

ГМО и риски их использования

Куликов А.М

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской Академии Наук, Москва

Введение

Биотехнологические проекты давно перешагнули из области научного знания в область промышленно-коммерческого использования. Научно-технический прогресс нашел применение результатам фундаментальных биологических и молекулярно-биологических исследований в сельском хозяйстве, пищевой промышленности и фармацевтике, медицине и приборостроении. Особенно широко в последнее время эксплуатируются достижения генетики и молекулярной биологии в сфере производства новых сортов сельскохозяйственных растений и пород животных, обладающих разнообразными новыми признаками, отсутствовавшими у родительских видов/сортов. Быстрое и массовое производство таких сортов, легкость и научная предсказуемость приобретения ими заданных свойств привели к их широкому использованию. Так в настоящий момент посевы ГМО (генетически модифицированных организмов) во всем мире занимают площади более 67.7 млн. гектар. И, вместе с тем, в последние годы резко обозначился вопрос – насколько безопасны данные технологии, насколько адекватно соблюдаются Международные руководящие принципы техники безопасности ЮНЕП в области биотехнологии, принятые еще в 1995 г.

Аргументы сторонников соблюдения принципов предосторожности заставляют в настоящий момент правительства многих стран Европейского союза, Азии и Африки вносить коррективы в сельскохозяйственную политику и отказываться от производства ряда сортов ГМО. В мировой литературе развернулась острая дискуссия об обоснованности декларируемых рисков применения ГМО. Многие аргументы сторонников соблюдения принципов предосторожности получили экспериментальное подтверждение (см. обзоры М.С.Соколова с соавт. (1), М Джованнетти (2)) Цель настоящего обзора – попытаться дать объективную оценку в первую очередь пищевых рисков.

1. Классификация рисков

Встраивание в геном организма-хозяина новых конструкций имеет цель получить новый признак, недостижимый для данного организма путем

селекции или требующий годы работы селекционеров. Но вместе с приобретением такого признака организм приобретает целый набор новых качеств, опосредованных как плейотропным действием нового белка, так и свойствами самой встроеной конструкции, в том числе ее нестабильностью и регуляторным действием на соседние гены. Все нежелательные явления и события, происходящие при возделывании и потреблении ГМО, можно объединить в три группы: пищевые, экологические и агротехнические риски.

1.1. Пищевые риски

1. Непосредственное действие токсичных и аллергенных трансгенных белков ГМО.
2. Риски, опосредованные плейотропным действием трансгенных белков на метаболизм растений.
3. Риски, опосредованные накоплением гербицидов и их метаболитов в устойчивых сортах и видах сельскохозяйственных растений.
4. Риски горизонтального переноса трансгенных конструкций, в первую очередь в геном симбионтов для человека и животных бактерий (*E. coli*, *Lactobacillus (acidophilus, bifidus, bulgaricus, caucasicus)*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* и др.).

1.2 Экологические риски

1. Снижение сортового разнообразия сельскохозяйственных культур вследствие массового применения ГМО, полученных из ограниченного набора родительских сортов.
2. Неконтролируемый перенос конструкций, особенно определяющих различные типы устойчивости к пестицидам, вредителям и болезням растений, вследствие переопыления с дикорастущими родственными и предковыми видами. В связи с этим снижение биоразнообразия дикорастущих предковых форм культурных растений и формирование «суперсорняков».
3. Риски неконтролируемого горизонтального переноса конструкций в ризосферную микрофлору.
4. Негативное влияние на биоразнообразие через поражение токсичными трансгенными белками нецелевых насекомых и почвенной микрофлоры и нарушении трофических цепей.
5. Риски быстрого появления устойчивости к используемым трансгенным токсинам у насекомых-фитофагов, бактерий, грибов и других вредителей, под действием отбора на признак устойчивости, высокоэффективного для этих организмов.
6. Риски появления новых, более патогенных штаммов фитовирусов, при взаимодействии фитовирусов с трансгенными конструкциями, проявляющими локальную нестабильность в геноме растения-хозяина и тем самым являющимися наиболее вероятной мишенью для рекомбинации с вирусной ДНК.

1.3. Агротехнические риски

1. Риски непредсказуемых изменений нецелевых свойств и признаков модифицированных сортов, связанные с плейотропным действием введенного гена. Например, снижение устойчивости к патогенам при хранении и устойчивости к критическим температурам при вегетации у сортов, устойчивых к насекомым-вредителям.
2. Риски отсроченного изменения свойств, через несколько поколений, связанные с адаптацией нового гена генома и с проявлением как новых плейотропных свойств, так и изменением уже декларированных.
3. Неэффективность трансгенной устойчивости к вредителям через несколько лет массового использования данного сорта.
4. Возможность использования производителями терминальных технологий для монополизации производства семенного материала.

2. История вопроса

Риски, связанные с производством биотехнологической продукции, начали обсуждаться в научной литературе с 1983 г. (3, 4). К середине 80-х г. в развитых странах вырабатывается государственная политика по биотехнологии. Так, например, в США контроль за использованием ГМО находится в юрисдикции трех агентств, американского Агентства по охране окружающей среды, американского Министерства сельского хозяйства, и американского Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов. Существует так же координационный комитет, осуществляющий согласованную работу всех трех ведомств по данному вопросу. Цели, задачи и законы, регламентирующие деятельность этого комитета, были опубликованы в 1986 г. (5).

Практические оценки влияния ГМО на организм при их пищевом потреблении появились недавно. Первые широкоизвестные работы по пищевым рискам ГМО принадлежат А.Пуштаи, работавшему в Исследовательском Институте Рауэтт, Великобритания (6–8) и стали предметом широко известной дискуссии 1999–2000 гг.

Однако возможность формирования выраженного иммунного ответа на трансгенный белок, являющийся аллергеном и потребляемый в составе растительного продукта, были известны и ранее. Например, за три года до начала этой дискуссии, Х.С.Мэйсон с соавт. показали высокий иммунный ответ у мышей на трансгенный картофель, модифицированный капсидным вирусным белком (9). Поскольку работа была посвящена модели оральной иммунизации животных белками, продуцируемыми в трансгенных системах, результаты этой и подобных работ остались незамеченными для диетологов и аллергологов. Тем не менее, работы, посвященные механизмам иммунного ответа человека на лектины, в частности хлебного дерева и сои, связывающихся с иммуноглобулином IgA1 (10) и приводящим к слипанию эритроцитов (11), были хорошо известны.

А.Пуштаи показал влияние трансгенного картофеля, модифицированного лектином подснежника, на гистологическом уровне – на состояние

слизистой оболочки кишечника, частичную атрофию печени и изменение тимуса, и на физиологическом – на относительный вес внутренних органов крыс, содержащихся 9 месяцев на соответствующей диете, по сравнению с контрольными, питавшимися нетрансформированным картофелем. На страницах «BINAS News» опубликована полемика 1999 года, как критика и опровержение результатов А.Пуштаи, например, Д.Гейтхаусом, Ф.Дали, Р.Д.Брауном, так и позиция сторонников точки зрения А.Пуштаи, Б.Мифлина, Ж.Рифкина и др. (12). Тогда же Е.Дришш и Т.Бег-Хансен публикуют меморандум, поддержавший А.Пуштаи и основанный на экспертной оценке его результатов группой из 20-ти (помимо авторов меморандума) ученых. Собственно, результаты Пуштаи были представлены в научной прессе после проведения экспериментов и подтверждения заявленных результатов сотрудником Абердинского Университета, С.В.Ивенном (5,7).

Позднее появляются работы, проведенные на культурах клеток крови человека и колоректальной карциномы, подтверждающие результаты А.Пуштаи (13, 14), начинают разрабатываться методики, посвященные оценке пищевых рисков, связанных с действием потенциальных аллергенов (15, 16). В обзорах по применению ГМО, авторы, в том числе и первоначально критиковавшие А.Пуштаи, указывают на необходимость строгой оценки пищевых и экологических рисков (17, 18).

Показательна история с сортом кукурузы StarLink®, скандал вокруг которой разгорелся в 2000–2001 гг. Эта кукуруза, трансформированная белком-токсинам *Bacillus thuringiensis* Cry9C, был разрешен американским Агентством по охране окружающей среды к использованию с ограничениями, как кормовая культура в 1998 г. Ограничение в использовании было вызвано результатами тестирования белка Cry9C на устойчивость к перевариванию пепсином и к нагреванию, показавшими устойчивость выше минимально допустимой (19). В результате неконтролируемого переопыления с пищевыми сортами, урожай из гибридных растений был использован для получения пищевых продуктов. В 2000 г. фирма «Авентис» предоставила материалы, подтверждающие возможность использования сорта StarLink® в пищевых целях (20). Данные экспериментов по оценке токсичности и аллергенности модифицированного продукта всего на 10 крысах, якобы свидетельствовали о его безопасности. В пользу своей точки зрения «Авентис» указывала на 30-летний опыт применения белка Cry9C в США в качестве инсектицида, и отсутствие данных в научной литературе по токсичному и аллергенному действию белка Cry9C. Ряд публикаций, посвященных оценке аллергенности и других возможных воздействий на организм подопытных животных белками Cry9C и родственного ему Cry1Ab, показали отсутствие патогенного действия данных белков в составе ГМО (21–23). Тем не менее, существующие данные по аллергенности токсинов *B. thuringiensis* (24) заставили провести дополнительные исследования аллергенности Cry-белков. Были получены данные, свидетельствующие о выработке антител и, соответственно, формировании аллергичной реакции на белок Cry1Ac (25), и ограниченности методов определения иммунных реакций (26), в частности теста ELISA, не способного оценивать аллергенность гликозилированных эпитопов белков (27). Гликозилирование – особенность многих аллергенов пищи (28),

и известно, что Cry-белки имеют потенциально гликозилируемые участки (29), и взаимодействуют с мембранными аминопептидазами, что свидетельствует о наличии у Cry-белков гликозил-фосфатидилинозитольного мембранного якоря (30). Эти данные подтверждают первоначально осторожную оценку в применимости сорта StarLink® (19, 31) и оправдывают постоянно ведущийся в США мониторинг сортов кукурузы и производимых из них пищевых продуктов на присутствие белка Cry9C (32).

3. Свойства белков, обладающих бактерицидной, фунгицидной и инсектицидной активностью, используемых для трансформации сортов сельскохозяйственных растений

Как правило, токсичным или аллергическим действием обладают трансгенные белки, обеспечивающие устойчивость растений-реципиентов к поражению различными видами насекомых, грибковым и бактериальным заболеваниям. Устойчивость обеспечивается действием белков, обладающих набором специфических свойств. Среди них:

- ферментативная активность к наиболее мажорным компонентам клеточной стенки целевых организмов (например, хитиназы для насекомых и грибов),
- лектиновая активность (лектины и арселины), опосредующая связывание с определенными рецепторами и мембранными гликопротеинами и реакции гликозилирования и приводящая к слипанию клеток желудочно-кишечного тракта и нарушению работы пищеварительных ферментов насекомых – вредителей,
- ингибирование рибосомальных белков (RIPs-белки), приводящее к нарушению синтеза новых белков клетками, контактирующими с RIPs,
- ингибирование функций пищеварительных протеаз и амилаз целевых организмов,
- формирование сквозных каналов в клеточной мембране (Cry-протоксин *Bacillus thuringiensis*, активизирующиеся после протеолитического расщепления), приводящее к лизису атакованных данными полипептидами клеток,
- проникновение в виде фрагментов исходного белка через стенки кишечника и связывание с ганглиозидами клеточных мембран (растительные протоксин: уреазы и канатоксины), что приводит к экзоцитозу клеток различных типов, разрушению кровяных пластинок и сопровождается гибелью целевого организма.

Табл.1 Действие некоторых растительных и бактериальных токсинов на целевые организмы и человека (19–30, 33–72).

Белок		Целевые организмы (семейства)	Действие на млекопитающих
Lectins	Man	Coleoptera, Lepidoptera, Homoptera, Hymenoptera	Противоречивые данные
	GlcNac	Coleoptera, Lepidoptera, Homoptera, Diptera	Токсичен
	GalNac/ Gal	Coleoptera, Lepidoptera, Homoptera, Diptera	Токсичен
RIPs		Coleoptera, Bacteria, Fungus, Viruses	Токсичен
Arcelins		Coleoptera	Не изучен
Serine protease inhibitors		Coleoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Hymenoptera	Токсичен
Cystein protease inhibitors		Coleoptera, Hemiptera	Нет эффекта
a-Amylase inhibitors		Coleoptera, Lepidoptera	Токсичен
Modified storage proteins		Coleoptera	Не изучен
Chitinase		Lepidoptera, Bacteria, Fungus	Аллерген
Ureases (including Canatoxin-like)		Coleoptera, Hemiptera	Противоречивые данные
<i>Bt</i> toxins		Coleoptera, Lepidoptera, Homoptera, Diptera, Hymenoptera	Противоречивые данные
Anionic peroxidase		Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera	Лигнин-токсичные метаболиты

Устойчивость к патогенам и вредителям формируется благодаря экспрессии генов этих белков под действием тканеспецифичных промоторов в целевых тканях и органах растения. В настоящий момент практически все перечисленные классы белков используются при создании коммерческих сортов пищевых и кормовых растений.

4. Свойства трансгенных белков, обладающих инсектицидной активностью.

Данные, приведенные в табл.1, свидетельствуют о значительной токсичности или аллергенности представителей большинства указанных классов белков, при их введении перорально. Однако часть из них присутствует и в норме в различных видах употребляемой растительной продукции. Проявление токсичных свойств таких белков будет опосредовано тканевой спецификой

их экспрессии и концентрацией самих белков или синтезируемых при их участии продуктов метаболизма, например, ферментов биосинтеза гликоалкалоидов (в частности, соланина) у пасленовых. Для оценки пищевых рисков при создании устойчивых к вредителям сортов необходимо определить допустимую степень воздействия этих белков на организм, используя традиционные сорта пищевых культур – источников белков этих классов в качестве контроля. Так как число оцениваемых параметров потенциально очень велико, принципиальную роль в таких оценках играет информация о механизмах возможных влияний этих белков на человека и животных.

Уреазы редко используются для трансформации растений (32а), так как для млекопитающих хорошо известен токсичный эффект ряда белков этого класса, выраженный при инъекционном введении белка. Вообще все белки этого класса имеют сходный набор ферментативных и лектиновых функций (33, 34). Известно, что канатоксины и уреазы не стойки к кислой среде, и поэтому при попадании с пищей в пищеварительный тракт разрушаются еще в желудке (35). Белки перевариваются в составе растительной ткани, где они содержатся в строго определенных количествах, причем все этапы созревания, транспортировки и запасаения белка идут в соответствии с естественными программами регуляции функций клетки. Как ведут себя трансгенные белки с повышенной экспрессией, насколько они доступны действию желудочного сока в составе трансгенной растительной ткани, необходимо выяснять в каждом конкретном случае. Тем более, что значительное увеличение экспрессии уреазы в трансгенных растениях (за счет плеiotропных эффектов – см. ниже) показано, например, для коммерциализируемого сорта сои 30-4-2, устойчивого к пестициду Раундап (36). Свидетельством важности проверки активности уреаз в трансгенных сортах являются также данные о снижении индекса перевариваемости корма бройлерными цыплятами при повышении активности соевых уреаз в нем, даже не смотря на снижение активности трипсинового ингибитора (37). Неясно также, как изменяется кругооборот азота в трансгенном растении и каковы последствия этих изменений для разных биоактивных метаболитов, так как механизмы индукции активности уреаз растений пока не выяснены (38).

Ингибиторы сериновых протеаз обладают множественными функциями. Выполняя у растений роль запасяющих белков, белков-регуляторов апоптоза и внутриклеточного протеолиза, они дополнительно способны блокировать ферменты пищеварительного тракта насекомых, действуя как неспецифичные субстраты. Пищеварительные ферменты насекомых, в частности их функциональные домены, сохранили высокое структурное сходство с подобными ферментами позвоночных, в том числе и человека, что приводит к сходному действию на них используемых растительных белков-ингибиторов (33, 39–43). Длительное воздействие на крыс соевыми ингибиторами протеиназ, в качестве пищевой добавки, или муки сырой сои, приводило к гипертрофии и гиперплазии поджелудочной железы, вплоть до неопластических новообразований и карциномы. Термальная обработка белков и пищи предотвращает эти эффекты (44). Подобное действие ингибиторов эндопептидаз сои на поджелудочную железу отмечено и для человека (45).

Совершенно отсутствуют работы по трансгенным сортам, модифицированным ингибиторами протеаз, с проведенной оценкой пищевых рисков, связанных с употреблением сырой и переработанной продукции. Тем более, что модификация подобными белками овощных культур, употребляемых в сыром виде, несет непосредственную опасность для потребителя. Здесь же следует отметить, что предлагается использовать в качестве трансгенных белков ингибиторы протеиназ млекопитающих, в частности белка-ингибитора бычьего трипсина, обладающего выраженным инсектицидным действием (46). Однако эффект длительного воздействия этих белков в составе трансгенной пищи вообще не изучен.

Ряд растительных ингибиторов альфа-амилазы формируют комплексы с ферментами слюнных и поджелудочной желез и достигают максимальной активности при температуре от 35 до 50°C (47, 48). Некоторые ингибиторы альфа-амилазы хорошо известны как сильные аллергены, например, тетрамерный ингибитор амилазы пшеницы (49). В работах, посвященных свойствам белков этого класса и их прикладному использованию (50, 51), перечислено значительное количество токсичных и аллергенных растительных ингибиторов альфа-амилазы и указана необходимость строгих оценок их пищевых рисков.

Физиологическое действие арселинов на млекопитающих не изучено, но известно, что они близки по структуре и свойствам к фитогемагглютининовым лектинам и ингибиторам альфа-амилазы (52), что предполагает сходные пищевые риски.

RIP's белки, или ингибиторы рибосомальных белков, имеют узкую видовую специфичность к различным рибосомальным белкам. Они удаляют консервативный аденин из 28S субъединицы РНК, что препятствует сборке рибосом и приводит к гибели клеток. В силу своей видовой специфичности можно подобрать белки, обладающими инсектицидными, фунгицидными или бактерицидными свойствами (53, 54). Растения, трансформированные такими белками под специфическими вирусными промоторами, устойчивы к вирусным инфекциям, супрессируя выработку вирусных белков в инфицированных клетках (55). Но не стоит забывать, что рицин, один из сильнейших ядов, относится именно к этой группе белков. Другой пример: циннамомин, формирующий устойчивость трансгенных растений к личинкам насекомых, специфичен к 28S РНК крысы (56). Поскольку инактивация рибосом происходит необратимо, даже слабая аффинность RIP's к рибосомальным белкам млекопитающих будет приводить к эффекту накопления. Поэтому проверка безопасности таких белков, выделенных в составе экстракта из трансгенного растения, должна проводиться длительное время, в том числе и на культурах человеческих клеток (что не делается).

Лектины были одними из первых трансгенов при формировании устойчивости к насекомым. Связываясь с гликанами на поверхности клетки, они приводят к слипанию клеток и нарушению физиологических функций организма. С этим свойством растительных лектинов связана 40-летняя история их применения в качестве цитотоксических препаратов при химиотерапии раковых заболеваний (57, 58). О формировании иммунного ответа на не-

которые трансгенные лектины мы упомянули в разделе «история вопроса» (6–8, 10, 11). Высокие пищевые риски при использовании лектинов были подтверждены и в других исследованиях. Так, лектин нарцисса, обладающий ярко выраженными свойствами инсектицида, является мутагеном, причем наиболее сильное мутагенное действие показано на культурах лимфоцитов человеческих эмбрионов и из периферического кровотока детей раннего постнатального периода развития (59). Эти данные показывают опасность использования данного лектина и близких к нему в первую очередь для наиболее молодой части человеческой популяции.

Проводимые работы с трансгенными инсектицидными лектинами бразильского ореха *Bertholletia excelsa* были прекращены в связи с их высокой аллергенностью (60, 61). Хитин-связывающие лектины из проростков пшеницы и фасоли обладают огромным инсектицидным потенциалом, но при этом токсичны для млекопитающих. Поэтому первоначально полученные трансгенные сорта кукурузы с широким спектром устойчивости к вредителям оказалось невозможным использовать в пищевых целях (62).

Для трансформации растений ферментами, разрушающими мажорные компоненты клеточной стенки вредителей, обычно хитина, используют растительные хитиназы, и хитиназы бактерий и насекомых (62, 63). Трансгенные конструкции на основе хитиназ сейчас очень популярны: хитиназами модифицированы различные сорта риса (64–66), картофеля (67, 68), пшеницы (69) и других культур. В то же время хорошо известны так называемые «латексные» или «банановые» аллергии, главным аллергеном в которых выступают хитиназы авокадо, бананов, каштана (70, 71). Хотя показана высокая аллергенность только хитиназ 1-го класса, возможная модификация трансгенного белка и близость структур хитиназ разных классов требует тщательной проверки на аллергенность всех трансгенных по хитиназам сортов (что не сделано).

Устойчивость к болезням может также индуцироваться не только белками, но и продуктами обмена веществ – вторичными метаболитами. Сорта кукурузы, табака и томатов с увеличенной экспрессией кислых пероксидаз вырабатывают в листьях повышенное содержание лигнина, препятствующего поражению растений насекомыми-вредителями (72). Продуктами разложения лигнина являются токсичные и мутагенные фенолы и метанол. Поэтому увеличение содержания лигнина в силосной массе, плодах или листьях табака представляет прямую опасность. Картофель, устойчивый к ряду болезней, модифицированный пероксидазой и кислой хитиназой, помимо лигнина содержит сублетальное (для растения) количество перекисных радикалов (68). При этом не изучено, как будут модифицироваться в этих условиях алкалоиды, которыми богаты пасленовые (см. Раздел «Плейотропные влияния трансгенных белков»).

В заключение этого раздела – об аллергиях. Аллергия на продукты питания – явление достаточно распространенное и неуклонно растущее среди населения развитых стран. Это связано, в первую очередь, с неблагоприятной экологической обстановкой, изменением традиционного рациона питания,

к которому каждый народ адаптировался на протяжении многих веков, и современными технологиями пищевой промышленности, приводящими к повышенному содержанию в пище различных ксенобиотиков. И в этом смысле характеристикам трансгенных белков, обладающих инсектицидной активностью, необходимо уделить пристальное внимание, поскольку примерно половина патогенез-зависимых белков растений являются аллергенами (73). Повышение их содержания в устойчивых к заболеваниям сортах растений имеет прямой риск повышения аллергенности продуктов питания, изготовленных на основе этих сортов. Детские аллергии – экссудативный диатез и нейродермит, вообще имеют особый статус в аллергологии. Иммунная система человека окончательно формируется только к 12–14 годам, а кишечная флора, адаптированная к «взрослой» пище – к 3-м годам. Слизистая оболочка пищеварительного тракта ребенка обладает повышенной проницаемостью, как для питательных веществ, так и для патогенов. Это компенсируется высоким содержанием разнообразных иммуноглобулинов и лимфоцитов в крови и слизистой оболочке кишечника ребенка. Детский организм остро реагирует на «чужие» белки, к которым он не адаптирован, отсюда – особенно высокая чувствительность к аллергенам. Исходя из многочисленных наблюдений, фармакологи рекомендовали полностью исключить ГМО из состава детского питания (74). Начиная с 2004 года в странах Европейского Союза использование ГМО в продуктах детского питания, предназначенного для детей до 4-х лет, полностью запрещено.

5. Пищевые риски, связанные с устойчивостью ГМО к гербицидам.

Устойчивость возделываемых сортов к действию пестицидов дает большой экономический эффект – ручная или машинная прополка заменяется быстрой и сравнительно дешевой обработкой пестицидами, приводящей к гибели сорняков. Эта практика ведет к увеличению масштабов использования гербицидов, и, соответственно их воздействия на окружающую среду, а также вызывает быстрый отбор видов-сорняков, обладающих повышенной устойчивостью к применяемым пестицидам (1, 75).

Для придания растению повышенной устойчивости к такому распространённому гербициду, как глифосат, используют конструкции на основе одного из двух генов: EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) и GOX (глифосат оксидоредуктаза). Сами по себе эти белки не являются ни аллергенами, ни токсинами.

Для оценки безопасности пищевого применения таких сортов, необходимо знать: какова способность таких сортов к накоплению ядовитых для человека и животных инсектицидов, и не происходит ли накопления других ядовитых метаболитов или аллергенов под действием плейотропных эффектов трансгенных конструкций. Следует иметь в виду, что практически все пестициды токсичны для человека. Глифосат, например, является канцерогеном, вызывающая лимфому (76). Обычно в работах, посвященных получению устойчивых к гербицидам сортов и их свойствам, указывают на отсутствие негативных

свойств, подтвержденных многочисленными проверками (77). Действительно, исходя из правил получения и дальнейшей валидации трансгенной культуры, оценивая перевариваемость белков и состав метаболитов нового сорта, учитывается количество встроенных конструкций и нецелевые изменения свойств сорта, отбираются только стабильные трансформанты. Сотрудниками фирмы «Монсанто» было показано, например, хорошее соответствие состава модифицированной сои, устойчивой к глифосату, и родительского традиционного сорта (78). Но в литературе имеются данные, что при обработке глифосатом устойчивых к нему сортов сахарной свеклы, растения накапливают токсичные метаболиты глифосата (79). Более того, показана способность репродуктивных тканей (!) хлопчатника, устойчивого к глифосату, к очень высокому накоплению этого гербицида – от 0,14 до 0,48 мг/г (80). Это чрезвычайно важно, так как такие дозы при употреблении в пищу будут смертельными (допустимые дозы остаточного глифосата и его токсичных метаболитов в пищевых продуктах в США – 0,02 мг/кг сухого вещества). К сожалению, информация по анализу остаточных концентраций гербицидов в устойчивых сортах в сопровождающих документах и описаниях отсутствует. Насколько широко распространено это свойство устойчивых к глифосату сортов, какова тканевая специфичность накопления глифосата – неизвестно.

Другим эффективным и распространенным гербицидом является атра-зин. Устойчивость картофеля и табака к его действию обеспечивается встраиванием в геном цитохрома CYP1A1, представителя класса P450 цитохромов (81, 82). Вместе с тем, известно немало работ, посвященных канцерогенным, иммунотоксичным и эмбриотоксичным свойствам этого вещества (например 83, 84). И в этом случае вопрос о накоплении этого гербицида в устойчивых к нему сортах не привлекает внимания разработчиков. А пищевой риск такого накопления огромен.

Риски, связанные с плейотропными влияниями трансгенных белков и конструкций, определяющих устойчивость к гербицидам, мы рассмотрим в следующем разделе.

6. Модификация метаболизма и плейотропные влияния трансгенных белков.

Пищевые риски могут быть связаны с действием плейотропных эффектов как самих трансгенных белков, так и регуляторным действием встроенных конструкций. Выше уже упоминалось усиление активности уреаз в трансгенном сорте сои, устойчивой к гербициду раундап (36). Несмотря на правила валидации трансгенных сортов, обнаружить нецелевые изменения метаболизма, активности различных белков, включая лектины и фитогормоны, не просто – исследователь не знает точно, что проверять. Изменения могут быть не количественными, а качественными, например, состава минорных фракций гликоалкалоидов, которые совместно могут обладать многократным синергетическим усилением мембранолитической активности. Существуют ли объективные основания для таких опасений? С конца 90-х годов проводилось изучение биосинтеза флавоноидов, природных антиоксидантов,

участвующих в защите тканей растения от негативных последствий фотохимических реакций, на модели трансгенных растений (85). В настоящий момент существуют трансгенные сорта помидоров (86) и картофеля (87) с усиленной продукцией флавоноидов. Принято считать, что повышенное содержание флавоноидов на организм человека положительно. Но такое изменение метаболизма растений может приводить к росту пищевых рисков. Так, масс-спектрофотометрический анализ трансгенного картофеля показал резкое изменение состава минорных фракций гликоалкалоидов (87). Для оценки пищевых рисков в таких случаях необходимо проведение долговременных тестов, которые пока не проводятся.

Проводя работы по созданию трансгенных растений с устойчивостью к стрессующим факторам и для увеличения урожайности, используют ключевой фермент синтеза полиаминов – аргинин декарбоксилазу (88). Результатом гиперэкспрессии этого фермента у трансгенных табака и риса является повышенное содержание агматина – его непосредственного метаболита, и в ряде случаев – рост концентрации вторичных метаболитов путрисцина, спермидина и спермина (88, 89). При этом как агматин, так и его производные, являются биологически активными веществами, способными взаимодействовать с адренэргическими, имидазолиновыми и глутаматными рецепторами, выступая для организма человека в роли как нейромедиаторов, так и активаторов митоза и способствуя опухолеобразованию (90, 91). Будучи небелковой природы, эти вещества легко усваиваются организмом. Адекватность используемых в настоящий момент тестов для проверки таких рисков сомнительна.

Не обойдены вниманием производителей и цитокинины – растительные гормоны, производные пурина. Сорта томатов, модифицированных генами изопентилтрансферазы и бактериальной фитоэнсинтазы, обладают повышенной продуктивностью (92, 93). Однако сложнейшая регуляторная сеть, включаемая действием цитокининов в организме растения и затрагивающая как метаболизм, так и разнообразные тканевые и ростовые процессы, только изучается (94), и предсказать все эффекты от такого рода изменений пока невозможно. Но показано, что содержание фитогормона зеатина пуринового ряда и его производных растет (94а). Известны сильнеешие эффекты этих гормонов на клетки человека и млекопитающих различных типов (95, 96), за счет модуляции Ras – опосредованных клеточных сигнальных каскадов (97), ацетилхолинэстеразной активности (98), активности пуринорецепторов (99). Пока допустимые безопасные концентрации используемых фитогормонов в растительных продуктах не будут определены, остается высоко вероятным пищевой риск с использованием этих технологий.

У сорта пшеницы, модифицированного кислотной глюконазой и хитиназой, наблюдалась гиперэкспрессия специфической фенилаланин-аммоний лиазы и связанное с этим накопление салициловой кислоты, приводящее к некрозам растительной ткани (100). Сама салициловая кислота обладает массой полезных свойств, и в модифицированном виде хорошо известна как аспирин, вот только в качестве пищевой добавки к хлебу или макаронным изделиям она может не подойти.

7. Риски производства фармацевтических препаратов в ГМО.

В 2003 г. возник термин «Фармагеддон» (101). Основанием служит большое число сортов риса и кукурузы, разрабатываемых и культивируемых различными биотехнологическими компаниями, несущих биологически активные вещества, в том числе: вакцины, гормоны роста, факторы свертывания крови, индустриальные ферменты, человеческие антитела, контрацептивные белки, подавляющие иммунитет цитокины и вызывающие аборт препараты. Существуют (101, 102) следующие риски неконтролируемого использования такой продукции:

- угроза переопыления и неконтролируемого распространения таких сортов среди пищевых;
- риск неконтролируемого экспонирования пищевых вакцин беременным;
- распространение вакцин и биоактивных веществ, выделяющихся в естественных условиях из растительных остатков через почвенные и поверхностные воды.

Насколько обоснованы эти риски?

При переносе пыльцы растений ветром или насекомыми на места произрастания других сортов этого же вида, а также при случайном смешивании сортового материала, образуются гибридные растения, несущие признаки обоих сортов. Пример с сортом кукурузы StarLink® – не единственное подтверждение реальности таких рисков. В Мексике и Гватемале дикорастущие виды кукурузы уже плотно насыщены трансгенными вставками, за счет переопыления с возделываемыми культурными сортами (1). В то же самое время, на рисовых полях Калифорнии среди пищевых сортов риса проводятся открытые полевые испытания сортов риса, несущего человеческие белки лактоферрин и лизоцим, используемые в фармакологии при энзимотерапии. Американская компания «Эпицит» недавно сообщила о создании и испытаниях сорта кукурузы, вырабатывающего человеческие антитела на поверхностные белки спермы, с целью получения противозачаточных препаратов (102). Неконтролируемое переопыление такого сорта с пищевыми может привести к серьезным демографическим последствиям на территориях, где производится подобная продукция.

Неконтролируемое распространение вакцин в составе пищевых продуктов обладает не меньшим риском. В ходе эмбриогенеза формирующаяся иммунная система «учится» распознавать «свои» белки, не путая их в дальнейшем с «чужими». Белки, экспонируемые клеткам иммунной системы во время эмбриогенеза, запоминаются как «свои». Если белок вакцины в это время попадет в кровотоки эмбриона, то родившийся ребенок не сможет вырабатывать иммунитет к данному заболеванию, всегда распознавая данную бактерию или вирус как «свой».

При сборе урожая любой пищевой культуры огромная масса растительных остатков – листы, стебли и корни, остается на полях. Вероятность

прямого распространения в почвенных водах белков, входящих в состав растений, низка, хотя значительно выше вероятность горизонтального переноса трансгенных конструкций в почвенных и других бактериях (см. далее). Но, кроме этого, существует еще один аспект рисков – это неконтролируемая вакцинация птиц и млекопитающих, обитающих в данной местности. Если трансгенные вакцины направлены против бактерий и вирусов, имеющих местных животных в качестве переносчиков (или бактерий, родственных человеческим болезнетворным бактериям), то такая вакцинация спровоцирует мощный отбор среди патогенов и формирование суперинфекций.

8. Риски горизонтального переноса трансгенных конструкций.

Горизонтальный перенос генов широко известен в царстве бактерий. В ходе эволюции обмен генами осуществлялся как между ними, так и между бактериями и эукариотами. Способность обмениваться участками генома бактерии сохраняют до сих пор. И это свойство бактерий имеет прямое отношение к экологическим и пищевым рискам использования ГМО. Нахождение в желудочно-кишечном тракте в составе пищи собственно ферментов, использующих антибиотик как субстрат, практически безопасно для человека и животных. Ферментам необходимы строго определенные условия для проявления активности, поэтому белки, осуществляющие внутриклеточный метаболизм, функционировать будут только в составе живой клетки.

Вероятность встраивания трансгенной конструкции из растения в геном млекопитающих и человека ничтожно мала. Следует учитывать, что клетки высших эукариот имеют несколько изолирующих барьеров, эффективно препятствующих горизонтальному переносу. Даже в случае такого переноса клетка, как правило не размножается, находясь в терминальной стадии дифференцировки. Перенос конструкции в половые клетки вообще невероятен, учитывая гемато-тестикулярный барьер, не проницаемый для крупных молекул. Но не следует забывать, что человек имеет эндосимбионтов, в частности, кишечную бактериальную флору. Известно, что бактерии способны к трансформации как кольцевыми, так и линейными формами ДНК с инвертированными повторами (103). Фрагменты трансгенной ДНК в содержимом кишечника, крови и молоке животных, питающихся ГМО (у коров – 104, у свиней – 105). При этом, в соответствии с часто применяемой методикой отбора трансгенных конструкций под действием антибиотиков, эти фрагменты несут репортерные гены устойчивости к антибиотикам в качестве маркерных последовательностей (77, 106). Эти гены могут быть как молчащими, так и нормально экспрессирующимися. В любом случае, трансформация ими симбионтных или патогенных бактерий может «включить» их уже в составе бактериального генома, например, путем рекомбинации и возникновения т.н. химерных белков, обладающих ферментативной активностью по отношению к антибиотику. Это ведет к формированию устойчивости к антибиотикам или самих симбионтных бактерий, или патогенной флоры. Результатом использования антибиотика при заболевании будет быстрый отбор бактерий, устойчивых к нему, и антибиотик либо начнет

перерабатываться непосредственно в кишечнике, не достигая целевых патогенных бактерий, либо не будет оказывать влияния на резистентные к нему патогены. Поскольку основные бактерии-симбионты живут в толстой кишке, риск метаболизма антибиотиков бактериями кишечной флоры касается, в основном, плохо всасывающихся антибиотиков, например неомицина и канамицина. Трансгенные конструкции, несущие в качестве маркерного признака устойчивость как раз к таким препаратам, и были широко использованы биотехнологическими компаниями.

Сценарии риска трансформации бактерий растительными конструкциями подвергались критике, например А.Л.Коновым (107), на основании экспериментальных данных, демонстрирующих низкую частоту передачи наследственного материала от ГМО-организмов болезнетворным бактериям. Обратимся к цифрам и фактам. Порядок частот трансформации для разных штаммов бактерий при обнаружении трансформированных колоний составлял 10^{-4} – 10^{-8} , при отсутствии таковых – не выше 10^{-16} . Число симбионтных бактерий в одном грамме содержимого кишечника достигает 10^{11} . При пересчете на общее содержимое кишечника это даст вполне высокую вероятность трансформации бактерий-симбионтов. Для *Escherichia coli* давно известно большое число патотипов, имеющих различия от нескольких до 1387 новых генов, расположенных в штамм-специфических кластерах и приобретенных в разное время путем горизонтального переноса (108, 109). То-есть, горизонтальный перенос генов для нее не исключительное событие. Что касается передачи устойчивости к антибиотикам между различными бактериями, то это вполне доказанное явление. Был показан перенос устойчивости к антибиотикам от патогенных *Acinetobacter baumannii* к *E.coli* и *Proteus mirabilis* (110). Действительно, эффективная бактериальная система переноса генов устойчивости к антибиотикам представлена IncQ-подобными плазмидами, передающимися между *E.coli*, *Acinetobacter sp.* и другими штаммами бактерий (111). И вероятность формирования рекомбинантных плазмид, несущих новые гены из конструкций, с новой устойчивостью к пока эффективным антибиотикам, пока никак не оценивалась.

В связи с изложенным выше материалом по свойствам белков с инсектицидной активностью возникает еще один риск – формирования новых патогенных штаммов *E.coli*. Показано, что широко используемый в трансгенных конструкциях 35S промотор вируса СаMV, контролирующей экспрессию целевого гена, распознается транскрипционным комплексом широкого спектра видов бактерий (112, 113). При этом велика вероятность получения химерных белков с непредсказуемыми свойствами. Какова специфичность экспрессии других используемых промоторов – предстоит оценить, и без такой оценки говорить о безопасности используемой ГМ-технологии.

В некоторых работах оценка рисков горизонтального переноса проводится на основе анализа методами ПЦР (полимеразной цепной реакции) мускулатуры животных, питающихся трансгенной растительной пищей (114). Очевидно, подобный подход совершенно не обоснован, и отсутствие маркеров конструкций в мускулатуре, вполне ожидаемое, никак не связано с реальными рисками горизонтального переноса.

Характеристики плейотропных влияний (или отсутствие таковых) встроенных генов и конструкций, проведенные с непосредственно полученным сортом, должны меняться с течением времени. Это связано с нестабильностью ряда конструкций, способных к перемещению в геноме и амплификации с течением времени. Уже известны примеры по изменениям в геноме трансгенных растений, связанные с наличием «горячих точек» рекомбинации в конструкциях (115). Эти процессы резко снижают надежность и устойчивость однажды заявленных производителями свойств новых трансгенных сортов.

Критика метода отбора трансформированных культур по устойчивости к антибиотикам привела к тому, что использование репортерных генов устойчивости к антибиотикам запрещено для получения новых пищевых сортов, такие сорта изымаются из обращения. Тем не менее, во многих случаях использование плазмид, содержащих нетранскрибируемые копии генов устойчивости к антибиотикам продолжается. И продолжается использование таких запрещенных сортов: согласно сообщению Mr. Morley от 25 июня 2003 года в Английском парламенте, в Англии на полях с ГМО сортами растений были найдены сорта, несущие гены устойчивости к канамицину и неомицину, ампициллину и амоксициллину, и к гидромицину. (115a)

Заключение

Отмеченные выше факты неблагоприятного воздействия трансгенов на организм человека и животных не свидетельствуют о порочности технологии создания ГМО как таковой. Мы обращаем внимание на актуальность проблемы анализа пищевых и прочих рисков использования ГМО, на необходимость выработки норм экспертизы и тестирования новых сортов, с учетом уже известных рисков и постоянному жесткому контролю ГМО по исходным, не модифицированным сортам. Безусловно, оценка таких рисков всегда будет относительна – любые употребляемые нами продукты питания способны осуществлять разнообразные воздействия на организм, а в процессе производства любой пищевой продукции происходит вмешательство человека в окружающую природу.

Имеющиеся данные, лишь часть которых была кратко описана в настоящем обзоре, показывают, что есть немало уже доказанных случаев реальных пищевых рисков, связанных с использованием генетически модифицированных организмов по сравнению с исходными организмами. Однако в условиях монополизации и производства семенного материала, и его экспертизы одной или несколькими крупными биотехнологическими корпорациями трудно ожидать объективных оценок этих рисков. В результате, проблема «регуляции рисков» может превратиться в проблему «рисков регуляции» (116, 117).