

Краткий курс лекции по дисциплине **рисковый менеджмент трансгенов**

Лекция 1. Введение. Определения генетически модифицированных организмов и генно-инженерного организма (ГЕО). Цель их создания.

С развитием генной инженерии появились не только ее активные сторонники, но и противники, действия которых направлены на возбуждение общественного мнения против внедрения генных технологий. В этой связи в 1996 г. Федерация европейских микробиологических обществ (ФЕМО) опубликовала меморандум, цель которого — проинформировать общественность о пользе и потенциальной опасности широкомасштабного применения генной инженерии в биотехнологии.

Меморандум предназначен для ученых и широкой общественности.

Во-первых, с момента временного моратория на генную инженерию (1975—1985 гг.) общественное мнение с подозрением, а иногда с враждебностью относится к генным технологиям. Обвинения, звучащие в адрес микробиологов, занимающихся генной инженерией, весьма разнообразны: “генные инженеры будут клонировать тысячи Гитлеров или Эйнштейнов”, “генетическая бомба убьет все живое или превратит всех в уродов” и т.п.

Вторая причина озабоченности общественности состоит в том, что в последнее десятилетие интенсивно создаются такие трансгенные организмы, польза от которых должна проявиться только после их внесения в окружающую среду. А современные правила безопасности применения генных технологий, принятые в большинстве стран, напротив, направлены на то, чтобы жизнеспособные трансгенные организмы в окружающую среду не попали. Необходима разработка разумных, адекватных и гибких правил безопасности генных технологий, спокойная и доброжелательная общественная атмосфера, особенно на рынке поставки хлеба, сыра и пиво, приготовленные с помощью трансгенных микробов, продаже трансгенные помидоры и кукуруза и когда уже ведутся полевые испытания трансгенных почвенных микробов.

Генетические технологии привели к разработке мощных методов анализа генов и геномов, а это, в свою очередь, — к синтезу, т.е. к конструированию новых, генетически модифицированных микроорганизмов.

К 1996 г. установлены нуклеотидные последовательности 11 разных микроорганизмов, начиная от самой маленькой автономно размножающейся микоплазмы (всего 580 тысяч нуклеотидных пар).

Знание нуклеотидных последовательностей геномов промышленных штаммов позволит “программировать” их на получение большого дохода.

Клонирование эукариотных, т.е. ядерных, генов в микробах и есть тот принципиальный метод, который привел к бурному развитию микробиологии. Фрагменты геномов животных и растений для их анализа клонируют именно в микроорганизмах. Для этого в качестве молекулярных векторов — переносчиков генов используют искусственно созданные плазмиды, а также множество других молекулярных приспособлений, созданных для того, чтобы выделять и клонировать эукариотные гены.

Главное при разработке правил и законов, регулирующих применение генных технологий, — это создать рациональные концепции оценки риска.

Первый шаг в этом направлении — установить, какие именно опасности могут возникнуть и как их избежать. Следующий шаг — оценить степень риска. Уменьшить риск можно,

если определить категории опасности патогенов и использовать для работы с ними соответствующее защитное оборудование. По мере накопления конкретных знаний о конкретных опасностях оценки следует уточнять.

Лекция 2 Цели создания генетически модифицированных организмов.

Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (FAO) рассматривает использование методов генетической инженерии для создания трансгенных сортов растений либо других организмов как неотъемлемую часть сельскохозяйственной биотехнологии.

Прямой перенос генов, отвечающих за полезные признаки, является естественным развитием работ по селекции животных и растений, расширивших возможности селекционеров в части управляемости процесса создания новых сортов и расширения его возможностей, в частности, передачи полезных признаков между нескрещиваемыми видами.

Использование как отдельных генов различных видов, так и их комбинаций в создании новых трансгенных сортов и линий является частью стратегии FAO по характеристике, сохранению и использованию генетических ресурсов в сельском хозяйстве и пищевой промышленности.

Исследование 2012 года (основанное в том числе на отчётах компаний-производителей семян) использования трансгенных сои, кукурузы, хлопка и канолы в показало, что устойчивые к гербицидам культуры оказываются более дешёвыми в выращивании и в ряде случаев более урожайными.

Культуры содержащие инсектицид давали больший урожай, особенно в развивающихся странах, где использовавшиеся до этого пестициды были малоэффективными. Также устойчивые к насекомым культуры оказывались более дешёвыми в выращивании в развитых странах. По данным метаанализа, проведённого в 2014 году, урожайность ГМО-сельхозкультур за счёт снижения потерь от вредителей на 21,6 % выше, чем у немодифицированных, при этом расход пестицидов ниже на 36,9 %, затраты на пестициды снижаются на 39,2 %, а доходы сельхозпроизводителей повышаются на 68,2 %.

Процесс синтеза генов в настоящее время разработан очень хорошо и даже в значительной степени автоматизирован. Существуют специальные аппараты, снабжённые ЭВМ, в памяти которых закладывают программы синтеза различных нуклеотидных последовательностей. Такой аппарат синтезирует отрезки ДНК длиной до 100—120 азотистых оснований (олигонуклеотиды).

Чтобы встроить ген в вектор, используют ферменты — рестриктазы и лигазы. С их помощью ген можно «склеивать», соединять в иной комбинации, конструируя новый ген или заключая его в вектор.

Техника введения генов в бактерии была разработана после того, как Фредерик Гриффит открыл явление бактериальной трансформации. В основе этого явления лежит примитивный половой процесс, который у бактерий сопровождается обменом небольшими фрагментами нехромосомной ДНК, плазмидами. Плазмидные технологии легли в основу введения искусственных генов в бактериальные клетки. Популярными методами введения вектора в клетку растений является использование почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* или генной пушки^[31]. Для генетической инженерии животных используют [трансфекцию](#), вектора, на основе ретровирусов и другие методы.

Если модификации подвергаются одноклеточные организмы или культуры клеток многоклеточных, то на этом этапе начинается [клонирование](#), то есть отбор тех организмов и их потомков (клонов), которые подверглись модификации. Когда же поставлена задача получить многоклеточные организмы, то клетки с изменённым [генотипом](#) используют для вегетативного размножения растений или вводят в [бластоцисты](#) суррогатной матери, когда речь

идёт о животных. В результате рождаются детёныши с изменённым или неизменным генотипом, среди которых отбирают и скрещивают между собой только те, которые проявляют ожидаемые изменения.

Цели создания генетически модифицированных организмов Методы создания ГМО

Основные этапы создания ГМО:

1. Получение изолированного гена.
2. Введение гена в вектор для переноса в организм.
3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
4. Преобразование клеток организма.
5. Отбор генетически модифицированных организмов и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

Методы осуществления каждого из этих этапов составляют в совокупности методы генетической инженерии.

Техника введения генов в бактерии была разработана открытием явления бактериальной трансформации.

В основе этого явления лежит примитивный половой процесс, который у бактерий сопровождается обменом небольшими фрагментами нехромосомной ДНК, плазмидами. Плазмидные технологии легли в основу введения искусственных генов в бактериальные клетки.

Значительные трудности были связаны с введением готового гена в наследственный аппарат клеток растений и животных. Однако в природе наблюдаются случаи, когда чужеродная ДНК (вируса или бактериофага) включается в генетический аппарат клетки и с помощью её обменных механизмов начинает синтезировать «свой» белок. Учёные исследовали особенности внедрения чужеродной ДНК и использовали как принцип введения генетического материала в клетку. Такой процесс получил название трансфекция

Лекция 3. Применение ГМО и методов генной инженерии в исследованиях

В н.в. время генетически модифицированные организмы широко используются в фундаментальных и прикладных научных исследованиях. С помощью генно-модифицированных организмов исследуются закономерности развития некоторых заболеваний (болезнь Альцгеймера, рак), процессы старения и регенерации, изучается функционирование нервной системы, решаются ряд других актуальных проблем биологии и современной медицины.

В медицине и фармацевтической промышленности]

Генетически модифицированные организмы используются в прикладной медицине с 1982 года. В этом году зарегистрирован в качестве лекарства генно-инженерный человеческий инсулин, получаемый с помощью генетически модифицированных бактерий.

В настоящее время фармацевтическая промышленность выпускает большое количество лекарственных средств на основе рекомбинантных белков человека: такие белки производят генетически модифицированные микроорганизмы, либо генетически модифицированные клеточные линии животных. Генетическая модификация в данном случае заключается в том, что в клетку интродуцируется ген белка человека (например, ген инсулина, ген интерферона, ген бета-фоллитропина). Эта технология позволяет выделять белки не из донорской крови, а из ГМ-организмов, что снижает риск инфицирования препаратов и повышает чистоту выделенных белков. Ведутся работы по созданию генетически модифицированных растений, продуцирующих компоненты вакцин и лекарств против опасных инфекций (чумы, ВИЧ).

На стадии клинических испытаний находится проинсулин, полученный из генетически модифицированного сафлора¹. Успешно прошло испытания и одобрено к использованию лекарство против тромбозов на основе белка из молока трансгенных коз.

Лекция 4. Применение ГМО и методов генной инженерии в сельском хозяйстве [

Генная инженерия используется для создания новых сортов растений, устойчивых к неблагоприятным условиям среды и вредителям^[44], обладающих лучшими ростовыми и вкусовыми качествами.

Проходят испытания генетически модифицированные сорта [лесных пород](#) со значительным содержанием [целлюлозы](#) в древесине и быстрым ростом^[45].

Однако некоторые компании устанавливают ограничения на использование продаваемых ими генетически модифицированных семян, запрещая высевание самостоятельно полученных семян. Для этого используются юридические ограничения типа контрактов, патентов или лицензирования семян. Также для подобных ограничений одно время прорабатывались технологии [ограничительные технологии](#) (GURT), которые так и не использовались в коммерчески доступных ГМ-линиях. Технологии GURT либо делают стерильным выращенные семена (V-GURT), либо требуют особых химических веществ для проявления внесённого с помощью модификации свойства (T-GURT). При этом стоит отметить, что в сельском хозяйстве широко применяются [гибриды F1](#), которые, как и ГМО-сорты, требуют ежегодной закупки семенного материала. Некоторые продукты содержат ген, приводящий к стерильности пыльцы^[49], например, ген [барназы](#), полученный из бактерии [Bacillus amyloliquefaciens](#)^[50]

Лекция 5. Применение ГМО в животноводстве.

Методы генной инженерии в сельскохозяйственном животноводстве

Лекция 6 Клеточная инженерия

Лекция 7. Генная инженерия человека

Лекция 8. Основы безопасности генной инженерной деятельности

Использование на практике достижений генетической инженерии имеет два важных аспекта. С одной стороны, очевидно, что она может в значительной мере содействовать решению мировых проблем благосостояния людей, касающихся в первую очередь насущных потребностей в продуктах питания, эффективного ведения сельского хозяйства и совершенствования здравоохранения. С другой стороны, генетическая инженерия - революционная технология, которая открывает немыслимые ранее возможности направленной модификации генетического материала. В связи с этим возникает вопрос, насколько безопасны генетически модифицированные организмы для здоровья человека и окружающей среды?

Принимая во внимание второй аспект, при использовании достижений современной биотехнологии определяющим стал принцип принятия мер предосторожности, появившийся в 1970-х гг. как скептическая реакция экологического общественного движения на возможность научной оценки риска и предотвращения вредных последствий применения сложных технологий. По сути, принцип означает, что перед лицом научной неопределенности или отсутствия необходимых знаний лучше ошибиться в сторону избыточности мер безопасности, чем ошибиться в оценке риска. В настоящее время этот принцип содержат более 20 международных законов, договоров, протоколов и конвенций, в том числе основной международный договор, регулирующий отношения, связанные с ГМО, - Картахенский протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии. Приведенные в нем формулировки принципа принятия мер предосторожности не требуют доказательства абсолютной безопасности технологии, но предполагают ее ограничение в случае, если уровень научной неопределенности относительно потенциального риска является значительным, а возможности управления риском - недостаточными.

При наличии обоснованных научных предположений о том, что новый процесс или продукт может быть опасным, он не должен внедряться до тех пор, пока не будут получены доказательства того, что риск невелик, управляем и преимущества технологии его «перевешивают». Применение принципа предосторожности в этом смысле должно продемонстрировать не абсолютным образом, но выше уровня обоснованных сомнений, что предлагаемая заявителем генно-инженерная деятельность безопасна.

Таким образом, одним из главных международных требований, связанных с развитием и применением современной биотехнологии в науке и производстве, является обеспечение в соответствии с принципом принятия мер предосторожности безопасности любой генно-инженерной деятельности (проведение исследований, полевых и других испытаний ГМО), а также безопасность ГМ-продуктов, помещаемых на рынок. Под биобезопасностью в данном контексте понимается система мероприятий, направленных на предотвращение или снижение до безопасного уровня неблагоприятных воздействий ГМО на здоровье человека и окружающую среду при осуществлении генно-инженерной деятельности. В основе биобезопасности лежит научно обоснованная, всесторонняя и адекватная оценка риска возможных вредных воздействий ГМО на здоровье человека и состояние окружающей среды, и разработка мер его предупреждения.

Понятия «риск», «фактор риска», «оценка риска»

В широком понимании риск - это вероятность нежелательного события. Риск нежелательного события связан с какими-то определенными особенностями используемых человеком веществ или совершаемых действий. Каждое вещество и деятельность являются потенциальными факторами риска. Одни вещества и виды деятельности способны вызывать сразу ряд неблагоприятных событий различного рода, в то время как другие могут вызывать единичные или немногочисленные виды таких событий. Фактор риска - это свойственная веществу или какой-либо деятельности (процессу) потенциальная способность причинять вред (вызывать нежелательное событие). Фактор риска является функцией неблагоприятных свойств объекта (деятельности, процесса) и условий их проявления. Если понятие «фактор риска» обозначает лишь причину (сущность) потенциального неблагоприятного события, то понятие «риск» обозначает расчетную вероятность реализации этого события с теми или иными масштабами его последствий. В соответствии с этим риск можно определить в виде следующего математического выражения:

риск = вероятность негативного воздействия фактора риска x величина последствий воздействия.

Процедура оценки риска в данном контексте должна дать ответы на три вопроса:

1. Что представляет опасность (возможность вредного воздействия - идентификация факторов риска)?
2. Насколько вероятно, что это произойдет (вероятность, что воздействие осуществится)?
3. Какова будет величина последствий, если данное событие случится (масштаб последствий этого вредного воздействия)?

В генно-инженерной деятельности термин «фактор риска» используют при определении потенциально возможных прямых и опосредованных неблагоприятных воздействий ГМО или продуктов, изготовленных из ГМО (включающих компоненты ГМО), на здоровье человека и (или) окружающую среду, обусловленные эффектом вставки рекомбинантной ДНК, функционирования трансгенов и передачей трансгенов от ГМО другим организмам. Под прямым воздействием понимается воздействие ГМО на здоровье человека и среду, не требующее анализа цепи взаимосвязанных событий. Под непрямым - опосредованное воздействие ГМО на здоровье человека и окружающую среду, которое осуществляется через цепь взаимосвязанных со-

бытий. В частности, оно может проявляться вследствие взаимодействия ГМО с другими организмами, переноса генетического материала от ГМО другим организмам, изменений порядка эксплуатации объектов хозяйственной деятельности и управления ими, обусловленных высвобождением ГМО, и т. д. Немедленное воздействие ГМО на здоровье человека и окружающую среду наблюдается непосредственно в период осуществления генно-инженерной деятельности. Оно также может быть прямым и косвенным. Отдаленное воздействие становится очевидным в виде прямого или косвенного воздействия после окончания данной генно-инженерной деятельности.

Лекция 9 *Природа рисков для здоровья человека и окружающей среды, связанных с генетически модифицированными организмами*

Для лучшего понимания природы рисков, связанных с ГМО, необходимо помнить отличия генетически модифицированные организмы от обычных, немодифицированных.

В Картахенском протоколе по биобезопасности содержится следующее их определение: живой измененный организм означает любой живой организм, обладающий новой комбинацией генетического материала, полученной благодаря использованию современной биотехнологии (Картахенский протокол по биобезопасности, ст. 3).

Таким образом, какой-либо трансгенный сорт растения отличается от исходного тем, что в его геном к существующим генам добавлен относительно небольшой фрагмент ДНК, в котором записана информация об одном-двух новых генах и их регуляторных элементах. Активность этих добавленных генов в организме выражается в биосинтезе одного-двух новых для организма протеинов (ферментов или структурных белков). Поскольку генетическая инженерия может оперировать любыми генами, существующими в природе, а не только генами от организмов, состоящих в эволюционном родстве с отдельными видами культурных растений, как это делается в традиционной селекции, то продукты привнесенных генов (ферменты, протеины) могут выглядеть в генетически модифицированном организме как необычные, несвойственные, чужеродные для данного вида, которые в природе у него не встречаются. Соответственно именно продукты трансгенов являются наиболее существенными факторами рисков, связанных с ГМО.

К факторам риска не относят добавленный фрагмент ДНК: нет никаких научно обоснованных указаний на токсичность для человека ДНК трансгенов *per se*. Люди ежедневно съедают в среднем 0,1-1 г ДНК в составе различных продуктов. Поэтому ДНК трансгена не является новым, особенным компонентом в рационе человека и присутствует в нем в чрезвычайно малом количестве. Десятилетия исследований не выявили токсического воздействия трансгенной ДНК на организм человека и других млекопитающих. Нет достоверных сведений о случаях вставки трансгенной ДНК, поступившей в организм с продуктами питания, в геном человека. Защитные механизмы млекопитающих (гидролитическое разрушение ДНК в процессе переваривания, исключение чужеродной ДНК из генома реципиента в ходе репаративных процессов, препятствие экспрессии встроенных генов вследствие их целевого метилирования и др.) противодействуют встраиванию чужеродной ДНК в геном человека и ее экспрессии.

Таким образом, вероятность вредного влияния на здоровье человека, обусловленного потреблением трансгенной ДНК, минимальна.

ПО рекомбинантным протеинам, то не во всех ГМО они абсолютно чужеродные, несвойственные для определенного вида растений соединения. Во-первых, существует достаточно большая группа трансгенных сортов растений, которые получены благодаря генетическим манипуляциям с их собственными генами (см. гл. 9, табл. 9.2; гл. 10).

Во-вторых, многие весьма отдаленные в эволюционном плане организмы имеют большое количество идентичных путей метаболизма, и соответственно состав и строение ферментов, которые обеспечивают их реализацию, также идентичны. В качестве примера можно при-

вести фермент EPSPS (см. раздел 10.1), который является ключевым в биосинтезе ароматических аминокислот у всех растений, грибов, бактерий. Бактериальный EPSPS, образующийся у трансгенной сои, толерантной к гербициду глифосату, успешно выполняет соответствующие функции в растительном организме после обработки растений гербицидом, когда растительный EPSPS сои дезактивирован. При оценке безопасности таких близких по функциональной активности генов обращают внимание не столько на сам белок - продукт трансгена, сколько на возможное изменение отдельных путей метаболизма трансгенного растения из-за повышения концентрации одного из их компонентов. В случае EPSPS при оценке безопасности генетически модифицированной сои принималось во внимание, что этот фермент катализирует реакцию, не лимитирующую конечную скорость синтеза ароматических аминокислот, поэтому, как и ожидалось, показатели их синтеза у ГМО не отличались от таковых у исходных растений.

В-третьих, последние научные данные, полученные в результате секвенирования геномов человека, некоторых животных и растений, существенно расширили наши представления о сходстве и отличиях генов разных систематических групп и вероятности их переноса от одной отдаленной систематической группы к другой (горизонтальный перенос генов). Оказалось, что в геноме арабидопсиса присутствует около сотни генов, встречающихся в геноме человека. Таким образом, в природе происходит обмен генетической информацией между отдаленными видами. Тем не менее любой ученый, планируя добавить растению, микроорганизму или животному какой-либо новый ген, должен тщательно изучить сам этот ген, а также продукт его активности и убедиться в их безопасности.

Вторая основная группа рисков связана с самим фактом *вставки трансгенов в генетический материал организма*. Вместе с проявлением целевых признаков генетической модификации (преднамеренный эффект) в результате вставки чужеродной ДНК в ГМО могут проявляться дополнительные признаки или предсуществующие признаки могут претерпеть изменения (непреднамеренный эффект). Непреднамеренные эффекты генетической модификации (НЭГМ) теоретически могут возникать в результате случайного встраивания последовательностей ДНК в геном растения, вызывающего прекращение экспрессии или изменение уровня экспрессии ранее активных генов, начало экспрессии ранее «молчавших» генов. Кроме того, такие эффекты могут быть следствием изменения особенностей метаболизма у реципиентного организма. Одни НЭГМ могут быть частично предсказуемыми на базе знаний о процессе трансформации, месте встраивания трансгена, функциях его продуктов (включая влияние на метаболизм). Другие НЭГМ являются непредсказуемыми (область научной неопределенности).

НЭГМ могут быть опосредованы как *плейотропным действием встроеного гена*, так и свойствами самой встроеной конструкции, в том числе ее нестабильностью и возможным действием на соседние гены. Встраивание в геном чужеродного генетического материала может сопровождаться перестройками в структуре введенной генетической конструкции и генома растения-хозяина. Экспрессия трансгенов может различаться в зависимости от копийности вставки, ее структуры, особенностей области встраивания вставки в геном и др. В связи с этим каждое конкретное генно-модифицированное растение характеризуется определенным уровнем экспрессии и наследования привнесенного генетического материала, вероятностью появления НЭГМ. Не случайно один из важнейших принципов биобезопасности - это индивидуальный подход: проводят тщательную оценку безопасности для здоровья человека и окружающей среды каждого конкретного трансгенного события (линии).

Наконец, третья основная группа рисков, связанных с ГМО, основана на неблагоприятных эффектах, вызванных переносом трансгенов другим организмам: вертикальным переносом генов от ГМО немодифицированным растениям того же вида или диким сородичам культурного вида, горизонтальным переносом генов, например, селективных генов устойчивости к антибиотикам, от генетически модифицированного растения микроорганизмам пищеваритель-

ного тракта. Гены и их продукты, безвредные у ГМО, могут оказаться опасными в другой генетической и экологической среде. Так, приобретение болезнетворными бактериями пищеварительного тракта устойчивости к антибиотикам может существенно затруднить лечение болезней, которые они способны вызывать.

Лекция 10 *Возможные неблагоприятные воздействия ГМ-растений на здоровье человека, методы их оценки и способы предупреждения*

Среди потенциальных рисков для здоровья человека, связанных с использованием ГМО, рассмотрим следующие.

1. Синтез новых для реципиентного организма белков - продуктов трансгенов, которые могут быть токсичными и/или аллергенными. Токсический (аллергенный) потенциал исходного организма-хозяина может возрасти в результате генетической модификации по ряду причин. Во-первых, токсичным (аллергенным) для человека может быть сам продукт трансгена (например, если он принадлежит к белкам, не являющимся компонентами традиционных для производства продуктов питания организмов и не имеющих истории безопасного потребления). Во-вторых, в результате встраивания трансгена возможно увеличение уровня продуцируемых естественных токсических веществ и антагонистов питательных веществ реципиентного растения, что в свою очередь может привести к росту уровня их потребления и к возрастанию вероятности неблагоприятного воздействия на здоровье людей. В-третьих, токсический потенциал исходного растения может вырасти вследствие изменения его метаболизма и аккумуляции у него токсичных метаболитов.

2. Изменение активности отдельных генов живых организмов под влиянием вставки чужеродной ДНК, в результате которого может произойти ухудшение потребительских свойств продуктов питания, получаемых из этих организмов. Например, в генетически модифицированных продуктах может быть повышенный по сравнению с реципиентными организмами уровень каких-либо антипитательных веществ, превышающий установленные пределы безопасности, или пониженный уровень питательных веществ.

3. Горизонтальная передача трансгенов другим организмам, в частности маркерных генов устойчивости к антибиотикам от ГМО микроорганизмам пищеварительного тракта. Наличие и экспрессия в ГМО генов устойчивости к антибиотикам, которые необходимы для отбора трансформированных клеток, вызывают серьезные опасения и являются предметом научных дискуссий. Если горизонтальный перенос селективных генов происходит с относительно высокой частотой, он может негативно сказаться на эффективности традиционной антибиотикотерапии человека и домашних животных.

Как видим, обусловленные ГМО риски для здоровья человека в основном связаны с потреблением продуктов, полученных из них или произведенных ими.

Стратегия и методы оценки качества традиционных продуктов питания и оценка безопасности новых продуктов (изготовленных по новым технологиям, с применением новых пищевых добавок и пр.) хорошо отработаны и показали высокую эффективность. Многие из них могут быть использованы и для оценки безопасности ГМ-продуктов.

Лекция 11. *Методы оценки качества и безопасности традиционных продуктов питания*

В большинстве случаев оценка качества и безопасности традиционных продуктов заключается в анализе возможных неблагоприятных воздействий на здоровье человека пищевых добавок (красителей, эмульгаторов, консервантов и др.) и пищевых загрязнителей (остатков пестицидов, лекарственных ветеринарных средств, гормональных препаратов, микотоксинов и др.).

На первом (подготовительном) этапе проводится предварительная оценка потенциала токсичности загрязнителей. Оцениваемые потенциально опасные пищевые загрязнители иден-

тифицируются аналитическими лабораторными методами; исследуются их физико-химические свойства. Главной составляющей этого этапа оценки риска является первичная токсикологическая оценка исследуемых агентов в остром эксперименте на модельных животных (в основном на грызунах). Острая токсичность определяется неблагоприятными эффектами, регистрируемыми у лабораторных животных после однократного принудительного скармливания им исследуемых загрязнителей. Для скармливания используют химически чистые оцениваемые вещества в различных дозировках (максимальные дозы могут быть 2000-5000 мг/кг). По результатам острого эксперимента определяются показатель токсичности загрязнителя **LD50**, являющийся статистически рассчитанной дозой вещества, которая при однократном скармливании может вызвать гибель 50 % животных. Он выражается в единицах массы оцениваемого вещества в пересчете на массу тела животного (мг/кг) и определяет, способен ли оцениваемый пищевой компонент вызывать острую токсическую реакцию организма. Кроме того, в тесте на острую токсичность вещества проводят обязательные наблюдения над животными, оценивают изменения веса тела, кожных покровов, шерсти, слизистых оболочек, состояния кровеносной, респираторной и центральной нервной систем, поведенческих и соматомоторных реакций.

На втором (основном) этапе оценки безопасности традиционных продуктов питания в серии испытаний определяется характер токсикодинамики идентифицированных агентов (биологический механизм токсического воздействия) и их токсикокинетика (характер химического, биохимического превращения в организме). Экспериментально установленная на втором этапе исследований зависимость «доза - эффект» определяет вероятность неблагоприятного воздействия исследуемого загрязнителя при обычном для данной популяции людей уровне его потребления (т. е. токсикологический потенциал исследуемого агента). Оценка принятого уровня потребления продукта включает в себя измерение среднесуточного объема потребления, частоты потребления и продолжительности потребления. Учитывая все вышеназванные параметры, оценивают риск неблагоприятного воздействия токсичного агента.

Оценка риска токсичности на данном этапе осуществляется в ходе субхронического эксперимента на лабораторных животных. Субхронический эксперимент моделирует реальную ситуацию потребления оцениваемого агента человеком и потому имеет наибольшее значение среди других тестов. Он предоставляет исследователю обширную информацию о точках приложения токсикантов (биологических «мишенях»), характере их неблагоприятного воздействия. При необходимости исследуются также специфические неблагоприятные эффекты токсинов: их генотоксичность, канцерогенность и мутагенность, репродуктивная, онтогенетическая токсичность и иммунотоксичность.

В субхроническом эксперименте проводят принудительное скармливание вещества животным ежедневно в течение 28-90 дней. Используют ряд доз, каждая группа животных получает только одну определенную дозу испытуемого вещества. Уровень доз выбирают по имеющимся предварительным данным его токсичности. Наивысшая дозировка должна вызывать явный токсический эффект, но не приводить к массовой гибели животных. Понижая дозировку, в тесте определяют пороговую дозу вещества, которая не вызывает регистрируемого неблагоприятного воздействия, - так называемый показатель

NOAEL (от англ. no observed adverse effect level). Токсический эффект вещества определяют на основании ряда показателей: изменения веса тела животного, уровня потребления пищи и воды, характера токсической реакции в зависимости от дозы вещества, данных анализа крови и гистологических исследований, уровня смертности и др.

Результаты испытания токсичности пищевых компонентов в острых и хронических тестах на животных экстраполируются далее на человека (условно третий этап оценки). Оценка токсичности в итоге сфокусирована на определении уровня дневного потребления исследуемого агента человеком (с учетом веса тела), которое не оказывает вредного воздействия на

здоровье (так называемая приемлемая доза дневного потребления (англ. acceptable daily intake, ADI)). Показатель ADI рассчитывают, исходя из установленной в эксперименте величины NOAEL с учетом коэффициента безопасности. В большинстве случаев в применении к человеку для определения ADI используется коэффициент 100 ($ADI = NOAEL/100$): предполагается, что человек приблизительно в десять раз имеет более высокую чувствительность к токсинам, чем животные, кроме того, допускаются различия (до десяти раз) в чувствительности между отдельными индивидуумами.

Следует отметить, что риск, связанный с потреблением продуктов питания, не определяется исключительно их загрязнением токсическими веществами или утратой ими качества (например, вследствие неправильного хранения). Абсолютно безопасных продуктов питания не существует. Даже традиционные продукты с продолжительной историей употребления в пищу могут содержать те или иные естественные для них компоненты, оказывающие неблагоприятные эффекты на здоровье человека (природные токсины, аллергены, антагонисты питательных веществ (антинутриенты), вещества с потенциальным мутагенным и канцерогенным действием и др.). Вероятность их неблагоприятного воздействия на человека определяется многими факторами: их содержанием в продуктах питания, взаимодействием с другими компонентами продукта, состоянием защитных систем индивида, экзогенными средовыми факторами, объемом продукта в пищевом рационе и многими другими. К настоящему времени идентифицированы и достаточно полно исследованы как экзогенные, так и многие естественные компоненты пищевых продуктов, которые оказывают вредный или положительный эффекты на здоровье человека. Естественные для продуктов питания потенциально опасные для здоровья человека вещества также не могут игнорироваться при оценке пищевой безопасности, как и эффекты различного рода контаминантов.

Несмотря на это, продукты и пищевое сырье, которые получены с использованием традиционных технологий, имеющих длительную историю применения, не представляют собой объекты скрупулезного и исчерпывающего исследования их безопасности и питательной ценности. Например, сорта растений, созданные методами традиционной селекции, не являются объектом испытаний острой и хронической токсичности в тестах на лабораторных животных. Исключением служат продукты, предназначенные для кормления грудных и малолетних детей. Относительная безопасность традиционных продуктов питания гарантируется длительной историей их безопасного использования человеком.

Лекция 12 *Применение концепции существенной эквивалентности для оценки безопасности ГМО и ГМ-продуктов питания*

Полученные путем традиционной селекции организмы не являются объектом скрупулезного анализа потенциальной токсичности, аллергенности, хотя известно, что они могут содержать ряд вредных соединений. При этом на основании длительного исторического опыта допускается, что новая комбинация генов, созданная в процессе традиционной селекции организмов, используемых для производства продуктов питания, и определяющая ряд новых для них признаков, не будет представлять угрозы для здоровья человека. Принимая во внимание данное допущение, а также методические проблемы, возникающие при исследовании цельных новых продуктов питания (ГМО как целого), в основу оценки их безопасности положена концепция существенной эквивалентности, разработанная экспертами OECD и дополненная FAO/WHO. Согласно определению OECD, концепция существенной эквивалентности предусматривает, что традиционные продукты или пищевое сырье могут служить базой для сравнения при оценке безопасности или питательной ценности новых продуктов, в том числе производных ГМО. Данный сравнительный подход предусматривает, что: 1) традиционные продукты не являются абсолютно безопасными; 2) в случае, если новые продукты питания или их компоненты эквивалентны по существенным характеристикам традиционным продуктам

или пищевым компонентам, их можно использовать таким же образом, не ожидая вредных дополнительных эффектов для здоровья человека.

Следовательно, безопасность нового продукта должна рассматриваться не вообще, а по отношению к традиционному аналогу. Определение «традиционный аналог» в приложении к ГМО или ГМ-продуктам означает близкородственный организм, его компонент или сходные продукты, для которых имеется значительный опыт безопасного потребления в качестве пищи. Лучший аналог для определения существенной эквивалентности - исходный для генетической модификации организм (родительская, практически изогенная линия). Однако такой аналог не всегда доступен. В этом случае

ОЕСД рекомендует использование нескольких генетически близких контрольных образцов (других сортов того же вида растений, близких штаммов микроорганизмов, пород животных) или сходных продуктов, уже присутствующих на товарном рынке, чтобы определить, являются ли выявленные различия следствием естественной вариации либо следствием генетической модификации.

Существенная эквивалентность ГМО и аналога устанавливается путем демонстрации того, что значимые для оценки пищевой безопасности характеристики ГМО и новых продуктов сходны с таковыми у традиционных аналогов. Таким образом, анализ существенной эквивалентности предполагает прежде всего композиционный анализ ГМО (нового продукта) и его аналогов. При этом исследуются ключевые компоненты сравниваемых организмов (продуктов), которые наиболее важны для здоровья человека: питательные вещества и их антагонисты; токсичные вещества, аллергены и др. Среди ключевых питательных веществ выделяют главные (жиры, белки, углеводы) и минорные (минералы, витамины); к антагонистам питательных веществ относятся в основном ингибиторы определенных ферментов. Под ключевыми токсинами подразумевают известные природные соединения и вещества, присутствующие в оцениваемом сырье или продуктах, обладающие существенной для здоровья человека токсической потенциальностью (например, гликоалкалоиды в картофеле).

Для идентификации в новых продуктах и исходном сырье отличных от аналогов признаков, влияющих на уровень безопасности и питательную ценность пищевых продуктов, тщательному анализу подвергается информация, касающаяся характеристик исходного организма, от которого взят ген, предназначенный для трансгеноза, а также характера генетической модификации. Далее проводят сравнительный анализ генетически модифицированного организма и исходного (немодифицированного) организма. Для этого сопоставляют агрономические показатели, продукты встроенных генов, состав ключевых химических компонентов (в том числе питательных и антипитательных), профиль основных метаболитов, эффекты переработки исходного сырья.

Новый продукт (сорт растений) может быть:

- эквивалентным (равноценным) по существенным признакам выбранному аналогу;
- эквивалентным аналогу, за исключением одного (нескольких) существенного, хорошо определяемого признака;
- не эквивалентным аналогу по существенным признакам.

В двух последних случаях проводится тщательная оценка безопасности отличных от исходного аналога признаков ГМО по таким показателям, как потенциальная токсичность, потенциальная аллергенность, возможность переноса генов устойчивости к антибиотикам микроорганизмам пищеварительного тракта, вероятность потенциального ухудшения пищевой ценности и усвоения питательных веществ.

Лекция 13. Оценка потенциальной токсичности новых для организма-хозяина продуктов трансгенов

С т.з. здоровья человека явление токсичности может быть охарактеризовано как причина заболевания химической этиологии (отравление) и как фактор, вызывающий повреждение тканей (типовой патологический процесс), вследствие которого возникает соответствующее патологическое состояние.

Чужеродные гены переносят в трансформируемый организм для передачи ему желательных признаков. Фенотипическое проявление данных признаков обусловлено синтезом новых для организма-реципиента соединений белковой и небелковой природы. Такими синтезируемыми в результате вставки трансгена соединениями могут быть традиционные компоненты продуктов питания: белки, жиры, углеводы, витамины, которые являются новыми только в контексте определенных исходных организмов и ГМО. Кроме того, продуктами трансгенов могут быть целевые белки, не являвшиеся ранее компонентами продуктов питания и соответственно не имеющие длительной истории безопасного употребления человеком. Новыми по отношению к реципиенту могут быть также метаболиты, образовавшиеся в ГМО в результате активности трансгенного фермента. Оценка потенциальной токсичности продуктов трансгенов подразумевает следующее:

- определение химической природы, функций новых синтезирующихся соединений, а также их концентрации в продукте питания с учетом естественной вариации;
- анализ информации о характере генетической модификации и ГМО для получения уверенности в том, что гены донора, отвечающие за синтез известных токсичных и антипитательных веществ, не экспрессируются в ГМО;
- если новое соединение является традиционным пищевым компонентом с известными биологическими функциями (например, каротин в «Золотом рисе») и его концентрация в продукте не превышает обычных пределов варьирования, специальные тесты на токсичность могут не проводиться. В других случаях такие тесты необходимы;
- в случае новых, не имевших истории употребления в пищу белков, оценка их потенциальной токсичности сфокусирована на определении следующих характеристик: уровня сходства их аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью известных токсичных белков; уровня их физико-химической стабильности. В отдельных случаях (см. ниже) для оценки токсичности белков необходимы тесты на модельных животных;
- потенциальная токсичность небелковых соединений оценивается на индивидуальной основе в зависимости от их биологической функции и доли в обычной диете. В данном случае необходимо исследование метаболизма, токсикокинетики, субхронической токсичности, хронической токсичности, канцерогенности, репродукционной токсичности и др.

Наиболее часто продуктами трансгенов коммерчески используемых ГМО являются определенные белки. Поэтому процедура оценки их потенциальной токсичности ниже рассматривается более подробно. Известно, что существует ряд важных различий в токсическом воздействии на человека белков и промышленных химикатов небелковой природы. Белки обычно не токсичны в острых экспериментах на модельных животных, и нет известных случаев, чтобы они демонстрировали хроническую токсичность, например, обладали мутагенным, канцерогенным эффектами. Отдельные белковые токсины хорошо изучены и высокоспецифичны.

Белки, в отличие от химикатов, обычно быстро перевариваются в желудочно-кишечном тракте человека и теряют свою активность. Они также не обладают способностью к биоаккумуляции (накоплению), как некоторые вредные химические вещества. С учетом данных особенностей оценка токсического потенциала трансгенных белков несколько отличается от вышеуказанной процедуры оценки токсичности промышленных и иных загрязнителей пищевых продуктов. Она призвана дать ответы на следующие вопросы:

- Каково предполагаемое количество оцениваемого белка в обычном рационе человека?

- Вызывает ли оцениваемый новый белок регистрируемые неблагоприятные (токсические) эффекты, когда употребляется в пищу в количествах, значительно превышающих установленные дозы потребления?
- Переваривается ли новый оцениваемый белок в желудочно-кишечном тракте человека?
- Разрушается ли новый оцениваемый белок в процессе переработки продуктов питания?

Оценка содержания нового белка в обычной диете человека необходима для дальнейшего анализа его потенциальной токсичности (неблагоприятные токсические эффекты в большинстве случаев зависят от дозы токсичного агента). Данные о вероятном потреблении исследуемого агента собирают в зависимости от специфики питания разных групп населения: национальных групп, возрастных групп, кормящих матерей и др. Такая оценка может быть достаточно сложной, поскольку ГМО относительно редко употребляются в пищу сами по себе, а чаще служат компонентами разнообразных продуктов питания. Потребляемое количество трансгенных белков, как правило, минимально по сравнению с общим количеством потребляемого белка. Однако даже оно теоретически может вызвать неблагоприятные для здоровья человека реакции.

Базовым элементом изучения структуры белков, кодируемых встроенным геном, является оценка их соответствия известным последовательностям аминокислот, прежде всего белкового продукта, заявляемого трансгена (при встраивании в геном возможно изменение структуры ДНК вставки). Для этого обязательным является осуществление сиквенса ДНК белок-кодирующей части трансгена. Полученная информация применяется также для оценки гомологии аминокислотной последовательности белкового продукта трансгенной вставки с известными токсинами и аллергенами, для чего используют соответствующую информацию международных баз данных (табл. 11.1). Желательно проводить секвенирование экспрессируемой части встроенной ДНК. Из трансгенного растения выделяют мРНК, получают на ее основе кДНК, затем проводят амплификацию фрагмента кДНК с праймерами, специфичными для трансгенной вставки или отдельных ее частей (метод ОТ-ПЦР; см. раздел 9.6), продукты амплификации элюируют из геля и секвенируют. Анализ результатов секвенирования проводят с помощью специальных компьютерных программ, например пакета программ

Chromas Pro Version 1.5. Степень идентичности полученных последовательностей последовательностям, включенным, например в базу данных NCBI (англ. National Centre for Biotechnology Information - Национального центра биотехнологической информации США), осуществляют при помощи пакета программ NCBI Standard Nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Лекция 14. Оценка риска потенциальной аллергенности ГМ-продуктов

Пищевая аллергия - это неблагоприятная для человека иммунологическая реакция, развивающаяся в ответ на попадание в организм определенных экзогенных веществ - аллергенов. Пищевой аллерген - компонент продуктов питания, который стимулирует развитие неблагоприятной иммунной реакции у страдающих пищевой аллергией индивидов. Тот или иной продукт может содержать от одного до целого ряда аллергенов, которые в подавляющем большинстве случаев являются белками.

Различают несколько типов неблагоприятных иммунных реакций на пищевые белки. Наиболее встречаемый тип пищевой аллергии относится к типу I, который сопровождается выработкой в организме антител с особой клеточной аффинностью (способностью связываться с мембранами ряда специализированных клеток). Антитела - специализированные иммунные эффекторные белки сыворотки крови (иммуноглобулины), специфически распознающие чу-

жестеродные для организма макромолекулы - антигены (в основном чужеродные белки и белковые комплексы) и участвующие в их элиминации. Антитела продуцируются специализированными клетками иммунной системы в ответ на проникновение в организм чужеродных антигенов. Выделяют 5 классов антител, различных по своей структуре, которые совместно с другими специализированными белковыми и клеточными компонентами иммунной системы участвуют в защите организма от генетически чужеродных веществ.

Аллергическую реакцию типа I определяют, как приобретенную гиперчувствительность организма немедленного типа к относительно безвредным экзогенным веществам - аллергенам (в том числе к безвредным в общем случае компонентам продуктов питания). В отличие от защитных реакций иммунитета аллергическая реакция типа I неблагоприятна для человека и связана с выработкой повышенного количества особого класса антител - IgE, направленных против специфических аллергенов. Ее симптомы могут наступать спустя минуты после контакта компонентов системы иммунитета с аллергеном.

К особенностям IgE-опосредованных аллергических заболеваний можно отнести следующие. Во-первых, только небольшое количество антигенов, обладающих потенциальной способностью вызывать иммунный ответ, являются аллергенами. Во-вторых, далеко не все индивидуумы в одинаковых условиях среды реагируют на контакт с аллергеном. Хотя у всех людей продуцируется какое-то количество антител класса E, только некоторая часть индивидов становятся чувствительными при попадании в организм чужеродных белков внешней среды и развивают IgE-опосредованный аллергический иммунный ответ. Приобретение чувствительности - сложный процесс, зависящий от природы конкретного человека и времени первого контакта с аллергеном.

По сравнению с другими видами аллергии пищевая IgE-зависимая аллергия встречается довольно редко (у 0,3-8 % детей в зависимости от возраста и у 1-2 % взрослого населения). Дети в большей степени подвержены пищевой аллергии вследствие неполной зрелости их IgE-системы иммунитета и неполной физиологической зрелости. Они обычно «перерастают» пищевую аллергию, особенно на молоко, яйца и соевые бобы. Поэтому среди взрослого населения она распространена в гораздо меньшей степени, чем среди детей.

Более 90 % аллергических реакций, наблюдаемых у детей и взрослых, происходит при употреблении в пищу восьми основных продуктов или групп продуктов. Это коровье молоко, яйца, рыба, морские ракообразные (креветки, крабы), а также моллюски, арахис, соя, орехи (миндаль, грецкие орехи и др.), пшеница (табл. 11.2). Кроме того, еще около 160 других продуктов или пищевых компонентов вызывают аллергическую реакцию только у отдельных людей. Среди них отмечены большинство зерновых, масличных и овощных продовольственных культур, а также промышленно изготовленные продукты: пиво, шоколад и пр. Фактически все пищевые аллергены являются белками или гликопротеинами. Однако только очень низкий процент из многих тысяч пищевых белков - аллергены.

Таблица 11.2. Пищевые аллергены растительного и животного происхождения (по D. Metkalfе и др., 1996)

Видовое название растения или животного	Традиционно назван ие	Аллерген (систематическое и оригинальное название)	Молекулярный вес kDa
<i>Аллергены растительного происхождения</i>			
Arachis hypogea	Арахис	Ara h 1	
Bertholletia escelsa	Бразильский орех	Ber e 1 (2S альбумин)	

Brassica juncea	Горчица листовая	Bra j 1; 2S альбумин	14
Sinapis alba	Горчица белая	Sin a 1 (2S альбумин)	14
Glycine max	Соя	Глицин (субъединица AlaVx, субъединица A2B1a, субъединица A3B4 и др.), β -конглицинин (α -субъединица, субъединица CG4), соевый лектин (соевый агглютинин), ингибитор трипсина Кунитца (Kunitz)	
Hordeum vulgare	Ячмень	Hor v 1; BMAI-1 (α -амилаза/ингибитор трипсина)	15
Oriza sativa	Рис	RAP (рисовый аллергенный белок), RAG1 (рисовый аллерген 1)	
Phaseolus vulgaris	Фасоль	PR-1 (белок, связанный с патогенезом - 1)	
Triticum aestivum	Пшеница мягкая	WGA (зародышевый агглютинин A, D пшеницы)	
Triticum durum	Пшеница твердая	WGA (зародышевый агглютинин пшеницы)	
Аллергены животного происхождения			
Bos taurus	Крупный рогатый скот	BSA (бычий сывороточный альбумин), β -лактоглобулин (белок молока), α -лактальбумин (белок молока), казеин (типы α -S1, M-S2, β -)	
Gadus callaria	Треска	Gad c1; allergen M, β -парвальбумин	12
Аллергены животного происхождения			
Gallus domesticus	Домашние куры	Gal d1 (овомукоид),	28
		Gal d2 (овальбумин)	44
		Gal d4 (лизоцим)	14
Metapenaeus ensis	Креветки	Met el; тропомиозин	34

Обычно аллергены - это хорошо растворимые белки (водорастворимые альбумины и солерастворимые глобулины) с молекулярной массой 10-80 тыс. дальтон и кислотной изоэлектрической точкой. Большинство аллергенных белков характеризуется стабильностью к пере-

вариванию в желудочно-кишечном тракте и к разным видам переработки (в том числе термической). Эти свойства позволяют им сохранить свою структуру вплоть до попадания в кишечник и преодолевать барьер слизистой ткани кишечника в иммунологически интактной форме. Характерная молекулярная масса и относительная устойчивость к физико-химическим разрушающим воздействиям служат косвенными показателями аллергенного потенциала белков (см. ниже), однако они не имеют абсолютной надежности при оценке риска аллергенности. В частности, существует множество термолабильных или частично термолабильных пищевых аллергенов. Некоторые аллергенные белки имеют молекулярную массу ниже характерной (например, липидопереносящие белки растений - 9 тыс. дальтон; белок кожуры семян сои - 8 тыс. дальтон). В отдельных случаях термообработка может не снижать, а даже увеличивать аллергенность белков, в частности в результате их химического гликозилирования (например, в случае β -лактоглобулина коровьего молока, некоторых белков ракообразных).

Риск того, что в ряде ГМ-продуктов питания (изготовленных из ГМО, включающих ГМО или являющихся ГМО) может возрасти аллергенный потенциал, в значительной степени обоснован. Известно, что многие белковые аллергены обладают биологической активностью, которая может найти применение в трансгенных организмах (может быть целевым эффектом модификации). Например, многочисленные белки с потенциальной антимикробной, антигрибной активностью - известные аллергены. Важные запасные белки семян многих двудольных растений - 2S альбумины - одновременно главные аллергены горчицы, бразильского ореха, грецкого ореха, семян хлопчатника (см. табл. 11.2). В литературе описана попытка переноса гена, ответственного за синтез 2S альбумина, от бразильского ореха растениям сои в целях увеличения у нее содержания аминокислоты метионина и улучшения ее кормовых качеств. Однако продуцируемый в трансгенных растениях сои 2S альбумин, составивший значительную часть от общего соевого белка (6 %), оказался аллергенным для чувствительных к бразильскому ореху людей. И хотя этот сорт трансгенной сои предназначался исключительно для кормления животных, он не был допущен к коммерческому использованию. Данный пример весьма показателен в плане того, что существует реальный риск переноса генов, отвечающих за продукцию аллергенов, от организма-донора, обладающего аллергенным потенциалом, организму-реципиенту. Более того, если вероятность привнесения известного аллергенного белка в ГМО можно относительно просто проконтролировать, то сложнее оценить вероятный аллергенный потенциал новых для исходного организма трансгенных белков, у которых не было длительной истории употребления в пищу (например, GFP, Vt-протеина и др.).

Диагноз пищевой аллергии ставят пациенту, исходя из точной истории воспроизведения аллергических реакций при употреблении определенных продуктов и отсутствия данных реакций при исключении этих продуктов из его рациона. Потенциальный риск аллергенности новых продуктов питания состоит в том, что люди, чувствительные к аллергену - продукту трансгена, - не смогут идентифицировать данный провоцирующий аллергию компонент, если он будет включен в ряд продуктов питания. В этом случае будет сложно установить первопричину аллергической реакции, так как аллергию, вероятно, будут вызывать не сходные пищевые источники аллергена.

В процессе генно-инженерной модификации в исходный организм-хозяин включаются один или несколько трансгенов, ответственных за продукцию очень небольшой фракции (обычно менее 0,4 %) белка относительно общего содержания белка ГМО. Тем не менее, как указывалось выше, этого может быть достаточно для развития пищевой аллергии у чувствительных к ней людей. До настоящего времени не зафиксировано случаев аллергических реакций у людей от употребления новых продуктов питания или их трансгенных источников, высвобожденных для обращения на товарном рынке. Однако существует определенная вероятность того, что в процессе генетической модификации может быть увеличен аллергенный потенциал ГМО и соответствующих продуктов питания.

Теоретически такое увеличение аллергенного потенциала продуктов питания может произойти вследствие двух событий. Во-первых, экспрессия трансгенов, переданных исходному организму вследствие генетической модификации, может привести к продукции не свойственных ему ранее аллергенных белков (т. е. молекулярные продукты трансгенов могут быть аллергенами). Во-вторых, вероятно, что природный аллергенный потенциал организма-хозяина может быть увеличен вследствие непреднамеренных эффектов генетической модификации. Различные пищевые культуры, такие как арахис, авокадо, пшеница, характеризуются значительной вариабельностью количества аллергенов, и их уровень может подвергнуться дальнейшему изменению в результате генетической модификации. Кроме того, есть вероятность, что присущие организму-хозяину неаллергенные ранее белки после генетической трансформации станут аллергенными (например, вследствие гликозилирования).

Эксперты ряда международных организаций (ILCI - Allergy and Immunology Institute; IFBC - International Food Biotechnology Council; FAO/WHO) разработали систему оценки риска аллергенности новых продуктов питания и исходных ГМО, включающую ряд связанных анализов. Ниже приведена процедура оценки аллергенности, принятая экспертами FAO/WHO (рис. 14.1).

Рис. 14.1. Оценка риска аллергенности ГМ-пищевых продуктов. Последовательность тестов и решений, предложенная экспертами FAO/WHO (FAO/WHO, 2001; <http://www.fao.org/es/csn/gm/biotech-e.htm>)



Позитивный результат структурного сравнительного анализа свидетельствует о том, что оцениваемый белок с большой вероятностью - аллерген, и ГМО не может высвободиться для обращения на товарном рынке. Чтобы доказать обратное, требуются дальнейшие специфические иммунологические исследования. Структурное сходство с известными аллергенами

может рассматриваться как существенное и в случае менее чем 35 % идентичности сравниваемых белков, если испытуемый белок принадлежит к семействам белков, содержащим ряд известных аллергенов. Примерами могут быть липокалины, напины (2S альбумины семян), парвальбумины и др. Если рассматриваемый белок принадлежит к таким семействам, он с большой вероятностью может быть аллергеном для человека. Негативный результат структурного анализа свидетельствует о том, что оцениваемый белок не относится к известным аллергенам и не обладает перекрестной реактивностью с известными аллергенами.

Кроме сравнительного анализа аминокислотной последовательности на первых этапах исследования проводится также физико-химический тест на устойчивость проверяемых белков к протеазам желудочно-кишечного тракта (тест на разрушение пепсином). Выше уже отмечалось, что аллергенами являются белки, в основном устойчивые к разрушению реагентами желудочно-кишечного тракта (иначе они не могут достигнуть в нативном состоянии реактивных тучных клеток слизистой кишечника). Стандартная процедура оценки протеолитической активности пепсина предусматривает обработку целевого белка раствором пепсина. Негативный результат теста говорит о том, что исследуемый белок лишь с небольшой (но требующей внимания) вероятностью может быть аллергеном. Напротив, устойчивость оцениваемых белков к разрушению пепсином в подходящих условиях показывает, что они могут быть аллергенами.

В совокупности предварительные непрямые тесты на аллергенность позволяют с определенной вероятностью судить о том, является ли оцениваемый белок аллергеном. Положительный результат свидетельствует о том, что с большой вероятностью тестируемые белки могут быть аллергенными (но это не обязательно так).

Отрицательный результат непрямых тестов не служит абсолютным доказательством того, что тестируемые белки не обладают аллергенным потенциалом. Поэтому после предварительной характеристики структурных и физико-химических особенностей исследуемых белков процедура оценки риска продолжается. Она предусматривает проведение специфических иммунологических исследований, окончательно устанавливающих, являются ли тестируемые белки аллергенами. Для белков, ведущих свое происхождение от известных аллергенных источников или имеющих структурную гомологию с известными аллергенами, процедура оценки риска рекомендует проведение так называемого специфического сывороточного скрининга. Это тесты *in vitro* на реактивность трансгенного белка со специфическими IgE из сыворотки крови людей, чувствительных к белкам организма-донора (из ДНК которого выделен трансген). Данные исследования показывают, распознаются ли анализируемые белки антителами IgE из сыворотки крови людей, чувствительных к аллергенам донора. Анализ *in vitro* может установить факт присутствия и количество аллергенного белка в исследуемых продуктах питания и в определенной степени показать изменение аллергенных свойств белка.

Стандартными, применяемыми для иммунологических исследований *in vitro* являются тесты твердофазной иммунологической диагностики - радио-аллергосорбентный анализ (RAST) и иммуноферментный анализ (ELISA). Например, в случае теста RAST сыворотка чувствительных индивидов инкубируется с испытуемым потенциальным аллергеном (экстрактом пищевых продуктов), закрепленным на подходящем твердофазном носителе. Аллерген-специфичные IgE связываются с закрепленным на носителе аллергеном и могут определяться при использовании меченных радиоактивным иодом антител против IgE человека.

Для получения достоверных оценок риска в тестах *in vitro* критической является доступность сыворотки крови достаточного количества индивидов, чувствительных к определенному аллергену. Анализ по возможности должен проводиться с 25 пробами сыворотки людей, страдающих пищевой аллергией. Испытания с использованием минимум восьми соответствующих сывороток необходимы для достижения 99 % достоверности того, что испытуемый бе-

лок не является главным аллергеном. Соответственно 24 сыворотки необходимы для достижения такой же достоверности в случае минорных аллергенов. При наличии, по крайней мере, 14 индивидуальных сывороток негативный результат специфического сывороточного скрининга с вероятностью более 99,9 % свидетельствует о том, что испытуемый белок не относится к главным аллергенам. В аналогичных условиях негативный результат с вероятностью более 95 % свидетельствует о том, что испытуемый белок не относится к минорным аллергенам, вызывающим аллергическую реакцию, по крайней мере, у 20 % чувствительных индивидов. Если тест *in vitro* дает положительный результат, ГМО или соответствующий продукт признаются аллергенными. При негативном результате теста (в совокупности с данными об отсутствии структурной гомологии испытуемого белка с известными аллергенами и отсутствии устойчивости к протеазам желудочно-кишечного тракта) трансгенный белок с большой вероятностью не будет аллергеном.

Для клинического анализа аллергенности трансгенных белков *in vivo* обычно используется кожный тест (**SPT - англ. Skin prick test**). Экстракты нужной концентрации, выделенные из организма-реципиента, донора и ГМО (пищевых продуктов, полученных на их основе), вводятся в эпидермальный слой кожи чувствительных индивидов. В течение 15 мин после введения регистрируется локальная аллергическая реакция, проявляющаяся покраснением тестовой зоны (наподобие следа от укуса комара). Если реакции за этот промежуток времени не наблюдается, испытуемые продукты с большой вероятностью не содержат пищевых аллергенов. Критическим для данного метода является изготовление экстрактов с адекватным содержанием потенциального аллергена. На результаты SPT также оказывают влияние способы приготовления испытуемых продуктов (например, нагревание может как разрушить, так и создать новые антигенные детерминанты у аллергена).

Процедура оценки потенциальной аллергенности более проста и надежна, если аллергенный потенциал рассматриваемых белков - продуктов трансгенов - уже известен ко времени испытаний. В этой ситуации доступна сыворотка чувствительных индивидов для специфического скрининга *in vivo* - метода с хорошей доказательной базой.

Гораздо сложнее проводить оценку трансгенных белков, если они не имели истории употребления в пищу и соответственно нет никакой информации об их аллергенном потенциале. В данном случае сыворотки крови людей, содержащие специфические к испытуемому белку IgE, недоступны. На первый план здесь выходят указанные выше непрямые методы оценки потенциальной аллергенности: сравнительный анализ аминокислотной последовательности испытуемых белков с известными аллергенами и их физико-химическая характеристика. При этом к результатам таких испытаний, не являющихся собственно иммунологическими, следует относиться с определенной осторожностью. Обычно для «новых» с точки зрения питания человека белков производится *полная процедура оценки риска*, в том числе иммунологические испытания на добровольцах.

Лекция 15 *Оценка риска, обусловленного возможностью горизонтального переноса маркерных генов устойчивости к антибиотикам к микроорганизмам пищеварительного тракта*

В рамках оценки риска ГМО для здоровья человека наряду с другими факторами риска обязательно проводится и оценка риска переноса маркерных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам (если они присутствуют в ГМО) микроорганизмам пищеварительного тракта. Данное требование и критерии оценки соответствующего риска включены в принятую на международном уровне процедуру оценки безопасности ГМО и новых пищевых продуктов (FAO/WHO, 2003).

Антибиотики - органические вещества, образуемые живыми организмами (в основном бактериями, грибами) и обладающие антимикробными свойствами. Это одна из главных со-

ставляющих современной лекарственной терапии. Горизонтальный перенос селективных маркерных генов патогенным бактериям может стать причиной появления устойчивых к определенным антибиотикам генотипов и тем самым снизить эффективность лечения заболеваний человека и домашних животных.

Перенос фрагментов ДНК от трансгенных растений микроорганизмам кишечника вследствие употребления ГМ-продуктов питания теоретически маловероятное событие, так как для того чтобы оно произошло, необходимо сочетание следующих факторов:

- маркерный ген ГМО, участвующий в трансформации бактерии, должен быть в виде свободных линейных фрагментов ДНК;
- ДНК маркерного гена должна избежать деградации нуклеазами желудочно-кишечного тракта;
- ДНК маркерного гена должна избежать конкуренции за транспорт в бактериальную клетку с другой ДНК, содержащейся в пище;
- реципиентные бактерии должны быть компетентными для трансформации;
- ДНК маркерного гена должна избежать ферментативной рестрикции внутри бактериальной клетки;
- маркерный ген может встроиться в ДНК реципиента вследствие редких репаративных или рекомбинационных событий. Для этого должна иметь место гомология маркерного гена или прилегающих к нему районов ДНК с ДНК хромосомы или плазмиды болезнетворной бактерии пищеварительного тракта;

Ads by optAd360

- для экспрессии встроенного маркерного гена в бактериях необходимо, чтобы маркерный ген попал в «сферу действия» бактериальных регуляторных последовательностей (в эукариотических ГМО активность трансгена регулируется эукариотическими промоторами, не функционирующими в прокариотах).

Несмотря на теоретически низкую вероятность ГПГ, осуществлялись многочисленные эксперименты, имеющие целью на практике оценить частоту горизонтального переноса маркерных генов. Процесс естественной трансформации бактерий генетическим материалом высших растений был обнаружен исключительно в оптимизированных лабораторных условиях и при непременном требовании гомологичной рекомбинации. Это означает, что маркерный ген устойчивости к антибиотикам может быть перенесен из ГМО в бактериальные клетки, если тот же самый ген или гены, включающие фрагменты с идентичной последовательностью нуклеотидов, заранее присутствуют в данных клетках. В случае, когда гомологии ДНК у живых организмов не наблюдается, ГПГ маловероятен даже в оптимизированных лабораторных условиях.

Вероятность ГПГ оценивалась также в модельных системах, имитирующих условия желудочно-кишечного тракта человека. Показано, что ДНК ГМ-растений быстро (в течение нескольких секунд) разрушается в тонком кишечнике, но сохраняется относительно продолжительное время (минуты) в нижней части подвздошной кишки и в толстом кишечнике, где теоретически возможен ГПГ. Расчет вероятности ГПГ канамицин-устойчивости из трансгенных томатов микрофлоре толстого кишечника человека представила американская агрофирма «Calgene». Он показал, что употребление в пищу 250 г трансгенных томатов (3 мг ДНК, 10 копий гена *nptII* на геном) может увеличить долю микроорганизмов, несущих ген *nptII*, лишь на $2,4 \times 10^{-15} \%$. При этом факт трансформации не означает еще функционирования гена, что требует дополнительных процессов рекомбинации и отбора. Частота трансформации бактерий пищеварительного тракта линейным фрагментом трансгенной ДНК оценивается разными исследователями как $1:10^{17}$ - 10^{18} .

Кроме вероятности неблагоприятного воздействия какого-либо фактора для оценки риска важен параметр величины его последствий. Известно, что значительная доля микроор-

ганизмов желудочно-кишечного тракта человека уже является устойчивой к тем или иным антибиотикам независимо от генно-инженерной деятельности. Доля устойчивых форм растет вместе с ростом масштаба применения антибиотиков в медицинской практике. Например, в отношении канамицина имеются данные, что из 10

Ads by **optAd360**

¹⁴ бактерий пищеварительного тракта 10^2 уже имеют природную устойчивость к нему. Широкая распространенность бактерий, устойчивых к канамицину, неомицину и другим антибиотикам, гены устойчивости к которым используют в генно-инженерных исследованиях, ограничивает применение этих препаратов в медицинской практике. В настоящее время они если и используются, то преимущественно в ветеринарии.

Бактерии с природной устойчивостью к антибиотикам являются частью микрофлоры пищевых продуктов. Экспериментально продемонстрировано, что на поверхности семян сои, кукурузы как трансгенных, так и не трансгенных сортов, с высокой частотой представлены бактерии с различным фенотипом устойчивости к антибиотикам. Вероятность горизонтального переноса генов устойчивости к антибиотикам микрофлоре кишечника от естественной микрофлоры, загрязняющей продукты питания, гораздо выше, чем ГПГ от ГМО.

Принимая во внимание крайне низкую вероятность горизонтального переноса маркерных генов устойчивости к антибиотикам, применяемым в современной генно-инженерной практике, и его незначительные последствия, можно констатировать, что риск ГПГ маркерных генов для здоровья человека приближается к нулю.