

ОЦЕНКА НА ЕКСПОЗИЦИЯТА И ТОКСИКОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ГЕНЕТИЧНО МОДИФИЦИРАНИ ХРАНИ В ИЗПЪЛНЕНИЕ НА РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 513/2013

Доц. Цвета Георгиева, дм , ERT

Национален център по общественото здраве и анализи, София, България

Резюме

През последните години в ЕС се увеличава значението на оценката здравни рискове от генетично модифицирани (ГМ) култури. Поради краткия исторически път на широката употреба на генетично модифицирани организми (ГМО) и биотехнологични продукти като храни и фуражи, не съществуват достатъчно научни данни за дългосрочните ефекти от употребата им. Малко са научните публикации, които илюстрират въздействието върху човека и животните. Все още няма епидемиологични проучвания, базирани на ГМО, използвани като храна. Предвид повишената обществена чувствителност, породена от наличието ГМ храни на пазара и използването на ГМО като фуражи, процедурите за оценка на безопасността на нови ГМО бяха хармонизирани. Необходимо е да се натрупат достатъчно научни данни, които да доказват необходимостта от провеждане на тестове за токсичност и подходи, които се прилагат при оценката на безопасността на ГМО. Не трябва да се пренебрегва и правото на потребителя да има информиран избор.

Активно се обсъжда ролята и значението на тестове за токсичност върху животни. През 2013 г. е приет нов Регламент № 503/2013 за прилагане на процедури за оценка на риска в съответствие с Регламент № 1829/2004. Възникнаха редица въпроси:необходими ли са по-подробни изследвания на биологичните и дългосрочните ефекти на генетично модифицираните организми върху хората и животните? И как ще се извършва оценка на експозицията на ГМ храни, като част от оценката на риска?

Ключови думи: оценка на безопасност, оценка на експозиция, токсикологични проучвания,

EXPOSURE ASSESSMENT AND TOXICOLOGY STUDIES OF GENETICALLY MODIFIED FOODS IN LINE OF REGULATION (EC) № 513/2013

Tzveta Georgieva, PhD, ERT

National Center of Public Health and Analyses, Sofia, Bulgaria

Abstract

In recent years in EU is increasing the importance of assessing health risks of GMO crops. Because of the short historical time of widespread use of GMO crops and products of biotechnology as a food and feed there is no sufficient scientific data on long-term effects of their use. Few are scientific publications in the literature, illustrating the impact on the human and animals. There are no epidemiological studies based on GMO used as a food. Given the increased sensitivity on food consumption and use of feed containing GMOs requirements for the safety assessment of any new GMOs for registration are harmonized. It is necessary to accumulate enough scientific data to prove the necessity of conducting toxicity tests and approaches to be applied in the safety assessment of GMOs. Should not be overlooked and the consumer's right to have an informed choice.

In the last years actively debated the role and importance of toxicology tests on animals. In 2013 new Regulation № 503/2013 for implementation of risk assessment procedures in line of Regulation № 1829/2004 was adopted. Questions raised are whether a need for more detailed studies to investigate biological and long-term effects of GMOs on humans and animals? And how will conduct exposure assessment of GM food, as a part from risk assessment?

Key words: safety assessment, exposure assessment, toxicological studies, Genetically modified (GM) food

Въведение

Генетично модифицирани (ГМ) храни могат да бъдат използвани в Европейския съюз, само ако са преминали строга оценка на безопасността. Процедурите за оценка и разрешаване на ГМ храни, са определени в Регламент (ЕО) № 1829/2003 за ГМ храни и фуражи и Директива 2001/18/ЕО относно съзнателното освобождаване в околната среда на ГМО. Принципите за анализ на риска за храни, получени чрез модерни биотехнологии са заложиени в Codex Alimentarius (CAC/GL 44-2003). Codex дава най-общи насоки, които очертават оценката на безопасността като съпоставяне на генетично модифицирано растение с конвенционалния аналог (не генетично модифицирано растение) – сравнителен подход, съчетано с фокус върху нежеланите ефекти, чрез прилагане се стъпков подход. Въпреки това задължително се спазват основните принципи на оценката на риска, като се запазват основните елементи на оценка на експозицията и въздействието.

Оценката на риска на генетично модифицирани организми е мултидисциплинарен динамичен процес, и е свързана, както с натрупването на нови научни данни, така и с повишаване на обществената чувствителност по отношение на присъствието на генетично модифицираните организми на пазара в различни форми..

За да се получат достоверни резултати с научна значимост е необходимо да се определи степента на експозиция на ГМ храни.

През последните години в Европейския Съюз се засилва значението на оценката на здравния риск(за хора и животни) от генетично модифицирани култури, храни, фуражи и други продукти. Причина за това са множество обстоятелства от социо-икономически характер и бурното развитие на генното инженерство и появата на нови техники за култивиране. В обобщен вид биха могли да се дефинират следните основни причини, довели до необходимостта от създаване на нови правила и подходи при оценката на риска от ГМО

1. краткият исторически път на широката употреба на ГМО култури и продукти от био-технологии като храни и фуражи
2. липса на епидемиологични проучвания, базирани на ГМО, използвани като храна
3. не достатъчно научни данни за дългосрочните ефекти от употребата им

4. появата на следваща генерация генетично модифицирани растения и продукти на новите техники на манипулация
5. недостатъчни научни публикации, които илюстрират въздействието върху човека и животните
6. повишената обществена чувствителност към навлизането на ГМО и продукти от тях на пазара в европейския съюз
7. правото на потребителя да има информиран избор

Прилагат се и *insilico* и *invitro* методи за оценка на въздействието: а) *insilico* анализ на хомоложната последователност и / или структурна прилика на новите протеини или продукти от разграждане до известни токсични и алергизиращи протеини аналози; б) симулирани стомашни и чревни моделни течности, за изучаване на храносмилателната стабилността на новосинтезираните протеини; в) *invitro* системи за анализ на стабилността на новите протеини при топлинна обработка или други условия, г) *invitro* методи за изпитване за генотоксичност, точкови мутации, хромозомни аберации и увреждане на ДНК/репарация

Предвид разширяващите се области на приложение към настоящия момент са разработени следните документи за оценка на риска, които се прилагат при оценка на безопасността на ГМО в Европейския съюз:

- Guidance on the agronomic and phenotypic characterisation of genetically modified plants 2015
- Guidance for renewal applications of genetically modified food and feed authorised under Regulation (EC) No 1829/2003 2015
- Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals 2013
- Guidance on the risk assessment of food and feed from genetically modified animals and on animal health and welfare aspects 2012
- Guidance on the Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants 2011
- Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use 2011
- Guidance on selection of comparators for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed 2011
- Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants 2011

- Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants 2010

В последните 4-5 години активно се обсъжда ролята и значението на тестове за токсичност върху животни. През 2013 г. е приет нов Регламент № 503/2013 за прилагане на процедури за оценка на риска в съответствие с Регламент № 1829/2004.

Регламентът цели да систематизират:

- научните изисквания към оценката на риска на генетично модифицирани храни и фуражи, насочени към заявления;
- изисквания за допълнителна информация във връзка с оценката на риска;
- изискванията по отношение на методите на откриване, установяване и количествен определяне, на контролните проби и на сертифицираните референтни материали .

Възникнаха обаче редица въпроси: Необходими ли са по-подробни проучвания за изследване на биологични и дългосрочните ефекти на ГМО. Как да се оцени експозицията на ГМ храни и фуражи хората и на животните? Ще помогнели тези регламент да се допълнят оскъдни научни данни и какъв ще тяхния принос за оценката на безопасността на храните и фуражите, съдържащи ГМО?

Събирането на валидни данни и оценката на експозицията са задължителни и водещи елементи на **научната оценка риска**.

Особено се засилва значението на оценката на хранителната стойност и експозиция , когато става дума за ГМ растения с променен хранителен профил. Пример за такъв случай е разрешената на Европейския пазар соева линия ГМ линия соя с променен хранителен състав - DP-3Ø5423-1. Манипулация на ген с цел промяна експресията на фрагмент на ендогенния ген *fad2-1* вследствие на РНК интерференция. В резултат на потискането (DNA silencing) на ендогенния *fad2-1* ген (кодира омега-6 десатураза), се постига повишаване новото на олеинова киселина и понижаване на линоленовата киселина.

Оценка на експозицията на ГМ храни

Хранителна експозиция е съществен елемент на оценка на риска на генетично модифицирани (ГМ) храни. Този подход се използва след идентифицирането и

характеризирането на опасност, или за оценка на хранителните последиствия след консумация на ГМ храни с променен хранителен профил и след това за пълните рискови характеризирани. А груба оценка на хранителната експозиция може да се използва и по време на определяне на опасността / характеризирани да подкрепят избора на режими на дозиране.

През 2008 след решение да Научния комитет на Европейския орган по безопасност на храните , се създава Подробна база данни (Comprehensive European Food Consumption Database - CEFCD) (GUIDANCE of EFSA Use of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database in Exposure Assessment, 2011) въз основа на съществуваща информация от индивидуални анкетни проучвания на диетата на по-детайлно ниво. Поканени бяха държавите членки да предоставят данни от техните най-нови национални проучвания на храненето. Двадесет държави – членки приемат предложението, подписват споразумение с EFSA и участват в този проект, както предоставят данни както за консумацията, така и за новото на потребление. България и Испания представят данни от две различни проучвания, като едното от българските проучвания включва и деца под 10 годишна възраст.

Проучванията са направени с валидирани анкетни методи съгласно Стандарт ISO-3166-1-алфа-2 кодираща система. Към монета CEFCD е единствената база данни източник на информация за консумацията в Европа .

През 2015 г. след дискусия в Научната мрежа за оценка на риска от ГМО към EFSA подготвя Изявление, в което се насърчава използването на CEFCD за оценка на експозицията на ГМ храни. (Use of EFSA Comprehensive European Food Consumption Database for estimating dietary exposure to genetically modified foods, 2015 <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4034>)

Така ще стане възможно данните да се ползват и при подбора на дозите за провежданите токсикологични изпитвания при животни съгласно изискванията на Регламент (ЕС) № 503/2013 г.

Препоръките, които дава EFSA са насочени към максимално извличане на валидни данни, с цел оценка на експозицията на ГМ храни и последващата оценка на риска, а именно:

- Данните за консумация следва да са основно от анкетни изследвания на диетата.
- В случаите , когато оценката на хранителния прием е направена въз основа на данните за потреблението от ограничен брой държави –членки , в оценката на въздействието следва да се разгледа възможността за сравняване на специфичните за страната,данни за потреблението с такива от други Европейски проучвания за консумация.
- EFSA насърчава да се използват обобщени статистически данни за консумацията на храни от цялостни Европейски проучвания за консумация на храни като скринингов инструмент при оценката на хранителната експозиция.
- При използване на обобщени статистически данни на EFSA за оценка на хранителния прием и състава на храните при оценка на експозицията, за предпочитане е те да бъдат от едно национално проучване с Европейски произход. Не се препоръчва смесването на данните за състава от различни бази данни за различни храни.
- За ГМ растения с променен хранителен профил, влиянието повишаването или понижаването концентрация на променените съставки, следва да се разглеждат в контекста на общата диета.

Генетично модифицирани (ГМ) растения, използвани за храни и фуражи могат да бъдат разрешени само за пускане на пазара в резултат на научна оценка на всеки риск, който те могат да представляват за здравето на хората и животните. Това включва и оценка на алергенност, която трябва да се извършва в съответствие с Регламент (ЕО) № 503/2013. За да се подпомогнат заявителите и оценители на риска в практическото прилагане на необходимите изисквания и с цел достъп до най-новите разработки в тази научна област, в момента е в процес на разработка е допълнително ръководство за оценка на алергенност за генетично модифицирани растения, използвани като храни и фуражи. През м. ноември 2016 г. се проведеха публичните консултации със заинтересованите страни .

Токсикологични тестове на нови ГМО

Регламент (ЕО) № 503/2013 дава насоки и при провеждането на токсикологичната оценка на нов ГМО и изискванията за:

- изследване за токсичност на новоекспресирани протеини;
- изследване на нови съставки, различни от протеини;

- информация за естествените съставки на храните или фуражите;
- изследване на непреработена генетично модифицирана храна и фураж.

Целта е да се оцени евентуалното токсично въздействие на всички промени върху непреработената генетично модифицирана храна/фураж в резултат на генетичната модификация, като например въвеждането на нови гени, потискане на експресията на гени или свръхекспресията на ендегенен ген.

Съгласно Регламента заявителя следва да представи в досието за регистрация резултати от приведени изследвания за токсичност на повтаряща се (орална) доза (28 дни); субхронична (90 дни) орална токсичност; При изследването за токсичност заявителя използва международно одобрени насоки и методи за изследване, описани в Регламент (ЕО) № 440/2008 на Комисията за определяне на методи за изследване в съответствие с Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH)

Токсикологичната оценка се извършва с цел да се:

а)покаже, че очакваното въздействие на генетичната модификация не оказва неблагоприятни въздействия върху здравето на хората и животните;

б)докаже, че неочакваното(ите) въздействие(я) на генетичната модификация, което(които) е(са) установено(и) или се допуска, че е(са) настъпило(и) на база на предхождащите сравнителни молекулярни анализи, анализи на състава или фенотипни анализи, не оказва(т) неблагоприятно въздействие върху здравето на хората и животните;

в)установят неблагоприятните въздействия на новите съставки и да се определи най-високото равнище на дозите, което не води до неблагоприятни въздействия. На база на данните, получени от подходящи изследвания с животни, може да бъде установен допустим дневен прием (ADI) на отделните съединения от хора, като се използват коефициентите на неопределеност или безопасност, при които се вземат предвид разликите между изследваните животински видове и хората, както и междуиндивидуални изменения сред самите хора;

г)определят потенциални неблагоприятни въздействия върху непреработените генетично модифицирани храни/фуражи или да се отстранят оставащите неясноти чрез провеждане на изследвания с 90-дневно хранене.

От друга страна трудностите, свързани с оценката на безопасността и хранителната стойност на готови хранителни продукти са добра известни, а именно:

- съдържат биоактивни вещества (макро – и микро-нутриенти, антиоксиданти, антинутриенти и естествени токсини), които не могат да бъдат изследвани поотделно.
- количеството храна, което реално може да бъде включена в диетата на изпитваните животни е ограничено и недостатъчно за да доведе до евентуален отрицателен ефект с цел оценка на токсикологичния профил на изпитаната храна
- Има консенсус сред токсиколозите, че опити с животните с готови (цели) (ГМ) храни са трудни за изпълнение, не са показателни за откриване на нежелани ефекти, изпълнява присъщите рискове на матрични ефекти и нямат достатъчен информативен принос при оценката на безопасността на готови храни.

От достъпната литература е видно, че се проведени многобройни остри (14-28 дни) и суб-хронични и хронични (90 дни до 6 месеца до 2 години) изпитвания с хранене на лабораторни опитни животни (грязачи) и целеви животни. Проведени са и проучвания за отдалечени ефекти на няколко поколения (2-5 поколения). Материалите за изпитване, включват диета с цялата храна/фураж, получени от ГМ линии царевица, картофи, ориз, соя, домати, рапица, тритикале и т.н. (EFSA, 2008 г. (Таблица 2), Snell и др, 2012;. Ricoch, 2013 г.). Определяни са стандартния набор от токсикологични характеристики: хематологични и биохимични показатели, включително телесно тегло, консумацията на храна, кръвна картина и биохимични показатели, теглото на органите и хистопатологични проучвания. До момента няма проучвания чрез хранене на опитни животни (остри, суб-хронични и хронични проучвания), проведени в съответствие с общоприети токсикологични стандарти и протоколи, които да доказват евентуални негативни ефекти и наличие на „доза-ефект” и „доза-отговор” зависимост. Някои автори считат, че е малко вероятно, проучваната с опитни животни да предоставят значима допълнителна научна информация по отношение на цялата ГМ храна /фураж.

В някои публикувани изследвания, се докладват разлики при изследваните показатели при сравнителен анализ на резултатите от групите животни, третирани с ГМ диета, и

животните от контролните групи. Получените резултати не са значими поради неподходящ дизайн на проучването, като липса на информация за диетата, с която са третирани животните, използването на диети, които са потенциално небалансирани и нестандартизирани, както и липсата на доказателства за „доза-отговор” зависимост.

Интересен пример за неподходящо подбран експериментален дизайн, е изследването за хронична токсичността на хербицид-толерантни ГМ царевица NK603, докладвано от Seralini и съавтори (2012 г.). Различни агенции, отговорни за безопасността на храните в страните от Европейския Съюз и извън ЕС разкритикуваха използвания експерименталния дизайн и твърденията на авторите, че NK603 царевица, отглеждани със и без използването на хербицид с активно вещество глифозат, причинява неблагоприятни ефекти върху третирани плъхове. Докладваните от авторите, ефекти включват развитие на тумори на млечната жлеза при женските плъхове и бъбречни и кожни тумори при мъжките. Част от компетентните институции, които критикуват проучването включват EFSA (EFSA, 2012 г.), Агенция по храни на Австралия и Нова Зеландия на австралийския и новозеландския агенция (www.Foodstandards.gov.au), Канадската агенция за инспекция на храните (www.hc-sc.gc.ca) и Национална академия на науките на Франция (www.academie-sciences.fr). Основните ограничения на изследването включват: - използването на неподходяща порода плъхове, известна със спонтанно възникване на тумори на млечната жлеза при женски плъхове; - малкия брой животни, използвани в различните тестови групи; липсата на референтни контроли или данни за естествените вариации на параметрите на изпитване; - липсата на данни за агрономическия състав и фенотипните характеристики на ползваните в диетата материали за изпитване и контрол; - използването на не подходящи статистически методи; - липсата на анализ в динамика на изследването.

Данните, представени от Seralini и др. (2012) са още по-изненадващи, тъй като царевица NK603, представена за разрешение на пазара на ЕС, преди това е била оценена от ГМО Панелът на EFSA през 2003 г. и 2007 г. ((EFSA GMO Opinions, www.efsa.europa.eu/en/panels/gmo.htm). Тези оценки показват, че царевица NK603 е (с изключение на присъствието на новите експресирани протеини CP4 EPSPS и CP4 EPSPS, L214P) е композиционно и агрономически идентична с не-ГМ сорт царевица (с сравнима генетичен фон) и с други конвенционални царевични сортове. Освен това, при 90-дневно проучване върху плъхове, хранени с царевица ГМ линия NK603 (в дози 11% или 33% от диетата) и не-ГМ царевица, не се доказват значими разлики в клиничните,

хематологичните, биохимичните и хистологичните параметри. Изключение са леко повишени нива на средния обем на еритроцитите и хемоглобина при групата женски плъхове, третирани с високата доза, което не се счита, че има биологично значение, тъй като не е статистически достоверно.

Последното голямо токсикологично изследване е проведено в рамките на проект GRACE (Zeljenková D, et al., 2016). В проучването са представени резултатите от едногодишно изследване с ГМ линия царевица MON810. Изпитанията са извършени, като се взети предвид насоките на OECD TG 452 (OECD 2009) и насоките на EFSA за провеждане на 90 дневно токсикологично проучване при орално въвеждане. (Guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed (EFSA Scientific Committee 2011). Получените резултати показват, че царевичката MON810 в доза до 33% в диетата не предизвиква неблагоприятни ефекти при мъжки и женски плъхове Wistar Han RCC след хронично третиране.

През 2017 г. предстои Националният център по общественото здраве и анализи да стартира проучване с цел оценка на експозицията с диетата на ГМ храни за българска популация. Проучването ще се извърши въз основа на налични данни от национални проучвания, проведени през 2009 г., 2012 г. и 2016 г., както и въз основа на нови собствени анкетни данни. Получените резултати ще са принос към оскъдната информация относно консумацията на ГМ храни. Изследването ще даде информация относно приложимостта и ролята на този подход за оценка на експозицията на ГМ храна.

Литература

1. GUIDANCE of EFSA Use of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Data base in Exposure Assessment, EFSA Journal 2011;9(3):2097
2. EFSA. (2008) Report of the EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials ‘ Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials’. Food Chem. Toxicol. 46, S2–S70.
3. EFSA Guidance on conducting repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/ feed (EFSA Scientific Committee 2011)
4. European Commission (2013) Commission Implementing Regulation (EU) No 503/2013 of 3 April 2013 on applications for authorisation of genetically modified food and feed in accordance with Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulations (EC) No 641/2004 and (EC) No 1981/2006. Official Journal of the European Union
5. Kuiper, H, Esther J. Kok and Howard V. Davies, Commentary - New EU legislation for risk assessment of GM food: no scientific justification for mandatory animal feeding trials , Plant Biotechnology Journal (2013) 11, pp. 781–784
6. OECD TG 452 (OECD 2009)
7. Petrova S and Angelova K, 2006. Food- based Dietary Guidelines for Bulgarian adults – scientific background for development and formulation. Advances in Bulgarian Science . 4: 19 – 33.
8. Petrova S, Ovcharova D, Rangelova L, Duleva V, Angelova K, Kalinov K, Dimitrov P, Bojilova D, Baikova D, Vatrlova K, Popivanova A, Marinova M, Antonova Z and Duneva Z, 2009. National survey on nutrition of infants and children under 5 years and family child rearing. A Report for UNICEF Bulgaria. NCPHP, pp 1 – 361 .
9. Ricroch, A.E. (2013) Assessment of GE food safety using ‘-omics’ techniques and long-term animal feeding studies. N Biotechnol. 30, 349–354.
10. Seralini, G.E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., Hennequin, D. and Spiroux de Vend^omois, J. (2012) Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. Food Chem. Toxicol. 50, 4221–4231.
11. Snell, C., Bernheim, A., Berg e, J.-B., Kuntz, M., Pascal, G., Paris, A. and Ricroch, A.E. (2012) Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: a literature review. Food Chem. Toxicol. 50, 1134–1148.
12. Zeljenková D, et al –One year oral toxicity study on a genetically modified maize MON810 variety in Wistar Han RCC rats (EU 7th Framework Programme project GRACE). Arch Toxicol. 2016 Oct;90(10):2531-62. doi:10.1007/s00204-016-1798-4. Epub 2016 Jul 20.

Изготвил:

Доц. Цвета Георгиева
Отдел ГМО , НЦОЗА
Тел :0888361064