

- population of the large industrial city. *Vestnik Rossiyskogo universiteta družby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti*. 2012; (4): 25–32. (in Russian)
11. Laver B.I., Glebov V.V. Condition of medico-psychological and social adaptation of the person in the conditions of the large city. *Vestnik Rossiyskogo universiteta družby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti*. 2012; (5): 34–6. (in Russian)
 12. GN 2.1.5.1315–03. The maximum permissible concentration (MPC) of chemicals in water of water objects of economic and drinking and cultural and community water use. Moscow; 2003. (in Russian)
 13. Becher G., Ovrum N.M., Christman R.F. Novel chlorination by-products of aquatic humic substances. *Sci. Total Environ*. 1992; 117-118: 509–20.
 14. *IPCS Formaldehyde. Concise International Chemical Assessment Document No. 40*. Geneva: World Health Organization; 2002.
 15. *IPCS Formaldehyde. Environmental Health Criteria 89*. Geneva: World Health Organization; 1989.
 16. *OECD SIDS initial assessment report for SIAM 14: Formaldehyde*. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development; 2002.
 17. Krasner S.W., McGuire M.J., Jacangelo J.G., Patania N.L., Reagan K.M., Aietta E.M. The occurrence of disinfection by-products in US drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* 1989; 81(8): 41–53.
 18. Tomkins B.A., McMahon J.M., Caldwell W.M., Wilson D.L. Liquid chromatographic determination of total formaldehyde in drinking water. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1989; 72(5): 835–9.
 19. SanPiN 2.1.4.1116–02. Drinking water. Hygienic requirements to the quality of the water packaged in capacity. Quality control. Moscow; 2002. (in Russian)
 20. GOST P 55227–2012. Water. Methods for determination of formaldehyde. Moscow; 2012. (in Russian)
 21. MI 2405–97. Mass concentration of ethyl aldehyde and formaldehyde in water. Performance technique measurement by HPLC method. Moscow; 1997. (in Russian)
 22. US EPA Method 1667, Revision A. Formaldehyde, Isobutyraldehyde, and Furfural by Derivatization Followed by High Performance Liquid Chromatography. 1998.
 23. Thurman E.M., Mills M.S. *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. Canada: Wiley-Interscience; 1998.
 24. Simpson J.K.N., ed. *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. Harbor City: Varian Associates, Inc.; 2000.
 25. Fritz J.S. *Analytical Solid-Phase Extraction*. New York: Wiley-VCH; 1999.
 26. Carroll R.J., Ruppert D. Transformation and Weighting in Regression. New York: Chapman and Hall; 1988.
 27. US Food and Drug Administration. Guidance for industry: Q2B validation of analytical procedures: methodology. Rockville; 1996.
 28. Boulanger B., Chiap P., Dewe W., Crommen J., Hubert P. An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progress and limitations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 32(4-5): 753–65.
 29. GOST P ISO 5725-6–2002. Accuracy (correctness and precision) methods and results of measurements. Moscow; 2002. (in Russian)
 30. Shrivastava A., Gupta V.B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron. Young Sci.* 2011; 2(1): 21–5.

Поступила 10.12.15
Принята к печати 13.05.16

© ШЕИНА Н.И., 2017

УДК 614.3/4:579.25

Шейна Н.И.

ОЦЕНКА ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ОДИН ИЗ КРИТЕРИЕВ ИХ БИОБЕЗОПАСНОСТИ

ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва

В эксперименте изучены патогенные свойства 10 генно-инженерно-модифицированных штаммов E. coli и S. cerevisiae по показателям: вирулентность, токсичность, токсигенность, инвазивность и способность к диссеминации. Показано, что большая часть изученных штаммов не обладает патогенными свойствами и поэтому может быть рекомендована к использованию в биотехнологиях. Наряду с этим 2 штамма E. coli DLT1270 и E. coli ECR-HIS-T обладали высокими инвазивными свойствами и поэтому могут представлять опасность для теплокровных животных и человека.

Ключевые слова: патогенность; генно-инженерно-модифицированные штаммы E. coli, S. Cerevisiae; биобезопасность.

Для цитирования: Шейна Н.И. Оценка патогенных свойств генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов как один из критериев их биобезопасности. *Гигиена и санитария*. 2017; 96(3): 284–286. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-3-284-286>

Sheina N.I.

PATHOGENIC PROPERTIES OF GENETICALLY MODIFIED MICROORGANISM ASSESSMENT AS ONE OF THE CRITERIA OF BIOSAFETY

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovitaynova str. Moscow, 119121, Russian Federation

In the experiment there were studied pathogenic properties of the 10 genetically-modified E.coli strains and S. cerevisiae in terms of virulence, toxicity and toxigenicity, invasiveness and ability to the dissemination. Most of studied strains were shown to have no pathogenic properties and be able therefore to be recommended for the use in biotechnology. Along with this 2 strain of E.coli DLT1270 2 and E.coli ECR-HIS-T had a highly invasive properties and therefore can be a dangerous for warm-blooded animals and humans.

Key words: pathogenicity; genetically modified strains of E.coli; S. cerevisiae; biosafety.

For citation: Sheina N.I. Pathogenic properties of genetically modified microorganism assessment as one of the criteria of biosafety. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2017; 96(3): 284–286. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-3-284-286>

For correspondence: Natalia I. Sheina, MD, PhD, DSci., professor, professor of the Department of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: ni_sheina@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received: 21 February 2016

Accepted: 13 May 2016

Для корреспонденции: Шейна Наталья Ивановна, д-р биол. наук, проф. каф. гигиены Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, Москва. E-mail ni_sheina@mail.ru

Введение

Внедрение в практику методов геной инженерии, позволяющих создавать принципиально новые продукты в различных отраслях народного хозяйства (сельское хозяйство, нефтедобыча, пищевая и фармацевтическая промышленность), послужило толчком для развития биотехнологии. Одним из актуальных направлений современной биотехнологии является создание штаммов, продуцирующих вакцины, антитела для борьбы с тяжелейшими заболеваниями различной этиологии.

Уже с начала 1970-х годов геной инженерия является исключительно мощной и многообещающей технологией, но она связана с серьезными рисками. По данным национального института здравоохранения США (NIH), микроорганизмы с трансплантированными генами могут нанести вред человеку и другим формам жизни. Вероятным источником опасности может быть то, что измененные клетки могут обладать большими конкурентными преимуществами и смогут занять определенную нишу в существующей экосистеме, а также будут опасными для здоровья и жизни человека [1, 2].

Однако уже в 1975 г. на конференции в Асиломаре (США) ученые пришли к выводу, что эксперименты в области геной инженерии (новой биотехнологии) не более опасны, чем аналогичные работы в других отраслях, но при этом необходим строгий контроль за соблюдением мер безопасности. В связи этим во всем мире остро встает вопрос безопасности использования гено-инженерно-модифицированных микроорганизмов (ГММ), создаются специальные организации, обеспечивающие всесторонний контроль за биопроизводством.

Появление штаммов-продуцентов, созданных с использованием методологии генетической инженерии, потребовало разработки новых подходов, прежде всего оценки потенциального риска, так как в ряде случаев ГММ могут существенно отличаться по своим свойствам от природных штаммов, и при отсутствии опыта их использования допускается вероятность возникновения негативных воздействий на окружающую среду.

Оценка реального риска возможна только при накоплении опыта работ с конкретными штаммами ГММ. За последние десятилетия подобный опыт уже в значительной степени накоплен, что позволило разработать достаточно эффективные и надежные подходы для оценки реального риска использования штаммов ГММ в промышленности. Максимальное использование для этой цели накапливаемых научных знаний и опыта работ является основным принципом, положенным в основу современных подходов к обеспечению безопасности в странах с интенсивно развивающейся биотехнологией.

При оценке риска использования ГММ в ходе научно-исследовательских работ и производства важно сфокусировать свое внимание не только на процессе производства, но и на конечном продукте биотехнологии.

В нашей стране до начала XX века внедрение в биотехнологическое производство ГММ в России находилось под запретом. Основой нормативной базы Российской Федерации в области контроля гено-инженерной деятельности является Федеральный закон от 5.06.1996 № 86¹, который впоследствии претерпел несколько редакций и действует по настоящее время. Этот документ содержит общие положения, которые являются адаптированным вариантом рекомендаций ВОЗ по государственному контролю исследований, связанных с созданием и использованием генетически модифицированных организмов (ГМО). Государственное регулирование промышленного использования ГМО в тексте документа упоминается только в статьях 5 и 7. В статье 7, в частности, определяется, что продукция, полученная с применением ГМО или их содержащая, подлежит государственной регистрации в порядке, установленном Правительством Российской Федерации, которое было введено Федеральным законом от 04.10.2010 № 262².

В соответствии с Федеральным законом № 86 были приняты постановления Правительства РФ от 16.02.2001 № 120 «О государственной регистрации гено-инженерно-модифицированных организмов»³ и № 26 от 18.01.2002 «О государственной регистрации кормов, полученных из гено-инженерно-модифицированных организмов»⁴, которые впервые вводили государственную регистрацию

ГММ, предназначенных для промышленного использования или импорта в РФ, а также содержали Положения о государственной регистрации. В частности, данные Положения определяли основные этапы государственной регистрации и федеральные ведомства, ответственные за ее проведение. Регистрация ГМО и ведение государственного реестра были возложены на Министерство промышленности, науки и технологий, в частности на Экспертный совет по вопросам биобезопасности.

По ряду причин данные постановления Правительства не привели к созданию эффективной нормативной базы для промышленного использования ГММ, вместе с тем впоследствии был подготовлен ряд документов, регулирующих использование ГМО и продукции, полученной с использованием ГМО.

Так, например, приказом Министерства сельского хозяйства РФ от 6.10.2009 № 466⁵ был утвержден административный регламент исполнения Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) государственной функции по государственной регистрации кормов, полученных из гено-инженерно-модифицированных организмов. В этом приказе определен порядок осуществления государственных функций (регистрации, ведения реестров, выдачи свидетельств о государственной регистрации и т.д.), возложенных на Россельхознадзор.

В дальнейшем правительством была разработана концепция федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации на 2009–2013 гг. Целью программы являлось последовательное снижение до приемлемого уровня риска воздействия опасных химических и биологических факторов на население, биосферу, техносферу и экологические системы [3].

Значительным шагом в направлении создания нормативной базы в области промышленного использования ГММ стало постановление Правительства РФ от 23.10.2013 № 839 «О государственной регистрации гено-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы»⁶, которое отменяет действие постановлений Правительства РФ № 120 и № 26 с 01.07.2014.

В этом Постановлении определены общие правила государственной регистрации ГМО и продукции, полученной с использованием ГМО. В зависимости от назначения ГМО определены виды использования и федеральные ведомства, ответственные за государственную регистрацию и мониторинг биобезопасности применения. По своей сути данное постановление является программным и определяет конкретные задачи по дальнейшему развитию нормативной базы в области использования ГМО и, в частности, промышленного использования ГММ.

Однако на практике этапы проведения экспертизы и государственной регистрации ГММ и продуктов, их включающих, по-прежнему остаются неясными и неконкретными для разработчиков новых биотехнологий. При рассмотрении возможности использования ГММ в промышленности в настоящее время отсутствуют требования и рекомендации для конструирования промышленных штаммов ГММ, не существует документов, определяющих правила проведения экспертизы, не разработаны критерии и методы оценки безопасности ГММ. До настоящего времени не разработаны также регламенты или правила обеспечения биобезопасности промышленного производства с использованием ГММ.

Цель исследования – изучение патогенных свойств новых биотехнологических штаммов, полученных методом геной инженерии, в острых опытах на животных как одного из возможных критериев оценки их биобезопасности.

Материал и методы

Эксперименты выполнялись на белых беспородных мышах массой тела 20–25 г. Опытные и контрольные группы животных состояли из 8 животных, которые содержались в виварии университета в стандартных условиях освещения, проветривания и кормления.

Исследование патогенных свойств штаммов *E. coli* при однократном внутрибрюшинном введении больших доз микроорганизмов проводили по интегральным показателям, характеризующим взаимоотношения между макро- и микроорганизмом: вирулент-

¹ Федеральный закон № 86 от 5.06.1996 «О государственном регулировании в области гено-инженерной деятельности» (Собрание законодательства Российской Федерации, 1996, № 28, ст. 3348).

² Федеральный закон № 262 от 4.10.2010 (Собрание законодательства Российской Федерации, 2009, № 1, ст. 21).

³ Постановление Правительства РФ № 120 от 16.02.2001 «О государственной регистрации гено-инженерно-модифицированных организмов» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2001, № 9, ст. 860).

⁴ Постановление Правительства РФ от 18.01.2002 № 26 «О государственной регистрации кормов, полученных из гено-инженерно-модифицированных организмов» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2002, № 4, ст. 323; 2006, N 30, ст. 3389).

⁵ Приказ Министерства сельского хозяйства РФ от 6.10.2009 № 466 «Об утверждении административного регламента исполнения федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору государственной функции по государственной регистрации кормов, полученных из гено-инженерно-модифицированных организмов».

⁶ Постановление Правительства РФ от 23.09.2013 № 839 «О государственной регистрации гено-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы».

Таблица 1

Показатели патогенности генно-инженерно-модифицированных штаммов *E. coli* при однократном внутрибрюшинном введении

Штаммы <i>E. coli</i>	DV ₅₀ , КОЕ/жив.	«Пороговая доза» (Lim _{invasion}), КОЕ/жив	Высевание из внутренних органов	
			доза, КОЕ/жив	сроки высева-ния, сут
DLT 1270	>10 ¹¹	2 · 10 ⁷	10 ⁷ , 10 ⁸	4
DLT 1270M	>10 ¹¹	7 · 10 ¹⁰	7 · 10 ⁸ , 7 · 10 ⁹ , 7 · 10 ¹⁰	6
SX 50	>10 ¹¹	5 · 10 ⁸	5 · 10 ⁸ , 5 · 10 ⁹	2
SX 70	>10 ¹¹	2 · 10 ⁹	2 · 10 ¹¹	2
ECR-HIS-T	>10 ¹¹	4 · 10 ⁷	4 · 10 ⁹	3
KMEX 511	>10 ¹¹	4 · 10 ⁸	4 · 10 ⁹ , 4 · 10 ¹⁰	5
KMEX 711	>10 ¹¹	4 · 10 ¹⁰	4 · 10 ¹⁰ , 4 · 10 ¹¹	7

ность (DV₅₀), минимальная («пороговая», Lim_{invasion}) доза штаммов в крови животных через 30 мин после введения, характеризующая его инвазивность, способность к диссеминации штаммов в кровь и внутренние органы (почки, печень, селезенка) в течение 1 мес, токсичность экзо- и эндотоксинов [4].

Оценку вирулентности штаммов определяли по величине DV₅₀ при однократном внутрибрюшинном введении суспензии двухсуточной культуры изучаемых штаммов в физиологическом растворе беспородным белым мышам в различных дозах. «Пороговую» дозу определяли как минимальную при высеивании штаммов из крови хвостовой вены через 30 мин после введения.

На 3, 7, 10, 20 и 30-е сутки после введения проводили высеивание штаммов из крови и внутренних органов методом отпечатков на плотные питательные среды. Токсичность штаммов изучали при внутрибрюшинном введении белым мышам прогретой (80 °С, 1 ч) и отмытой физиологическим раствором двухсуточной культуры в наибольшей дозе 5 · 10¹² КОЕ/жив. и ее разведениях. Токсигенность штаммов изучали при внутрибрюшном введении стерильных фильтратов двухсуточных бульонных культур в 3 разведениях: 0,5 мл каждого разведения вводили 3 мышам. Контрольным животным вводили стерильный питательный бульон и физраствор.

Результаты и обсуждение

В РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ был накоплен определенный экспериментальный материал по изучению патогенных свойств генно-модифицированных штаммов *E. coli*, предлагаемых для использования в биотехнологиях в качестве продуцентов для синтеза лекарственных препаратов.

При изучении патогенных свойств 7 генно-инженерно-модифицированных штаммов *E. coli* показано, что средневирulentная доза (DV₅₀) для всех штаммов была выше 10¹¹ КОЕ/жив. (табл. 1). «Пороговая» доза при парентеральном введении суспензии для большинства штаммов находилась на достаточно высоком уровне: микроорганизмы высевались из крови через 30 мин после их введения в дозах 10⁸–10¹⁰ КОЕ/жив. Указанный факт свидетельствует о низких инвазивных свойствах.

Однако для штаммов *E. coli* DLT 1270 и *E. coli* ECR-HIS-T Lim_{invasion} находился на предельно низком уровне (10⁷ КОЕ/жив.), что свидетельствует о более высоких инвазивных свойствах и может представлять опасность для теплокровных животных.

Таблица 2

Результаты изучения патогенных свойств 3 штаммов *S. cerevisiae*

Название штамма <i>S. cerevisiae</i>	DV ₅₀ (максимально введенная доза), КОЕ/жив.	Пороговая доза (Lim _{invasion}), КОЕ/жив.	Высевание штамма из внутренних органов			
			дни	доза	КОЕ/жив.	органы
ВКПМ Y-3928	> 4 · 10 ¹¹	4 · 10 ¹⁰	3-й	4 · 10 ¹¹	4 · 10 ¹⁰	печень, сердце
ВКПМ Y-3853	> 10 ¹²	10 ¹⁰	3-й	10 ¹²		сердце, почки, селезенка
			7-й	10 ¹²		сердце, селезенка
ВКПМ Y-3919	> 9 · 10 ¹⁰	9 · 10 ⁹	3-й			не высева-лись

Введение культуральной жидкости после термической обработки, содержащей эндотоксины, не вызывало гибели подопытных животных. Отсутствие гибели мышей наблюдалось также и при введении культуральной жидкости, содержащей экзотоксины штаммов.

При изучении диссеминации штаммы высевались из крови и внутренних органов (печень, почки, селезенка) животных только в течение 2–7 дней. Полученные данные свидетельствуют о том, что изученные генно-инженерно-модифицированные штаммы *E. coli* не способны размножаться и длительно находиться в организме теплокровных животных.

Генно-инженерно-модифицированные штаммы *S. cerevisiae* предполагается использовать для внутриклеточного синтеза биомодифицированного интерферона α2b человека, а также для биосинтеза рекомбинантных белков как основы терапевтической вакцины против папилломавируса.

Результаты исследования патогенных свойств генно-инженерно-модифицированных штаммов *S. cerevisiae* представлены в табл. 2. В период наблюдения (1 мес после введения различных доз микроорганизмов) гибели животных не наблюдалось. Средневирulentная доза DV₅₀ для штаммов не была достигнута, а следовательно, она более максимально введенной дозы (DV₅₀ штаммов >9 · 10¹⁰–10¹² КОЕ/жив.). Lim_{invasion} *S. cerevisiae* ВКПМ Y-3928 составила 4 · 10¹⁰ КОЕ/жив., *S. cerevisiae* ВКПМ Y-3853 – 10¹⁰ КОЕ/жив., *S. cerevisiae* ВКПМ Y-3919 – 9 · 10⁹ КОЕ/жив.

Высевание отдельных колоний всех штаммов наблюдалось лишь на 3-й сутки. На 7-й день единичные колонии высевались из сердца и селезенки при введении штамма ВКПМ Y-3853 в дозе 10¹² КОЕ/жив. вследствие высокой дозы и более длительного выведения из организма. При введении максимальной дозы штамма *S. cerevisiae* ВКПМ Y-3919 в дозе 9 · 10¹⁰ КОЕ/жив. Колонии не обнаруживались во внутренних органах и крови уже на 3-й день после введения.

При изучении токсичности в течение срока наблюдения гибель животных не отмечена (DL₅₀ > 5 · 10¹² КОЕ/жив.). Гибель животных при исследовании токсигенности в течение срока наблюдения также не отмечена.

Таким образом, исследования показали, что большая часть генно-инженерно-модифицированных штаммов *E. coli* и *S. cerevisiae* не проявляли вирулентных, токсичных и токсигенных свойств в отношении теплокровных животных. Инвазивная способность этих штаммов невысока, они не размножаются в организме теплокровных животных, пребывание их ограничивается несколькими днями. В связи с этим они относятся к непатогенным штаммам для теплокровных животных. Исключение составили 2 штамма *E. coli*, которые потенциально небезопасны для теплокровных животных вследствие их высокой инвазивной способности и не могут быть рекомендованы к использованию в биотехнологиях.

Полагаем, что метод изучения патогенных свойств может быть включен в экспертизу как критерий оценки безопасности новых генно-сконструированных штаммов при рассмотрении возможности их использования в биотехнологической промышленности.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Еришин А.П. *Генетически модифицированные организмы: мифы и реальность*. Минск: Тэхналогія; 2004.
2. Еришин А.П., ред. *Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика*. Минск: Тэхналогія; 2005.
3. ВП-П8-2322. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г. М.; 2012.
4. Пивоваров Ю.П., Мялина Л.И., Королик В.В. *Критерии оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза: Методические рекомендации*. М.; 1992.

References

1. Ermishin A.P. *Genetically Modified Organisms: Myths and Reality [Geneticheski modifitsirovannyye organizmy: mify i real'nost']*. Minsk: Tekhnologiya; 2004. (in Russian)
2. Ermishin A.P., ed. *Biotechnology. Biosecurity. Bioethics [Biotehnologiya. Biobezopasnost'. Bioetika]*. Minsk: Tekhnologiya; 2005. (in Russian)
3. VP-P8-2322 Comprehensive program of biotechnology development in the Russian Federation for the period till 2020. Moscow; 2012. (in Russian)
4. Pivovarov Yu.P., Myalina L.I., Korolik V.V. *Criteria for Assessing the Pathogenic Properties of Producer Strains Proposed for Use in Industrial Microbiological Synthesis: Guidelines [Kriterii otsenki patogennykh svoystv shtammov-produtsentov, predlagayemykh dlya ispol'zovaniya v promyshlennosti mikrobiologicheskogo sinteza: Metodicheskie rekomendatsii]*. Moscow; 1992. (in Russian)

Поступила 21.02.16
Принята к печати 13.05.16