них не разрушаться под действием ферментов ДНКаз. Должна быть гомология этой ДНК или областей ДНК, прилегающих к месту встраивания трансгенов, с ДНК бактерий (хромосомы или плазмиды), чтобы могло произойти встраивание. И, наконец, для того, чтобы встроенные в бактериальную ДНК трансгены проявляли активность, они должны потерять имеющиеся у них эукариотические промоторы и встроиться в ДНК бактерии в строго определенном месте, а именно под подходящим прокариотическим промотором. Вероятность этого события в целом оценивают как очень низкую, приблизительно 10^{-17} .

Учитывая значимость рассматриваемых антибиотиков, можно ориентировочно оценить последствия горизонтального переноса соответствующих селективных генов.

Если в первых двух случаях их можно признать несущественными, или, с большой натяжкой для ампицилина, малосущественными, то в случае с ванкомицином последствия будут весьма негативными. Принимая во внимание вероятность переноса и последствия, можно сделать окончательное заключение о степени риска. Для первых двух антибиотиков он практически отсутствует. Но для ванкомицина, несмотря на крайне низкую вероятность события, этим риском пренебрегать, по-видимому, не следует.

При экспертизе безопасности ГИО для здоровья человека и окружающей среды рассматривается разносторонняя информация, которую должны представить разработчики. Так, при определении риска возможных неблагоприятных эффектов, связанных с высвобождением ГИО, например, покрытосеменных растений, в окружающую среду, принимают, прежде всего, во внимание информацию, касающуюся биологических особенностей реципиентного и донорного организмов:

- систематическое положение, способ размножения и рассеивания, выживаемость в окружающей среде;
- географическое распространение, описание мест естественного произрастания;
- потенциально значимое взаимодействие с организмами, отличными от растений (токсичность) и др.

Особое внимание уделяется информации, относящейся к характеру генно-инженерной модификации:

- описанию встроенного в геном (плазмон) реципиентного организма фрагмента ДНК (размер и источник, предполагаемая функция каждого составного элемента или района встроенной ДНК, включая регуляторные и другие элементы, влияющие на функционирование трансгенов);
- данным о структуре и функциональном соответствии встроенного фрагмента ДНК, присутствию в нем известных потенциально опасных последовательностей, локализации вставки и стабильности инкорпорации, количестве копий трансгенов.

Всестороннему рассмотрению подвергается информация, относящаяся к биологическим особенностям ГИО и характеру взаимодействия ГИО с окружающей средой:


- данным о новых признаках и характеристиках, которые стали проявляться или перестали проявляться у ГИО по сравнению с реципиентным организмом, в особенности тех, что могут оказывать влияние на выживаемость, размножение и распространение в потенциальной принимающей среде;
- сведениям о генетической стабильности ГИО, степени и уровне экспрессии трансгена(ов);
- активности и свойствах протеина(ов), кодируемых трансгеном(нами);
- способности к переносу генетической информации (наличие в потенциальной принимающей среде диких или культурных родственных видов, способных к гибридизации с ГИО, вероятность переноса трансгенов от ГИО к таким организмам);
- вероятности конкурентного преимущества ГИО по сравнению с интактным реципиентным организмом, резкого увеличения численности популяции ГИО в потенциальной принимающей среде;
- сведениям об организмах-мишенях и организмах-немишенях, предполагаемом механизме и результате взаимодействия ГИО с ними и др.

Окончательное заключение о безопасности ГИО для окружающей среды делается с учетом перечисленной выше информации и характеристики потенциальной принимающей среды:

- географического положения участка, где будет осуществляться высвобождение, близости его к заповедникам, заказникам и другим природоохраняемым объектам и территориям;

- его размера и обработанности, климатической, геологической и почвоведческой характеристики, флоры и фауны.

Как видим, для того, чтобы всю эту информацию получить и затем адекватно оценить необходимо участие специалистов в области генетики, физиологии, ботаники, экологии, зоологии (в отдельных случаях), токсикологии, аллергологии и др. Таким образом, **экспертиза безопасности ГИО – процесс многосторонний и комплексный.** Требуется определенная квалификация и опыт экспертов для того, чтобы проводить экспертизу на должном уровне. В связи с этим возрастает роль международного сотрудничества, использование всего накопленного опыта, который может быть доступен благодаря созданию специальных баз данных.


 United Nations Environment Programm
 The Global Environment Facility
 Национальный координационный центр биобезопасности
 Совместный проект Правительства Республики Беларусь и Программы ООН по окружающей среде (UNEP) «Разработка национальной системы биобезопасности для Республики Беларусь»

Принципы оценки риска возможных неблагоприятных эффектов генно-инженерных организмов на здоровье человека и окружающую среду

А.П. Ермишин
 Национальный координационный центр биобезопасности

"живой измененный организм" означает любой живой организм, обладающий новой комбинацией генетического материала, полученной благодаря использованию современной биотехнологии (Картахенский протокол по биобезопасности, ст.3)

LB	Промотор селек. гена	Селект. ген	Терм. Посл. селективного гена	Промотор трансгена	Трансген	Терм. посл. трансгена	RB
----	----------------------	-------------	-------------------------------	--------------------	----------	-----------------------	----

Вероятные неблагоприятные эффекты ГИО для здоровья человека и окружающей среды могут быть вызваны:

- самим фактом вставки чужеродной ДНК, что может быть чревато:
 - изменением активности отдельных генов реципиентного организма;
 - появлением возможности передачи трансгенов другим организмам;
- синтезом новых для реципиентного организма белков-продуктов трансгенов, которые могут быть токсичными и/или аллергенными для других организмов.

Структура гена высших организмов

ЭНХАНСЕР	САЙЛЕНСЕР	ПРОМОТОР	КОДИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ТЕРМИНАТОР
----------	-----------	----------	-------------------------------	------------

Оценка риска проводится с целью идентификации, оценки вероятности и величины возможных неблагоприятных последствий использования ГИО на здоровье человека и окружающую среду, определения способов их минимизации. Результаты экспертизы безопасности ГИО являются основой для принятия соответствующим компетентным органом решений относительно ввоза-вывоза ГИО, проведения испытаний ГИО, связанных с высвобождением в окружающую среду, использованием ГИО в хозяйственной деятельности.

Экспертиза безопасности ГИО осуществляется научно-обоснованным и транспарентным образом.

Оценка рисков должна осуществляться на индивидуальной основе. Информация, необходимая для принятия заключения о безопасности ГИО, может варьировать по характеру и уровню детализации в каждом конкретном случае в зависимости от соответствующего ГИО, характера его предполагаемого использования и потенциальной принимающей среды.

Риски, связанные с ГИО или содержащими их продуктами, должны рассматриваться в контексте рисков, существующих при использовании интактных реципиентных организмов в потенциальной принимающей среде.

Методика оценки риска возможных неблагоприятных последствий использования ГИО включает следующие этапы:

1. Выявление любых новых генотипических и фенотипических характеристик, связанных с присутствием трансгенов, которые могут оказать неблагоприятное воздействие ГИО на здоровье человека и окружающую среду;
2. Оценка вероятности возникновения таких неблагоприятных последствий, исходя из интенсивности и характера воздействия ГИО на потенциальную принимающую среду;
3. Оценка последствий в том случае, если такое неблагоприятное воздействие действительно будет иметь место;
4. Оценка совокупного риска, вызываемого ГИО, на основе оценки вероятности возникновения и последствий выявленных неблагоприятных последствий;
5. Вынесение рекомендации относительно того, являются ли риски приемлемыми или регулируемые, включая, если это необходимо, определение стратегий для регулирования таких рисков;

Пример оценки риска, связанного с горизонтальным переносом селективного гена устойчивости к антибиотикам.

Ген устойчивости к антибиотику	Вероятность горизонтального переноса селективного гена	Последствия горизонтального переноса селективного гена	Оценка последствий горизонтального переноса селективного гена
<i>prf II</i> (Канамидин, неомидин, гентемидин)	Очень низкая	Несущественны	Несущественны
<i>amp</i> (ампициллин)	Очень низкая	Малосущественны	Несущественны
Уст. к ванкомицину	Очень низкая	Существенны	???

А. Информация о биологических особенностях реципиентного

1. Полное название:
 - семейство;
 - род;
 - вид;
 - подвид;
 - сорт/селекционная линия;
 - обычное название.
2. Информация, касающаяся особенностей размножения:
 - способ(ы) размножения;
 - специфические факторы, влияющие на размножение;
 - время генерации;
 - половая совместимость с другими культивируемыми или дикими видами.
3. Выживаемость в окружающей среде:
 - способность образовывать структуры для выживания или переходить в состояние покоя;
 - специфические факторы, влияющие на выживаемость.
4. Рассеивание:
 - пути и степень рассеивания;
 - специфические факторы, влияющие на рассеивание.
5. Географическое распространение.
6. Описание мест естественного произрастания, включая информацию о естественных хищниках, паразитах, конкурентах и симбионтах.
7. Потенциально значимое взаимодействие с организмами, отличными от растений в экосистемах, характерных для обычного произрастания, включая информацию о токсичности для людей, животных или других организмов.

Б. Информация, относящаяся к характеру генно-инженерной модификации

1. Методы, использованные при создании, переносе трансгенной конструкции и отборе трансгенных организмов;
2. Описание встроеного в геном (плазмону) реципиентного организма фрагмента ДНК (размер и источник, т.е. название донорного организма(ов)) и предполагаемая функция каждого составного элемента или района встроеной ДНК, включая регуляторные и другие элементы, влияющие на функционирование трансгена;
3. Структура (сиквенс) и функциональное соответствие встроеного фрагмента ДНК, присутствие в нем известных потенциально опасных последовательностей;
4. Наличие во встроеной ДНК каких-либо неизвестных последовательностей и информация о том, в какой степени вставка ограничена ДНК, необходимой для осуществления предполагаемой функции;
5. Характеристика сайта модификации реципиентного генома (плазмона), локализация вставки (инкорпорирована в хромосому, хлоропласты, митохондрии или находится в неинтегрированном состоянии);
6. Стабильность инкорпорации привнесенной ДНК в геном (плазмону) реципиентного организма;
7. Количество копий трансгенов;
8. Описание методики обнаружения и идентификации встроеного фрагмента ДНК, чувствительность, надежность и специфичность этой методики;

В. Информация, относящаяся к биологическим особенностям ГИО.

1. Описание генетических признаков или фенотипических характеристик, в особенности новых признаков и характеристик, которые стали проявляться или перестали проявляться у ГИО по сравнению с реципиентным организмом;
2. Генетическая стабильность ГИО;
3. Степень и уровень экспрессии трансгена(ов). Метод оценки экспрессии трансгена, его чувствительность;
4. Активность и свойства протеина(ов), кодируемых трансгеном(ами);
5. Части растения, в которых трансгены экспрессируются (например, корни, листья, пыльца и т.д.);
6. История прежних генно-инженерных модификаций ГИО
7. Характеристика ГИО в связи с безопасностью для здоровья человека: токсические или аллергенные эффекты ГИО и/или продуктов, полученных из ГИО;

Характеристики белков-продуктов некоторых трансгенов

Белок	pH денатурации	Температура денатурации	Концентрация в тканях	Время переваривания в	
				желудочном соке	дуоденальном соке
NPT II			Картофель(лубин)-2,7 мг/г Хлопок (семена)-7 мг/г	½ < 10 сек полностью- 20 мин	¼ -2-5 мин
EPSPS	5	65°C в теч. 15 мин.	Хлопок (семена)-60-70 мг/г	½ < 15 сек	¼ < 10 мин
PAT	4	75°C		1 мин при pH 4 – 10 мин	
CP PVY			≈2 мг/г (в 12-244 раз ниже естественного уровня)		
CRY I A(B)			Кукуруза во время цветения 8-16 г/га в конце вегетации >0,8 г/га	Разведение: 1:1000 – 10мин.; 1:100 – 5 мин.; 90% в теч. 2 мин.	Не переваривается
CRY IIIA			Картофель Листья –20-63мг/г, Клубни –0,2-0,6 мг/г		

Г. Информация о потенциальной принимающей среде

1. Географическое положение участка, где будет осуществляться высвобождение;
2. Близость к заповедникам, заказникам и другим природоохраняемым объектам и территориям;
3. Описание участка: размер и обрабатываемость, климатическая, геологическая и почвоведческая характеристика, флора и фауна;
4. Сравнение мест естественного обитания реципиентных организмов с предполагаемым местом высвобождения ГИО;
5. Методы вмешательства в природу участка (методы культивации, ирригации и т.п.);

Д. Информация о взаимодействии ГИО с окружающей средой:

1. Биологические особенности ГИО (по сравнению с интактными реципиентными организмами), которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение и распространение в потенциальной принимающей среде;
2. Известные и прогнозируемые условия потенциальной принимающей среды, которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение, расселение ГИО;
3. Способность к переносу генетической информации: наличие в потенциальной принимающей среде диких или культурных родственных видов, способных к гибридизации с ГИО, вероятность переноса трансгенов от ГИО к таким организмам;
4. Конкурентное преимущество ГИО (по сравнению с интактным реципиентным организмом);
5. Вероятность проявления у ГИО в потенциальной принимающей среде нежелательных свойств, признаков;
6. Вероятность резкого увеличения численности популяции ГИО в потенциальной принимающей среде;
7. Идентификация и описание организмов-мишеней;
8. Предполагаемый механизм и результат взаимодействия ГИО с организмами-мишенями;
9. Идентификация и описание организмов-немишеней, которые могут быть подвержены влиянию ГИО;
10. Другие потенциально возможные взаимодействия ГИО с окружающей средой.

Принципы оценки риска возможных неблагоприятных эффектов генно-инженерных организмов на здоровье человека и окружающую среду

1. Экспертиза безопасности генно-инженерных организмов осуществляется научно-обоснованным и транспарентным образом.
2. Оценка рисков должна осуществляться на индивидуальной основе.
3. Риски, связанные с генно-инженерными организмами или содержащими их продуктами, должны рассматриваться в контексте рисков, существующих при использовании интактных реципиентных организмов в потенциальной принимающей среде.
4. Экспертиза безопасности генно-инженерных организмов должна носить комплексный характер