

УТВЕРЖДАЮ:

Ректор Гродненский государственный аграрный университет

В.К. Пестис

года



**Заключение
государственной экспертизы биобезопасности
генно-инженерных организмов**

1. Общие положения

Эксперт – Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет».

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

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

Цель экспертизы – получение разрешения на высвобождение непатогенных генно-инженерных организмов (трансгенных коз) в окружающую среду с целью регистрации стада коз-продуцентов как источника получения рекомбинантного лактоферрина человека.

Объект экспертизы – трансгенные козы со встроенным геном лактоферрина человека.

Основание для проведения экспертизы – договор № 188/2017 от 25.09.2017 г.

Экспертом на основании представленной Заказчиком информации об оценке риска о возможных вредных воздействиях генно-инженерных организмов на здоровье человека и окружающую среду, а также о мерах по предупреждению такого риска (оформленных в соответствии с Приложением 2 к «Положению о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения»), руководствуясь Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 8.09.2006 №1160 «Об утверждении положений о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения, и выдачи разрешений на высвобождение непатогенных генно-инженерных организмов в окружающую среду для проведения испытаний» [1], методических рекомендаций [2, 3], руководства и данных Механизма посредничества по биобезопасности ВСН [5, 6], проведена экспертиза биобезопасности для высвобождения в окружающую среду непатогенных генно-инженерных организмов (трансгенные козы со встроенным геном лактоферрина человека) с целью регистрации заявленного Заказчиком объекта экспертизы как источника получения рекомбинантного лактоферрина человека.

2. Методология проведения оценки рисков трансгенных коз со встроенным геном лактоферрина человека

Оценка рисков трансгенных коз со встроенным геном лактоферрина человека проводилась на основании данных Заказчика об оценке риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека и окружающую среду, а также о мерах по предупреждению такого риска (далее Досье) в соответствии с Приложением 2 к «Положению о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения» [1].

Выявление потенциальных рисков, связанных с высвобождением трансгенных коз-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека, проводилось в контексте рисков, вызываемых немодифицированным реципиентом (*Домашняя коза*). При этом принимался во внимание масштаб высвобождения, принимающая среда высвобождения, и вероятные потенциальные принимающие среды, в которых планируется высвобождение.

Методология оценки риска включала:

Этап 1. Выявление любых новых генотипических и фенотипических характеристик, связанных с генетически модифицированным организмом (ГМО), которые могут оказать неблагоприятное воздействие на биологическое разнообразие в вероятной потенциальной принимающей среде, с учетом также рисков для здоровья человека.

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

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

Этапы 2 и 3 проведены одновременно.

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

Этап 5. Вынесение рекомендации относительно того, являются ли риски приемлемыми или регулируемыми, включая, если это необходимо, определение стратегий для регулирования таких рисков.

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

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

- особенности ГМО (по сравнению с реципиентными организмами), которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение и распространение в потенциальной принимающей среде;
- известные и прогнозируемые условия потенциальной принимающей среды, которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение, рассеивание ГМО;

- способность к переносу генетической информации: наличие в потенциальной принимающей среде диких или культурных родственных видов, способных к гибридизации с ГМО, вероятность переноса трансгенов от ГМО к таким организмам;
- идентификация и описание организмов-мишеней (организмов, на которых направлено действие) продуктов трансгенов ГМО;
- идентификация и описание организмов, не являющихся мишениями продуктов трансгенов, которые могут быть подвержены влиянию генно-инженерных организмов.

На 2 и 3 этапах оценки рисков оценена вероятность возникновения каждого неблагоприятного последствия и оценены последствия, в том случае если такое неблагоприятное воздействие наступит.

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

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

На 4 этапе была дана качественная оценка совокупного риска, вызываемого ГМО. Оценка совокупного риска дана с использованием следующих терминов **«высокий»**, **«средний»**, **«низкий»**, **«незначительный»** или **«неопределенный»** (вследствие отсутствия ясности относительно уровня риска или недостаточности знаний).

На 5 этапе были определены рекомендации относительно того, являются ли риски **приемлемыми** или **регулируемыми**, а также даны рекомендации относительно стратегий для регулирования таких рисков.

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

3. Оценка рисков трансгенных коз со встроенным геном лактоферина человека

3.1. Информация, имеющая существенное отношение к оценке риска.

3.1.1. Характеристика реципиентного организма.

Полное название: *Домашняя коза / Capra hircus*

семейство; *Полорогие / Bovidae*

род; *Горные козлы / Capra*

вид; *Домашняя коза / Capra hircus*

подвид; *Capra hircus hircus*

обычное название; *Коза*

другие названия - *нет*

Вид распространен на всех континентах, за исключением Антарктиды.

Естественными хищниками коз являются представители семейства псовых (*Canidae*), такие как Волк (*Canis lupus*), и одичавшие домашние собаки (*Canis lupus familiaris*). Естественных жертв не имеет.

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

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

Биологических хозяев у представителей вида Коза домашняя не существует.

Для вида Коза домашняя (*Capra hircus*) половое созревание наступает в возрасте 5-9 месяцев. Наиболее благоприятный возраст для случки коз считается 9-15 месяцев. Беременность (сукозность) у коз длится в среднем 150 дней. Плодов 1-2, беременности тройней или четверней встречаются в 13,5%

и 2% случаев, соответственно. Козой домашней освоены биотопы от экваториальных до субарктических широт. Структуры (споры, склероции и т.п.), необходимые для выживания, отсутствуют.

3.1.2. Характер генетической модификации, метод, использованный для переноса генетической конструкции, стабильность вставки.

Цель генетической модификации – включение в геном реципиентных организмов генной конструкции, отвечающей за выработку рекомбинантного лактоферрина человека с молоком животных-продуцентов.

Для создания первичной трансгенной козы был использован вектор pBC1 (Коммерческий вектор pBC1 (Invitrogen, США)), который был перенесён методом микроинъекции в пронуклеус зиготы. В этом векторе используется регуляторная область гена β -казеина размером 6.2 т.п.н., состоящая из промотора и гормонзависимого энхансера, который стимулирует промотор только в клетках молочной железы. В состав вектора также входят 7.8 т.п.н. 3'-области гена β -казеина, которая обеспечивает эффективную терминацию транскрипции.

Вектор pBC1 содержит две копии инсуляторной последовательности, которая функционирует как хроматиновый изолятор, расположенные непосредственно перед промотором β -казеина. Последовательности инсуляторов были изначально получены из 5'-области гена β -глобина цыпленка.

Промотор β -казеина козы используется в векторе для стимулирования высокоуровневой экспрессии рекомбинантного белка-интереса. β -казеиновый промотор козы является тканеспецифичным промотором, который обеспечивают экспрессию гена почти исключительно в лактирующей молочной железе с минорными уровнями экспрессии в скелетных мышцах и коже.

TATA box – коровий элемент промотора, на котором собирается преинициаторный транскрипционный комплекс РНК-полимеразы II.

5'-нетранслируемая область β -казеинового гена козы. Содержит первый экзон и частично второй экзон бета-казеинового гена.

3'-нетранслируемая область β -казеинового гена козы. Включает в себя 3 некодирующих экзона β -казеина (экзоны 7-9) и последовательности полиаденилирования мРНК, необходимые для эффективной терминации транскрипции.

Последовательность космидного вектора pHC79. Содержит прокариотические последовательности, позволяющие отбирать и клонировать вектор pBC1 в *E. coli*. Включают также сайты упаковки космиды, что позволяет упаковывать конструкции в фаге лямбда.

Bla промотор обеспечивает экспрессию гена резистенции к ампициллину (*bla*) в *E. coli*.

Ген резистенции к ампициллину (*bla*) для селекции трансформантов в *E. coli*.

Последовательность pBR322 необходима для низкокопийной репликации вектора в *E. coli*.

В работе по встраиванию в геном реципиентного организма использовались две генные конструкции.

Конструкция hLf3 (описание и схема прилагаются):

- две копии инсулатора из бета-глобинового гена кур (beta-globin insulator chicken 2x);
 - Бета-казеиновый промотор из генома коз (beta-casein promoter, goat);
 - TATA box;
 - 5'-нетранслируемая область (beta-casein exon 1, beta-casein exon 2);
 - ATG – начало трансляции лактоферрина;
 - по сайту XhoI в вектор pBC1 клонирована гибридная конструкция лактоферрина. Первая часть – геномная копия с 1 по 7 экзон (14479bp (14290), с ATG кодона до SmaI сайта), вторая часть – кДНК (1331bp (1327), от SmaI сайта до Stop кодона). Эти две части состыкованы по SmaI сайту, который находится в 7 экзоне.

- 3'-нетранслируемая область (beta-casein exon 7-9 and beta-casein 3'-genomic fragment).

Конструкция hLf5 (описание и схема прилагаются):

- две копии инсулатора из бета-глобинового гена кур (beta-globin insulator chicken 2x);
- Бета-казеиновый промотор из генома коз (beta-casein promoter, goat);
- TATA box;
- 5'-нетранслируемая область (beta-casein exon 1, beta-casein exon 2);
- ATG – начало трансляции лактоферрина;
- По сайтам XhoI-NotI в вектор pBC1 клонирована геномная последовательность лактоферрина длиной 35013 bp, начиная с ATG кодона, состоящая из 17 экзонов и инtronов между ними (LTF exon 1 – LTF exon 17).

3.1.3. Способность переноса вектора в другие организмы.

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

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

Наличие чужеродного ДНК у трансгенных животных определяется с помощью ПЦР анализа с использованием следующих праймеров: F: TTGTCACTATCTCCCCAAGCTCA, R: GCCACAAACGGCATGAGAAGGGACC. Первый праймер находится в интроне перед 7 экзоном лактоферрина человека, второй праймер – в 7 экзоне. Результаты ПЦР оцениваются путем нанесения продуктов амплификации на 2% ТАЕ агарозный гель. В трансгенных животных присутствует ПЦР-продукт размером 237 п.н. В

качестве положительного контроля используется геномная ДНК человека, в качестве отрицательного - геномная ДНК нетрансгенных коз.

3.1.5. Уровни экспрессии трансгенов.

Концентрация лактоферрина в молоке кз-производителей составляет – 2-6 г/л. Определяется ИФА-методом с применением набора реагентов, предоставленного ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» («МБЛ-Диагностикум-ЛФ), г. Санкт-Петербург), согласно методике, предложенной производителем набора, заключающейся в последовательной сорбции ЛФ из образцов с известными концентрациями (6,25-400 нг/мл) и тестируемых проб разведенного молока в лунках планшета, поверхность которых предварительно покрыта аффинными антителами крыс против ЛФ; сорбции вторичных антител против антител кролика, конъюгированных с пероксидазой из корней хрена. Раствор антител кролика против ЛФ подкрашен синим красителем, раствор вторичных антител не содержит красителя. После каждого этапа избыток реагентов удаляется промывкой физиологическим раствором. В конце ИФА с помощью хромогенного субстрата выявляется пероксидазная метка, после чего реакция останавливается серной кислотой. По калибровочной зависимости A_{492} от концентрации ЛФ производится расчет концентрации ЛФ в тестируемых образцах.

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

3.1.6. Характеристика генетически модифицированного организма.

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

мация о движении поголовья трансгенных животных прилагается). В течение года постоянно проводятся плановые мероприятия в соответствии с ветеринарным законодательством Республики Беларусь по ветеринарному обслуживанию животных, а также в целях недопущения заноса различных заболеваний, ежегодно в Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь в установленном порядке предоставляется информация о количестве трансгенных животных, находящихся на Биотехнологическом научно-экспериментальном производстве по трансгенезу животных (копия плана проведения противоэпизоотических мероприятий прилагается).

Справочно. Биотехнологическое научно-экспериментальное производство по трансгенезу животных (далее – Биопроизводство) создано на основании Акта приемки в эксплуатацию объекта, законченного возведением, реконструкцией, реставрацией, благоустройством, утвержденного Постановлением Бюро Президиума НАН Беларуси от 24 декабря 2015 года № 565 и Приказом НПЦ по животноводству от 31 декабря 2015 года № 443-к (копии документов прилагаются). Биопроизводство – научно-технологическая база для проведения разноплановых работ по получению, содержанию и тестированию животных-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека, являющаяся основной составной частью в технологической цепочке разработки и создания инновационной продукции с использованием рекомбинантного лактоферрина человека (акт приемки работ, утвержденный Председателем Президиума НАН Беларуси В.Г. Гусаковым 31.01.2014, прилагается).

В задачи Биопроизводства входят:

1. Осуществление высокотехнологичного содержания животных-продуцентов рчЛФ, обеспечивающее полноценное кормление стада, его ветеринарное обслуживание, машинное доение с получением качественного молока и сохранением его без потери свойств целевого белка (лактоферрина).

2. Проведение научно-исследовательских и практических работ по трансгенезу с целью получения первичных трансгенных животных, их изучению и размножению, созданию стад, а также изучению качества молока и его технологических свойств.

3. Проведение селекционной работы со стадом, отбор продуцентов с экономически значимым количественным показателем лактоферрина в молоке, исследование родившегося молодняка на наличие трансгена в геноме животных.

4. Осуществление работ по размножению животных-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека с применением методов искусственного осеменения, трансплантации эмбрионов, полученных *in vivo in vitro*, в том числе с использованием биоматериала (сперма, эмбрионы) западной селекции.

5. Проведение работ по получению, замораживанию и хранению спермы обычных и трансгенных козлов-производителей (банк спермы) (акт наличия криобанка спермы прилагается).

6. Обеспечение транспортировки сырья, полученного от животных-продуцентов, на переработку с целью выделения рчЛФ и его последующего эффективного использования.

7. Биопроизводство может использоваться для получения животных-продуцентов иных дефицитных лекарственных белков человека.

РУП «НПЦ НАН Беларусь по животноводству» получено Свидетельство на товарный знак «Капрабел» (Caprabel) (копия Свидетельства № 54598 от 26.05.2015 г. прилагается).

Проведены исследования молока козьего с рекомбинантным лактоферрином человека в РУП «Институт мясо-молочной промышленности» для определения показателей качества и безопасности на соответствие требованиям ТНПА и ГУ «Жодинский городской центр гигиены и эпидемиологии» по показателям КОЕ и наличия патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл. Результаты исследований показали, что представленные на испытания

образцы соответствуют требованиям безопасности действующих НПА, содержание общего количества микроорганизмов в молоке опытной и контрольной групп не достигало даже порогового значения, принятого для коровьего молока сорта «Экстра» и было меньше более чем в 17,5 раз (*копии протоколов прилагаются*).

Представленные разработчиками трансгенные козы отличаются от реципиентного организма только по одному целевому гену – hLf5, который находится под контролем бета-казеинового промотора – и по одному признаку – синтезируют в молочной железе трансгенных животных молоко с рекомбинантным лактоферрином человека. Встроенная конструкция по гену лактоферрина человека стабильно наследуется из поколения в поколение (*документация прилагается*).

Морфологических изменений у трансгенных коз по сравнению с обычными (родительскими особями) не выявлено. Внешние признаки каких-либо генетических аномалий отсутствуют. Биохимические показатели крови трансгенных животных идентичны биохимическим показателям крови нетрансгенных животных (*копии протоколов исследований проб крови прилагаются*).

3.1.7. Активность и свойства протеинов, кодируемым трансгенами.

По данным мировой литературы, рекомбинантный лактоферрин человека обладает антибактериальными, противовирусными, бактериостатическими, детоксицирующими, противовоспалительными, антиоксидантными, противоопухолевыми, иммуномодулирующими свойствами, также к основным функциям относят способность специфически связывать ионы железа и некоторые другие переходные металлы, а так же транспортную функцию. Каждые два года проводятся мировые конференции «Лактоферрин – структура, свойства и применение (www.lactoferrinconference.com)».

В ГНУ «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларусь» завершилось создание лабораторно-экспериментального участка по

выделению, очистке и лиофилизации лактоферрина человека из молока коз-продуцентов. Планируется, что после отработки технологии при выходе на оптимальный режим работы количество перерабатываемого козьего молока с рчЛФ в неделю составит 100-120 л с получением 200-250 г «белка интереса» (*копия приказа от 17 июля 2015 года № 40 прилагается*).

Белорусским государственным университетом разработаны методики выделения и очистки рчЛФ, установлена идентичность по физико-химическим свойствам рекомбинантного лактоферрина человеческому лактоферрину, полученному из грудного молока (*копия отчета НИР Белорусского государственного университета (Минск, 2010, № 059/55) прилагается*). Продолжается работа по получению рчЛФ в лабораторных условиях, изучению различных форм белка, передаче его заинтересованным для изучения активности и организации исследований, потенциальному прогнозированию направлений использования лактоферрина при учете мировых цен и тенденций.

Совместно с Центром по животноводству разработаны (*копии документов прилагаются*):

- ТУ BY 100235722.212-2012 «Молоко козье с лактоферрином человеческим рекомбинантным» (госрегистрация №034516 от 13.03.2012);
- ТУ BY 100235722.213-2013 «Лактоферрин человеческий рекомбинантный» (госрегистрация №037647 от 03.04.2013);
- ТУ BY 100235722.216-2013 «Добавка к пище биологически активная КАПЕЛЛАКТ-ИММУНО» (госрегистрация №039261 от 23.10.2013) (срок действия до 23.10.2018 года);
- ТУ BY 100235722.218-2013 «Добавка к пище биологически активная ФОРТЕЛАКТ-ИММУНО» (госрегистрация №039263 от 23.10.2013) (срок действия до 23.10.2018 года).

Институтом физиологии НАН Беларуси, Республиканским научно-практическим центром эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Институтом генетики и цитологии НАН

Беларуси изучена некоторая биологическая активность рекомбинантного лактоферрина человека (*копии актов и протоколов испытаний прилагаются*):

- акт лабораторных испытаний противовирусных свойств лактоферрина человеческого рекомбинантного;
- протокол протекторных эффектов рекомбинантного человеческого лактоферрина в отношении токсического действия эндотоксина кишечной палочки на культуру клеток *HeLa*;
- протокол влияния рекомбинантного человеческого лактоферрина на процессы пролиферации и дифференциации клеток *in vitro*;
- протокол анальгетических эффектов рекомбинантного человеческого лактоферрина;
- протокол экспериментального лечения морфо-функциональных нарушений, вызванных применением циклофосфана;
- протокол противовоспалительного действия рекомбинантного человеческого лактоферрина;
- протокол влияния рекомбинантного человеческого лактоферрина на когнитивные функции у крыс;
- протокол функциональных эффектов рекомбинантного человеческого лактоферрина;
- протокол эффекта рекомбинантного лактоферрина человека, полученного из молока коз-продуцентов, на пролиферацию и апоптоз иммортализированных клеток;

3.1.8. Цель высвобождения.

Цель высвобождения – регистрации стада трансгенных коз как источника получения рекомбинантного лактоферрина человека с молоком животных-продуцентов для создания продуктов различного назначения для оздоровления людей.

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

3.1.9. Условия принимающей среды

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

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

3.1.10. Потенциальная токсичность и аллергенность.

ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларусь» впервые показано (*копия письма от 16 ноября 2015 года № 301-01-01/642 прилагается*), что полученный из молока трансгенных коз и очищенный человеческий рекомбинантный лактоферрин, оказывает положительное воздействие на микрофлору кишечника, способствуют ее нормализации при антибиотик-ассоциированных дисбактериозах; активируют процессы метаболизма, выражющиеся в снижении уровня глюкозы, холестерина и липопроте-

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

На основе изучения физиологических эффектов лактоферрина предлагается его использование в виде биологических добавок или лекарственных форм:

- при дисбактериозах кишечника различной этиологии как средство, стабилизирующее состав микрофлоры кишечника, возвращающее к нормальным показателям обменные процессы;
- при гастритах, колитах как средство, снижающее выраженность дистрофических и некротических процессов, язвообразования в кишечнике, препятствующее развитию воспалительных процессов в стенке кишки;
- как средство, повышающее уровень метаболических процессов и способствующее снижению массы тела.

На основе разработанной модели подавления циклофосфаном злокачественного роста лимфосаркомы Плисса впервые показано, что человеческий рекомбинантный лактоферрин:

- проявляет бактерицидный эффект в отношении типичных возбудителей инфекций ЖКТ, уменьшает степень выраженности дисбиотических нарушений микробиоценозов как при наличии злокачественного новообразования, так и при действии циклофосфана;
- способствует восстановлению биохимических показателей сыворотки крови и проявляет иммуномодулирующие свойства;

– оказывает выраженный гепатопротекторный эффект, вызывающий развитие ряда компенсаторных реакций, направленных на восстановление структурно-функциональной организации органов пищеварительного тракта.

Применение лактоферрина в качестве биологически активной пищевой добавки может быть рекомендовано онкобольным перед проведением курса химиотерапии, при обнаружении опухоли, в до- и послеоперационный период.

В условиях моделирования железодефицитной анемии (использование рациона, не содержащего железа) внутрижелудочное введение рекомбинантного человеческого лактоферрина в течение 1 месяца сопровождается восстановлением содержания гемоглобина в периферической крови.

Полученные в опытах *in vivo* данные о способности рекомбинантного человеческого лактоферрина повышать эндогенные резервы организма являются основой для разработки базовых рекомендаций о целесообразности использования лактоферрина в экстремальных ситуациях и с целью повышения устойчивости к неблагоприятным факторам.

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

В этой связи потенциальная токсичность и аллергенность рекомбинантного лактоферрина человека отсутствует.

3.2. Общее описание процедуры оценки рисков и вынесение рекомендаций.

3.2.1. Оценка экологического риска.

3.2.1.1. Гипотеза. Миграция и последующая интроверсия трансгенов в дикие популяции в результате обмена генетической информацией между организмами, принадлежащими к одному или разным видам животных (переноса генов).

Оценка вероятности миграции трансгенов. Козы – животные, размножающиеся только половым путем. В условиях Республики Беларусь отсутствуют дикие сородичи данного вида животных. Ареал их распространения находится в средней Азии, Азии и Африке, в странах Центральной и Северной Америки. Также, в основном, в этих климатических зонах ведется разведение домашних коз, и располагаются крупные козоводческие и овцеводческие хозяйства.

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

Вероятность передачи трансгенов домашним козам при экспериментальном (опытном) или коммерческом разведении трансгенных коз. На территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных (д. Будагово) на протяжении последних 10 лет осуществляется разведение трансгенных животных путем скрещивания их с нетрансгенными особями без каких-либо негативных последствий для животных и окружающей среды. Биотехнологическое научно-экспериментальное производство по трансгенезу животных – охраняемая огороженная территория с обслуживающим персоналом – соответствует всем требованиям высокотехнологичного содержания животных. Вероятность передачи трансгена – **маловероятно**. **Оценка последствия – маргинальное**.

3.2.1.2. Гипотеза. Миграция и последующая интрогрессия трансгенов в результате горизонтального (обмен генетической информацией между организмами, принадлежащими к разным видам) переноса генов.

Оценка вероятности горизонтального переноса генов. Имеются единичные научные данные по межвидовой гибридизации коз и овец. Полученное при этом потомство может быть нежизнеспособным или впоследствии бесплодным. Теоретически это невозможно, так как у овцы 54 хромосомы, а у козы 60. Однако, имеются данные о гибридах с набором 57 хромосом (http://www.hij.ru/read/detail.php?ELEMENT_ID=5241).

Интрогрессия трансгена в результате горизонтального переноса генов (другие виды организмов) невозможна.

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

3.2.1.3. Гипотеза. Воздействие продукта трансгенов на организмы, не являющиеся мишенью их заданного действия.

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

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

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

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

окисления, для протекания которых необходимы ионы двухвалентного железа.

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

3.2.1.4. Гипотеза. Появление живых организмов, резистентных или толерантных к продуктам трансгенов.

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

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

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

На основании данных оценки вероятности отдельных возможных экологических рисков, суммарный экологический риск при разведении трансгенных коз, несущих ген рекомбинантного лактоферрина человека оценен, как незначительный.

3.2.2. Оценка риска здоровью человека.

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

Заявителем предполагается проведение в рамках государственных программ исследование потенциальной токсичности «белка интереса» по установленным в Республике Беларусь стандартам [2], исследование аллергенности и др. будет продолжено в связи с регистрацией стада коз-продуцентов, как источника получения рекомбинантного лактоферрина человека.

Вместе с тем, как было показано выше (подраздел 3.1.10. «Потенциальная токсичность и аллергенность»), потенциальная токсичность и аллергенность рекомбинантного лактоферрина человека отсутствует.

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия - маловероятно. Оценка последствия – незначительное, общий риск – незначительный.

Вместе с тем, как указано выше, в соответствии с принципом предосторожности необходимо проведение дальнейших исследований по изучению воздействия рекомбинантного лактоферрина человека на эмбриональное и постэмбриональное развитие лабораторных животных, проведение аллергологических тестов и др. по установленным в Республике Беларусь Инструкциям [2]. Приказом Министерства Здравоохранения Республики беларусь от 13.10.2017 г. №168а создана межведомственная рабочая группа для оценки перспектив использования рекомбинантного лактоферрина человека (*копия приказа прилагается*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате проведенной государственной экспертизы безопасности заявленного объекта – трансгенных коз со встроенным геном, кодирующим рекомбинантный лактоферрин человека, выводы которой основываются на результате анализа данных Досье, представленных Заявителем (РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству»), а также при посещении Экспертом Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, ознакомлением с технологическими вопросами содержания, кормления, разведения, доения трансгенных и нетрансгенных животных, работой обслуживающего персонала, сторожей, ветеринарных врачей, Эксперт считает, что **риск при высвобождении** заявляемых трансгенных животных в окружающую среду для регистрации стада коз-продуцентов и проведения испытаний рекомбинантного лактоферрина человека, находящегося на территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, расположенного на территории Жодинского сельского совета в д. Будагово Смолевичского района Минской области, [7], **весьма маловероятен**, так как условия разведения объекта экспертизы и сам объект соответствуют требованиям безопасности к объектам, предназначенным для регистрации и проведения испытаний непатогенных генно-инженерных организмов.

2. Заявителем разработаны меры мониторинга при разведении и выращивании трансгенных коз-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека на территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, меры по регулированию рисков, меры по содержанию в чистоте территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, утилизации навоза, выбракованных животных, меры по содержанию животных и их охране, являющиеся эффективными для преодоления в случае появления

долгосрочного неблагоприятного воздействия, которое является минимальным в настоящее время и которое не предвидится в будущем.

3. Экспертом даны рекомендации о проведении экспериментов в условиях Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, соответствующего всем требованиям безопасности.

4. Представленные Заявителем непатогенные генно-инженерные организмы – трансгенные козы со встроенным геном, кодирующим рекомбинантный лактоферрин человека, секрецируемый с молоком животных-продуцентов, содержащиеся на территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, соответствующего требованиям безопасности, **могут быть интродуцированы в окружающую среду для регистрации и проведения испытаний рекомбинантного белка в соответствии с действующим законодательством.** Методы мониторинга стада трансгенных коз по гену лактоферрина человека – документация по движению стада, ПЦР-методы к последовательностям целевого гена, ИФА-методы для количественного определения «белка интереса» в молоке, документация по наличию, хранению и передаче молока коз-продуцентов, содержащего рекомбинантный лактоферрин человека.

ВЫВОДЫ О ДОПУСТИМОСТИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ КОЗ И РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В результате проведенной государственной экспертизы безопасности непатогенных генно-инженерных организмов – трансгенных коз со встроенным геном, кодирующим рекомбинантный лактоферрин человека, установлено, что **риск при высвобождении** коз-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека, содержащихся на территории Биотехнологического научно-экспериментального производства по трансгенезу животных, в окружающую среду **весыма незначительным**, вследствие чего козы-продуценты рекомбинантного лактоферрина человека могут быть допущены для их интродукции и регистрации, а также для целей проведения соответствующих испытаний целевого белка [7].

2. Биотехнологическое научно-экспериментальное производство по трансгенезу животных, где содержатся козы-продуценты рекомбинантного лактоферрина человека, соответствуют требованиям безопасности к объектам, предназначенным для проведения высвобождения непатогенных генно-инженерных организмов и их регистрации [7].

3. В соответствии с принципом предосторожности, необходимо проведение дальнейших исследований по изучению безопасности и биологической активности рекомбинантного лактоферрина человека в соответствии с действующими законодательными нормативными актами и Инструкциям Республике Беларусь с целью создания продуктов различного направления для оздоровления населения страны.

Список литературы

1. Постановление Совета Министров Республики Беларусь «Об утверждении Положений о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения, и выдачи разрешений на высвобождение непатогенных генно-инженерных организмов в окружающую среду для проведения испытаний» от 8 сентября 2006 г. № 1160 // Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь. – 2006 – № 151. – Рег. № 5/22922.
2. Порядок проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека: Инструкция по применению / В.Г.Цыганков [и др.] // Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 25 августа 2006. – Регистрационный №076-0806. – Минск, 2006. – 15 с.
3. Мозгова Г.В. Оценка рисков воздействия ГМО на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия, с учетом рисков для здоровья человека: методические рекомендации. Мин: Право и экономика, 2014, 58с.
4. Consensus document on the biology of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (potato). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 8. – Режим доступа: <http://www.oecd.org/science/biotrack/46815598.pdf>
5. Руководство по оценке рисков в отношении живых измененных организмов» // Электронный ресурс. Режим доступа: <http://www.cbd.int/doc/meetings/bs/mop-06/official/mop-06-13-add1-ru.pdf>.
6. Механизм посредничества по биобезопасности. База данных: ЖИО, гены и организмы – Режим доступа: <https://bch.cbd.int/database/organisms/>.
7. Постановления Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь «О требованиях безопасности к опытным полям и другим объектам, предназначенным для проведения испытаний непатогенных генно-инженерных организмов при их первом высвобождении

в окружающую среду» от 29 августа 2006 г. № 56 // Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь.-2006.-№ 151.-Рег.№ 8/14993.

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

Минина Н.Г.

Подпись Н.Г. Мининой удостоверяю:
Начальник отдела кадров

Мельник Л.М.

