



Новите геномни техники – безопасни ли са те и дали 100% можем да твърдим, че са високо ефективни и полезни за агрохранителната верига

Научен обзор

В нашата съвременна ера на биотехнологичен напредък непрекъснато се разработват нови инструменти за подобряване на земеделието. Независимо дали става дума за секвениране на ДНК, гена модификация или редактиране на гени, **целта на тези техники е да постигнат подобрени растителни култури, микроорганизми или животни, така че да придобият допълнителни специфични желани характеристики.** Индустрията използва биотехнологиите, за да манипулира геномите на растенията, животните и микроорганизмите, за да придаде например устойчивост на растителните култури на постоянно изменящите се климатични условия или пък повишаване на телесното тегло на животните и широка гама от други белези и характеристики.

Биотехнологичната индустрия и свързаните с нея научни колективи насърчават използването на нови техники за генетична модификация, известни като **редактиране на гени в растителните култури, животните и микроорганизмите.** Една от основните техники, която е привлякла любопитството на учените и на индустрията и нейните поддръжници, е техниката за редактиране на гените CRISPR/Cas.

Съдържание:

- Каква е разликата между ГМО (GMO) и генно редактирани организми (GEO via NGT) посредством нови геномни техники? – стр. 1 - 12
- Прецизност и ефективност на инженерните нуклеази – стр. 13 - 32
- Възможности за откриване на направени промени в генома – стр. 33 - 35
- „Демократизацията“ на НГТ и патентните права – стр. 36 – 39
- Дебат в Европейския съюз по предложението за ново законодателство за НГТ – стр. 39 – 40
- Социологически проучвания - бързина при разработката на НГТ и приемането им от обществото. Изводи и препоръки за оценка на риска, контрол и мониторинг. – стр. 41 - 48
 - Обобщение и заключение на раздела – стр. 48 – 50
- Реалистични ли са заявените претенции за ползите от генното инженерство в земеделието? Становища на големите научни центрове и институти по проекта Регламента на ЕК за NGT. – стр. 50 - 52
- Становище на ANSES – стр. 52 – 62
- Становище на Testbiotech – стр. 63 – 64
- Становище на университета Тюбинген и Асоциацията на еколозите в Германия, Австрия и Швейцария – стр. 65 – 69
- Заключение - за потенциалното практическо приложение на NGT трябва да бъдат зададени няколко ключови въпроса – стр. 69 -70
- Използвана литература – стр. 70 - 75

Каква е разликата между ГМО (GMO) и генно редактирани организми (GEO via NGT) посредством нови геномни техники?

Генетично модифицираните организми (ГМО) са един добре известен пример за биотехнология още от 90-те години на миналия век. Според закона за генно модифицираните организми, ГМО¹ е организъм, постигнат чрез поне една от следните техники и методи на генетична модификация:

1. **Рекомбинантни техники** с използване на нуклеинови киселини, които включват формиране на нови комбинации от генетичен материал чрез вкарването на чужди фрагменти от нуклеинови киселини, произведени извън организма, във вируси, бактериални плазмиди или други векторни системи и включването им в организма-гостоприемник, в който те не се срещат естествено, но в който са способни трайно да се унаследяват;
2. **Техники**, при които има **директно включване в организма на наследствен генетичен материал, създаден извън организма**, в т.ч. микроинжектиране, макроинжектиране и микроинкапсулиране;
3. **Клетъчно сливане** (включително сливане на протопласти) или **хибридизационни техники**, при които живите клетки с нови комбинации от наследствен генетичен материал са създадени чрез сливане на две или повече клетки по методи, които не се срещат естествено.

Генетично модифициран организъм (ГМО) е организъм, чийто геном е конструиран в лаборатория, за да благоприятства фенотипната изява на желани физиологични характеристики или генерирането на желани биологични продукти. В конвенционалното животновъдство, растениевъдството и дори отглеждането на домашни любимци отдавна е практика да се развъждат избрани индивиди от даден вид, за да се създаде потомство, което има желаните черти. При **генетичната модификация** обаче рекомбинантните генетични технологии се използват за създаване на организми, чиито геноми са прецизно променени на молекулярно ниво, обикновено чрез **включване на гени от несвързани видове** организми, които **кодират черти, които не биха били получени лесно чрез конвенционално селективно развъждане**.

Генетично модифицираните организми (ГМО) се създават с помощта на специфични молекулярни методи, които включват рекомбинантна ДНК технология и репродуктивно клониране. При **репродуктивното клониране** ядрото се извлича от клетка на индивида, който трябва да бъде клониран, и се вмъква в енуклеираната цитоплазма на яйцеклетка-гостоприемник (енуклеирана яйцеклетка е яйцеклетка, чието собствено ядро е премахнато). Процесът води до генериране на потомство, което е генетично идентично с индивида донор. **Първото животно**, създадено чрез тази техника на клониране с ядро от възрастна донорна клетка (за разлика от донорен ембрион), беше **овцата Доли**, родена през 1996 г. Оттогава редица други животни, включително прасета, коне и кучета, са създадени чрез технология за репродуктивно клониране. **Рекомбинантната ДНК технология**, от друга страна, включва

¹ ЗАКОН за генетично модифицирани организми - Обн., ДВ, бр. 27 от 29.03.2005 г., в сила от 1.06.2005 г., изм., бр. 88 от 4.11.2005 г., бр. 99 от 9.12.2005 г., в сила от 10.06.2006 г., бр. 30 от 11.04.2006 г., в сила от 12.07.2006 г., бр. 31 от 13.04.2007 г., в сила от 13.04.2007 г., бр. 36 от 4.04.2008 г., изм. и доп., бр. 43 от 29.04.2008 г., бр. 54 от 13.06.2008 г., изм., бр. 74 от 15.09.2009 г., в сила от 15.09.2009 г., бр. 80 от 9.10.2009 г., бр. 82 от 16.10.2009 г., в сила от 16.10.2009 г., изм. и доп., бр. 25 от 30.03.2010 г., изм., бр. 8 от 25.01.2011 г., в сила от 25.01.2011 г., бр. 99 от 16.12.2011 г., в сила от 1.01.2012 г., бр. 68 от 2.08.2013 г., в сила от 2.08.2013 г., бр. 14 от 20.02.2015 г., бр. 58 от 26.07.2016 г., бр. 58 от 18.07.2017 г., в сила от 18.07.2017 г. Сборник закони - АПИС, кн. 4/2005 г., стр. 25

вмъкването на един или повече отделни гени от организъм от един вид в генома на друг. Съобщава се за **заместване на целия геном**, включващо **трансплантация на един бактериален геном в „клетъчното тяло“** или **цитоплазмата на друг микроорганизъм**, въпреки че тази технология все още е ограничена основно до научни приложения.

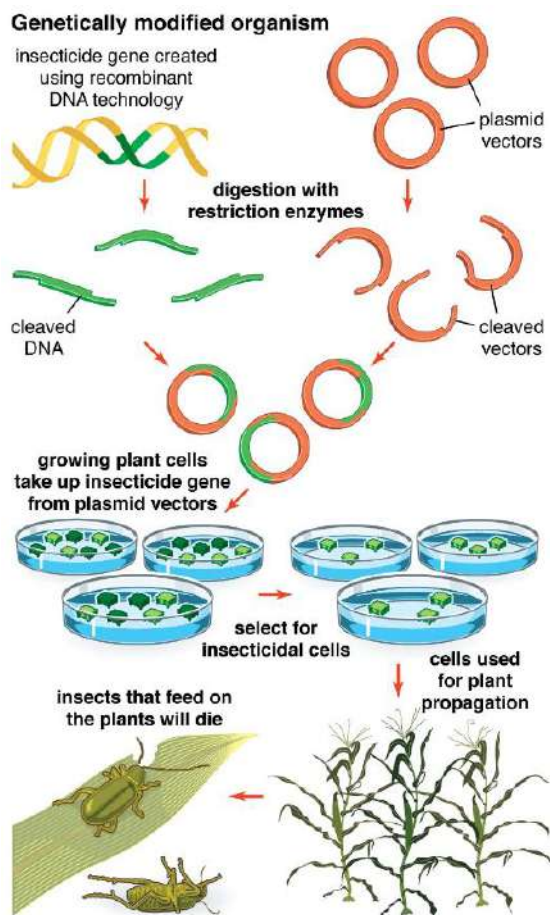
ГМО, създадени чрез генетични технологии, отдавна са част от ежедневието, стабилно внедрени в селското стопанство, медицината, научните изследвания и управлението на околната среда. Въпреки многобройните доказателства за ползите от приложението на ГМО и облагодетелстването на обществото, съществуват и някои недостатъци и производството на ГМО остава силно противоречива тема в много части на света.

ГМО съкращението е дадено от противници на технологията и се е превърнало в ежедневно употребяван термин за описание на всеки организъм, който притежава нова комбинация от генетичен материал, постигната чрез съвременни биотехнологични подходи.

Генетично модифицираните (ГМ) култури за първи път са одобрени за консумация от човека в Съединените щати през 1994 г., а до 2014–15 г. около 90% от царевичата, памука и соята, засадени в Съединените щати, са ГМО. До края на 2014 г. ГМ културите покриват близо 1,8 милиона квадратни километра (695 000 квадратни мили) земя в повече от две дузини страни по света.

Пример за широко разпространена ГМО култура е **Vt памук - сорт памук, който е „проектиран“ да съдържа ген от почвен микроорганизъм, който осигурява присъща устойчивост на вредители**. Този генетичен механизъм за контрол на вредителите цели да намали прилагането на пестициди и да подобри добивите.

Въпреки че само 10 ГМО култури се отглеждат с търговска цел, **ГМО е част от много хранителни матрици** поради съставките, получени от ГМ царевича, соя и захарно цвекло. **ГМО култури, одобрени за продажба основно в САЩ, Канада, Австралия и Китай, са: картофи, тиква, папая, ябълки, рапица, памук и люцерна.**



В генетично модифицираните организми са използвани гени от други организми, за подобряване на желаните черти. Пример е **златния ориз**, в чийто геном е вкаран ген от нарцис *Narcissus pseudonarcissus*, който произвежда ензим, известен като фиотен синтаза и друг ген от почвена бактерия *Erwinia uredovora*, който произвежда ензим, наречен фиотен десатураза, за да се произведе **бета каротин в оризовия ендосперм** – ядливата част от оризовото растение – и така тази модификация позволява на **бета-каротина да се превръща във витамин А в човешкия черен дроб**. Златният ориз е **предназначен да намали дефицита на витамин А сред някои от най-бедните нации** като Филипините, където оризът е основна храна. Златният ориз първоначално е бил предназначен за Азия. През 2004 г. същите изследователи, които разработиха оригиналното растение **златен ориз**, подобриха модела, генерирайки **златен ориз 2**, който показва **23-кратно увеличение на производството на каротеноиди**.

Други ГМ растения са създадени да бъдат устойчиви на специфичен хербицид, а не на естествен хищник или вредител. **Устойчивите на хербициди култури (HRC)** съществуват от средата на 80-те години на миналия век; тези култури позволяват ефективна химическа борба с плевелите, тъй като само **HRC растенията могат да оцелеят в полета, третирани със съответния хербицид**. Много HRC са **устойчиви на глифозат** (например *Roundup*), което позволява **широко приложение на химикала, който е високо ефективен срещу плевели**. Въпреки изтъкнатите ползи, тъй като **HRC насърчават увеличеното прилагане на химикали в почвата, а не намаленото приложение**, те остават противоречиви по отношение на тяхното въздействие върху околната среда. Освен това, за да се намали рискът от селекция на устойчиви на хербициди плевели, фермерите трябва да използват множество разнообразни стратегии за управление на борбата с плевелите.

Създадена е и друга форма на **модифициран ориз**, за да **помогне в борбата с дефицита на желязо** в определени групи от световното население - близо 30 %. Тази ГМ култура е създадена чрез въвеждане в генома на ориза на феритинов ген от обикновения боб *Phaseolus vulgaris*, който произвежда протеин, способен да свързва желязото, както и ген от гъбата *Aspergillus fumigatus*, който произвежда ензим, способен да усвоява съединения, като повишава бионаличността на желязото чрез разграждане на фитат (инхибитор на абсорбцията на желязо).

ГМО технологии не се използват само при животни и растителни култури, а са „**основни играчи**“ и при **биомедицинските изследвания** от 80-те години на миналия век. Например, ГМ животински модели позволиха на изследователите да тестват нови терапии и да изследват ролите на рисковите фактори за човешките генетични заболявания. **ГМ микроорганизмите, растенията и животните също революционизираха производството на сложни фармацевтични продукти**, като позволиха генерирането на по-безопасни и по-

евтини ваксини и терапевтици например рекомбинантна ваксина срещу хепатит В или пък инжекционен инсулин (за диабетици), произведен в ГМ бактерии *Escherichia coli* и фактор VIII (за хемофилици) и тъканен плазминогенен активатор (tPA, за пациенти с инфаркт или инсулт), и двете от които се произвеждат в ГМ клетки на бозайници, отгледани в лабораторни условия. Освен това, в процес на разработка са и **ГМ растения, които влизат в състава на т. нар. „ядливи ваксини“**, които представляват антигенен протеин, който се произвежда в ядивните части на растения и се абсорбира в кръвния ток, когато растението се изяде. Веднъж абсорбиран в тялото, протеинът стимулира имунната система да произвежда антитела срещу конкретен патоген, от който е получен антигенът. **Новите ДНК ваксини се цели да бъдат полезни в борбата за предотвратяване на заболявания като СПИН, туберкулоза и рак.**

Генетичната модификация на насекомите също е важна област на изследване, особено в борбата с векторно преносимите заболявания. Например, създадени са ГМ комари, които експресират малък протеин, наречен SM1, който блокира навлизането на маларийния плазмодий в червата на комара, което пък от своя страна води до прекъсване на жизнения цикъл на паразита. Въвеждането на тези ГМ комари в природата може да помогне за намаляване на предаването на маларийния плазмодий. В друг пример, мъжки комари *Aedes aegypti*, са създадени да са стерилни, или пък такива, които умират преди достигане на полова зрялост. При полеви опити в Бразилия популациите на *A. aegypti* са намалели с 95% след продължително освобождаване на стерилни ГМ мъжки екземпляри.

И не на последно място, **прилагането върху хора на гenna терапия се налага все повече като опция за лечение на заболявания като редки метаболитни нарушения или рак.**

ГМО има и дългогодишна история на приложение и в справянето с екологичните проблеми и околната среда. Например, някои бактерии могат да произвеждат биоразградими пластмаси (В началото на 90-те години *Zeneca* е разработила микробно произведена биоразградима пластмаса, наречена *Biopol* (полихидроксиалканоат или PHA)). Пластмасата е създадена с помощта на ГМ бактерия, *Ralstonia eutropha*, за превръщане на глюкоза и различни органични киселини в гъвкав полимер. Също има разработени ГМО с кодирана способност да метаболизират нефт и тежки метали.

Изброените примери са само част от богатото „портфолио“ на биотехнологиите. Макар привлекателността на огромните предимства, които тези технологии дават, все пак те имат и не малко недостатъци. **Комерсиализирането и приложението на ГМО е затруднено поради строг и изключително скъп регулаторен процес.** Обикновено само добре финансово обезпечени корпорации от частния сектор могат да си позволят да участват в комерсиализацията на ГМО и те са избрали да се съсредоточат върху доходоносни стокони култури.

Друг пример в подкрепа на **не особено високия успех и не напълно предвидимите ефекти от ГМ културите е отглеждане на растения, като картофи, памук и царевица, които носят ген от бактерията *Bacillus thuringiensis*, която произвежда естествен инсектицид, наречен Bt токсин.** Първоначално прилагането на широкоспектърни инсектициди е намаляло в много райони и то в пъти (30–80 %), но след време тези инженерни култури отново принудиха земеделските производители да пръскат с широкоспектърни пестициди през целия вегетационен период поради развила се сред основните вредители по гореизброените култури резистентност към Bt. Така увеличените

в пъти добиви са започнали да спадат на акър земя. Този пример своеобразно доказва, че ползите от подобни ГМ култури намаляват и ефектите са непредсказуеми във времето.

Потенциалните **рискове, свързани с ГМО особено в хранително-вкусовата промишленост също не са малко.** Много екипи от учени са доказали и негативите на приложение на тези биотехнологични инструменти и опасностите, които ГМО могат да представляват за човешкото здраве. Например, **генетичната манипулация може потенциално да промени алергенните свойства на културите.** В дългосрочен план **не е напълно доказано, че ГМ културите изпълняват „обещанието“ за подобрени ползи за здравето.** Освобождаването на ГМ комари и други ГМО в околната среда също предизвиква **безпокойство поради нарушаване на биоразнообразието и естествените еволюционни пътища.** Други рискове са свързани с **потенциалното разпространение на гени от ГМО,** като така биха могли да се образуват в местната флора устойчиви на инсектициди „супербактерии“.

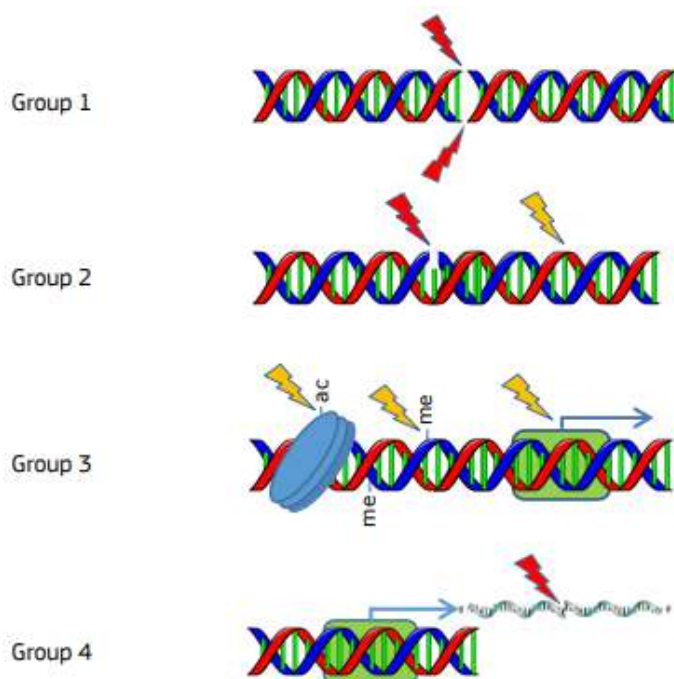
От края на 90-те години на миналия век Европейският съюз (ЕС) отговори на тези опасения, като въведе **строги закони за етикетиране на ГМО.** В началото на 2000 г. всички ГМ храни и ГМ храни за животни в ЕС трябваше да бъдат етикетирани, ако се състоят от или съдържат ГМ продукти в съотношение, по-голямо от 0,9%. За разлика от това, в Съединените щати за храните, съдържащи ГМ съставки, не се изисква специално етикетиране.

Въпреки опасенията на потребителски и здравни групи, особено в Европа, многобройни научни групи, включително Агенцията по храните и лекарствата на САЩ, заключиха, че консумацията на ГМ храни е безопасна, дори в случаите, включващи ГМ храни с генетичен материал от много далечно родство организми. Строгите разпоредби за ГМ продуктите в ЕС доведоха до напрежение в търговията и в края на 90-те години ЕС обяви мораториум върху вноса и използването на ГМ култури. Въпреки това, забраната, която доведе до търговски спорове с други страни, особено Съединените щати, където ГМ храни бяха приети открито, беше счетена за неоправдана от Световната търговска организация. В резултат на това ЕС въведе регулаторни промени, които позволиха вноса на определени ГМ култури. В Европа обаче се култивира само една ГМ култура, вид устойчива на вредители царевица. Някои държави, включително някои африкански държави, също са отхвърлили ГМ продуктите. Други страни, като Канада, Китай, Аржентина и Австралия, имат отворени политики за ГМ храни.

Използването на ГМО в медицината и изследванията също предизвиква дебат поради несигурността на тяхната ефективност и поради етични опасения. Обществеността има опасението, че **настоящите подходи на генната терапия може един ден да бъдат приложени за създаване на „дизайнерски“ бебета или за удължаване на естествената продължителност на човешкия живот.** Подобно на много други технологии, генната терапия и производството и прилагането на **ГМО могат да се използват за адресиране и разрешаване на сложни научни, медицински и екологични проблеми, но трябва да се използват разумно.** Точно поради гореизложените причини, част от разработените ГМ организми или са на етап „теория на вероятностите“ или са само в обсега на лабораторните разработки и не са пуснати на пазара.

Редактирането на гени или на генома посредством нови геномни техники (GEO via NGT) наскоро „излезе на сцената“ като **важен механизъм за подобряване на растителните култури, животинските видове и микроорганизмите.** Инструментите за редактиране на

гени се използват за генериране на промени в естествения генетичен материал. За разлика от ГМО, които въвеждат нови конфигурации на генетични материали, обикновено извлечени от други организми, методите за редактиране на гени модифицират съществуващия генетичен материал по начини, които могат да доведат до определени резултати. Редактирането на генома или редактирането на генни групи е вид генно инженерство, при което фрагмент ДНК се вмъква, изтрива, модифицира или заменя в генома на жив организъм. За разлика от ранните техники за генно инженерство, които произволно вмъкват генетичен материал в генома на гостоприемника, редактирането на генома насочва вмъкванията към специфични локуси в генома. Основният механизъм на действие на новите геномни техники е чрез програмируеми нуклеази да се разпознаят целевите геномни локуси и да се свърже ефекторния ДНК-свързващ домейн (DBD), или да се осъществят двувърижни скъсвания (DSB) в целевата ДНК от рестрикционните ендонуклеази (FokI и Cas) или да се възстановят DSB чрез хомоложна рекомбинация (HDR) или нехомоложно крайно свързване (NHEJ).



върху ДНК.

Група 1 включва техники, които разчитат на индукция на DSB, последвано от опит на клетката да го поправи. Гамата от молекулярни инструменти, които могат да причинят DSB, включва SDN и ензими, които разпознават целевата ДНК чрез взаимодействия протеин-ДНК, като ендонуклеази, нуклеази тип цинкови пръсти (ZFN) и наподобяващи транскрипционно активаторни нуклеази (TALEN) и нуклеази, които разчитат на целенасочено взаимодействие между РНК и ДНК (система CRISPR/Cas9).

Група 2 съдържа механизми за редактиране на генома, които индуцират SSB, вместо DSB. Олигонасочена мутагенеза, базово редактиране и първично редактиране принадлежат към тази група, но последната е единствената, разглеждана в рамките на мандата на ЕК, тъй като е доказано, че позволява вмъкване на дълги екзогенни последователности (< 100 bp), в целевия локус (Anzalone et al., 2022).

Докладът на JRC (JRC, 2021 г.²) разделя NGT на четири основни групи:

- **Група 1** се състои от NGT, които създават DSB в ДНК. Тази група включва т.нар. „сайт насочени нуклеази (SDN)“.
- **Група 2** се състои от NGT, които създават едновърижни скъсвания (SSB) или никакво скъсване в ДНК веригите.
- **Група 3** включва техники, които засягат епигенома, с промени, които засягат начина, по който се експресира ДНК.
- **Група 4** включва NGT, които действат директно върху РНК, а не върху ДНК.

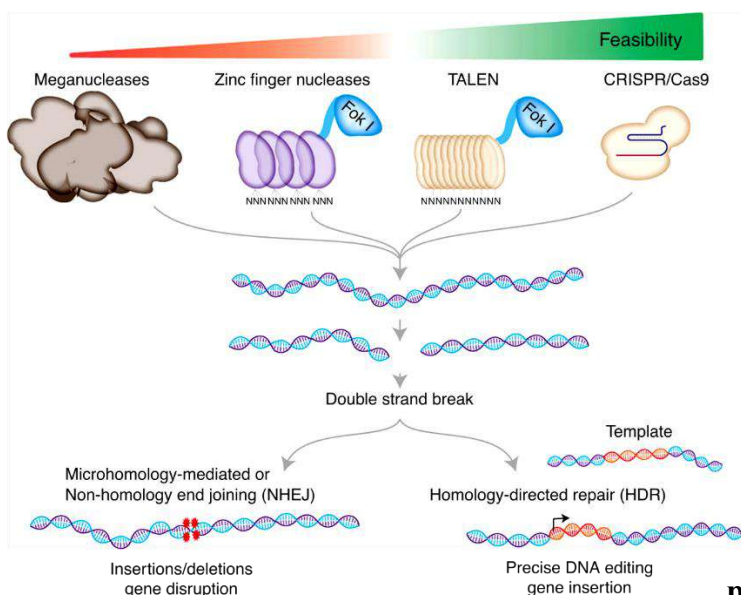
² New Genomic Techniques: State-of-the-Art Review – JRC technical report

<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/5a661f2b-a180-11eb-b85c-01aa75ed71a1/language-en>

Третата група (група 3) обхваща NGT, които засягат епигенома, а не генома. Тези NGT индуцират промени, засягащи начина, по който ДНК последователността се чете и транскрибира в РНК. Също така в този случай NGT разчитат на основни механизми на група 1 NGT, но добавят различна функционалност към тях.

И накрая, **четвъртата група (група 4)** включва NGT, които действат директно върху РНК вместо върху ДНК, съставлявайки отделен набор от NGT. Някои от тези РНК-действащи NGT също са произлезли от един от механизмите на NGT група 1.

Съществуват множество инструменти за редактирането на гени, но **CRISPR/Cas е най-често използваният**. В резултат на това терминът CRISPR понякога се използва взаимозаменяемо за редактиране на гени. Към днешна дата **генното редактиране е приложено към голямо разнообразие от растения и животни, включително плодове, зеленчуци, риба, ориз и други популярни храни**. Някои от тези генно редактирани продукти вече са на пазара.



Регулаторната рамка, управляваща редактирането на гени, все още е в начален етап на разработване и като цяло целта е да бъде не толкова рестриктивна като законовата рамка, регулираща ГМО. Либерализирането на регулаторните механизми ще улесни появата на генно редактирани продукти, създадени и от институции в публичния сектор.

Както ГМО, така и генната редакция целят да предлагат мощни

инструменти за увеличаване на добивите, адаптиране към изменението на климата, подобряване на хранителните качества на храните, подобряване на хуманното отношение към животните и разработване на продукти с много други важни характеристики. Основният въпрос обаче, стоящ на дневен ред пред потенциала на тези технологии е: **На каква цена ще бъдат постигнати тези нови характеристики или как те ще се отразят в дългосрочен план?** Тъй като може да се каже, че няма такова нещо като „безплатен обяд“: огромният технически потенциал на инструменти, като генни ножици CRISPR/Cas, също предизвиква нови и специфични рискове. И двете: предназначенията промени и нежеланите ефекти могат да се различават значително от тези, които могат да бъдат причинени от нецеленасочена мутагенеза и конвенционални кръстосвания. Следователно не могат да се направят общи заключения относно безопасността на растенията/животните/микроорганизмите, получени от процесите на NGT, без подробна оценка на риска.

Редактирането на генома е въведено още през 90-те години на миналия век, преди появата на обичайните настоящи механизми за генна редакция, базирани на използването на прогамируеми нуклеази, но употребата му е била ограничена до лабораторна среда поради

ниската ефективност на техниките за редактиране на генома и високата цена за постигане на целевите ефекти.

Един от недостатъците на технологията за генна редакция е случайният характер, с който ДНК се вмъква в генома на гостоприемника, което може да увреди или промени други гени в организма (Woolf, T., 1998). Въпреки това са открити няколко метода, които насочват вмъкнатите гени към специфични места в генома на редактирания организъм. По този начин се намалява вероятността за възникване на нецелеви ефекти, но това е само на теория и в лабораторни контролирани условия. Затова и тези технологии може да се използват за изследователски цели, чрез насочване на мутации към специфични гени и в генната терапия. Чрез вмъкване на функционален ген в организъм и насочването му да замени дефектния, може да бъде възможно да се излекуват определени генетични заболявания, но това е само на теория.

Насочване към гени

Хомоложна рекомбинация

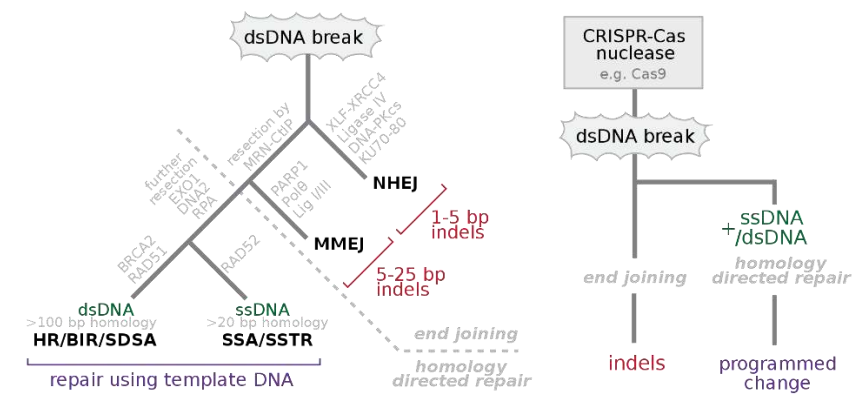
Ранните методи за насочване на гени към определени места в генома на организъм (наречени генно насочване) са разчитали на хомоложна рекомбинация (HR). Чрез създаване на ДНК шаблон, който съответства на целевата последователност в генома, е възможно HR процесите в клетката да вмъкнат ДНК фрагмента на желаното място. Пример за прилагане на хомоложна рекомбинация е създаване на трансгенни мишки с „изключени“ целеви гени. Също така чрез този метод е възможно да се повлияят гени или да се променят моделите на генна експресия. Като признание за това откритие как хомоложната рекомбинация може да се използва за въвеждане на генетични модификации в мишки чрез ембрионални стволови клетки, Марио Капечи, Мартин Еванс и Оливър Смитис са получили Нобелова награда за физиология и медицина за 2007 г.

Условно насочване

Ако жизненоважен ген бъде изключен („*gene knock out*“), това може да се окаже смъртоносно за организма. За да се изследва функцията на тези гени, са използвани сайт-специфични рекомбинази (SSR). Двата най-често срещани типа са системите *Cre-LoxP* и *Flp-FRT*. Сре рекомбиназата е ензим, който премахва ДНК чрез хомоложна рекомбинация между свързващи последователности, известни като *Lox-P* места. Системата *Flp-FRT* работи по подобен начин, като рекомбиназата *Flp* разпознава *FRT* последователности. Чрез кръстосване на организъм, съдържащ рекомбиназните локуси, фланкиращи целевия ген, и организъм, който експресира SSR под контрола на тъканно специфични промотори, е възможно да бъде изключен или включен ген или група от гени само в определени клетки. Тези техники се използват и за отстраняване на маркерни гени от трансгенни животни. По-нататъшни модификации на тези системи позволяват на изследователите да индуцират рекомбинация само при определени условия, позволявайки гените да бъдат изключени или експресирани в желани моменти или етапи на развитие.

Поправка на двойноверижно скъсване на ДНК

Пътища за възстановяване на dsDNA скъсване и редактиране на геном с помощта на CRISPR-Cas нуклеази

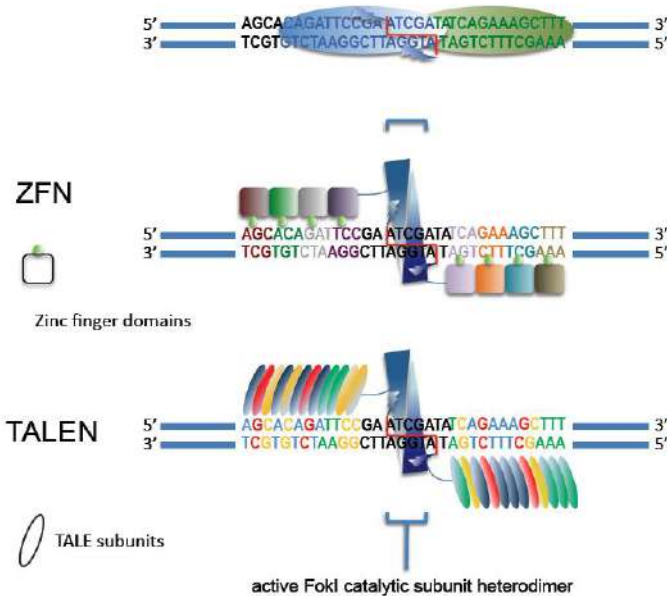


Често срещан механизъм за редактиране на генома разчита на концепцията за възстановяване на двойно верижно скъсване на ДНК (DSB). Има два основни пътя, които възстановяват DSB: **нехомоложно свързване на краищата**

(NHEJ) и **хомоложно насочено възстановяване (HDR)**. NHEJ използва различни ензими за директно свързване на краищата на ДНК, докато по-точният HDR използва хомоложна последователност като шаблон за регенериране на липсващи ДНК последователности в точката на скъсване. При тази технология може да се използва създаване на вектор с желаните генетични елементи в рамките на конкретна последователност, която е хомоложна на страничните последователности на DSB, което ще доведе до вмъкване на желаната промяна в мястото на DSB. Редактирането на гени, базирано на HDR, е подобно на насочването на гени, базирано на хомоложна рекомбинация, като скоростта на рекомбинация се увеличава с най-малко три порядъка.

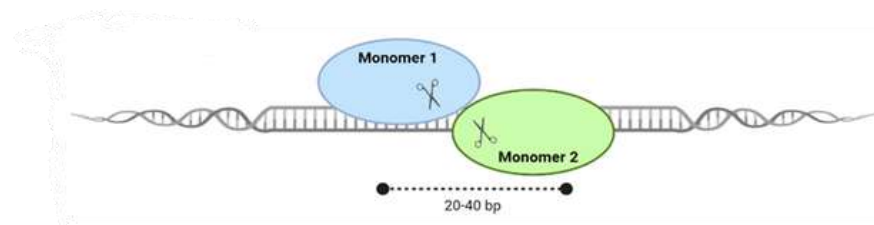
Групи проектирани/“дизайнерски“ нуклеази (*Genome editing with engineered nucleases (GEEN)*)

Основата на редактирането на генома се крие в създаването на DSB в определен/а точка/локус от генома. Често използваните рестрикционни ензими са ефективни при разрязване на ДНК, но обикновено разпознават и разрязват на множество места. За да се преодолее това предизвикателство и да се създаде специфично за конкретен локус DSB, към днешна дата са открити и създадени три различни класа нуклеази. Това са нуклеазите тип цинкови пръсти (ZFNs), транскрипционно активаторни ефекторни нуклеази (TALEN), мегануклеази и кълстерната система с къси палиндромни повторения (CRISPR/Cas9).



Мегануклеази

Мегануклеазите, открити в края на 80-те години на миналия век, са ензими от семейството на



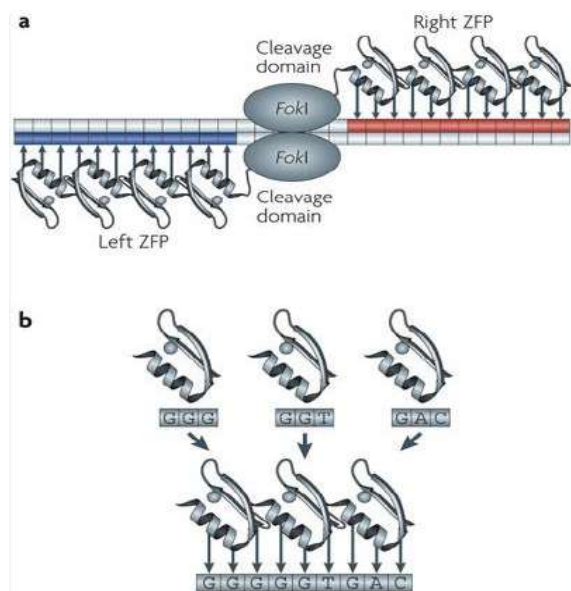
ендонуклеазите, които се характеризират със **способността си да разпознават и разрязват**

големи ДНК последователности (от 14 до 40 базови двойки). Най-разпространените и най-известни мегануклеази са **протеините от семейството LAGLIDADG**, които дължат името си на консервативна аминокиселинна последователност.

Мегануклеазите, срещани често в микробни видове, имат уникалното свойство да разпознават много дълги последователности (>14bp), което ги прави естествено много специфични. Въпреки това, **практически няма шанс да се намери точната мегануклеаза, необходима за редакция на избрана специфична ДНК последователност.** За да се преодолее това предизвикателство, са използвани мутагенеза и високопроизводителни методи за скрининг за създаване на **синтетични мегануклеазни варианти, които разпознават уникални последователности.** Екипи от учени са успели да комбинират различни мегануклеази и да създадат хибридни ензими, които разпознават конкретна последователност. Други екипи от учени обаче са се опитали да **променят взаимодействащите с ДНК аминокиселини на мегануклеазата, за да проектират специфични за последователността мегануклеази чрез метод, наречен рационално проектиране на мегануклеаза.** Друг подход включва използването на компютърни модели, за да се предвиди възможно най-точно активността на модифицираните мегануклеази и специфичността на разпознатата нуклеинова последователност.

Мегануклеазите са **по-специфични спрямо разпознаването на ДНК последователността**, сравнени с нуклеази тип цинкови пръсти, но пък за сметка на това **приложението им е по-скъпо и времеемко.**

Нуклеази тип цинкови пръсти (ZFN)



За разлика от мегануклеазите, ZFN и технологията TALEN включват **неспецифичен каталитичен домен за рязане на ДНК**, който след това може да **бъде свързан със специфична ДНК последователност, разпознаваща пептиди като цинкови пръсти и ефектори, подобни на активатор на транскрипция (TALE).**

В ZFN всеки отделен цинков пръст се свързва с три нуклеотидни двойки в ДНК, докато в TALEN всяко повторение свързва една ДНК последователност. Тази характеристика прави **всяка ДНК последователност теоретична мишена на TALEN.** ZFN са подобрили значително ефективността на генетичното насочване (от 10^{-6}

на 10%), но **недостатъците, свързани с нецелевото разцепване, цитотоксичността и ограничените целеви сайтове**, ограничават техните приложения в промишлеността (Cornu et al. 2008). TALEN показват съпоставими предимства, включително дори по-висока ефективност, по-ниска цитотоксичност и относителна лекота на генериране на хомозиготни мутанти.

Нуклеазите тип цинкови пръсти (ZFN) имат отделни ДНК-свързващи и ДНК-разцепващи домейни. Chandrasegaran u Li et al. 1992 наблюдават, че тези синтетични протеини FokI имат физически разделени активности на свързване и разцепване. Домейнът на разцепване няма очевидна специфичност към последователността. Набор от Cys2His2 цинкови

пръсти (ZF), в които всяка единица от ~30 аминокиселини свързва един атом цинк в кристална структура с целевата ДНК, показва, че всеки пръст свързва предимно 3 bp ДНК, което предполага, че много различни последователности могат да бъдат атакувани чрез създаване на нови комплекси от ZF и ДНК. Цинковият йон, открит в 8% от всички човешки протеини, играе важна роля в организацията на тяхната триизмерна структура.

ZFN са инструменти, използвани за модифициране на редица геноми, по-специално американската компания Sangamo BioSciences използва нуклеази тип цинкови пръсти за

Organisms	Genes	Methods of ZFN development
Gene disruption		
Fruitflies	<i>yellow, rosy, brown</i>	Modular assembly
Zebrafish	<i>kar</i>	Bacteria one-hybrid
	<i>golden, no tail</i>	Two-finger modules
Human T cells	<i>trf2, dat, telomerase</i>	OPEN
	CCR5	Two-finger modules
Rats	<i>Rab38, IgM, IL2rg</i>	Two-finger modules
Gene correction		
Tobacco	<i>SuRA, SuRB</i>	OPEN
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ABI4, KU80</i>	Modular assembly
	<i>TT4, ADH1</i>	OPEN
Fruitflies	<i>yellow, rosy, coilin, paxk</i>	Modular assembly
Human T cells	<i>IL2RG</i>	Two-finger modules
Gene addition		
Tobacco	<i>Chitinase</i>	Two-finger modules
<i>Zea mays</i>	<i>Ipk1, Zein protein 15</i>	Two-finger modules
Human ES cells	<i>IL2RG, CCR5</i>	Two-finger modules
	<i>PIGA</i>	OPEN

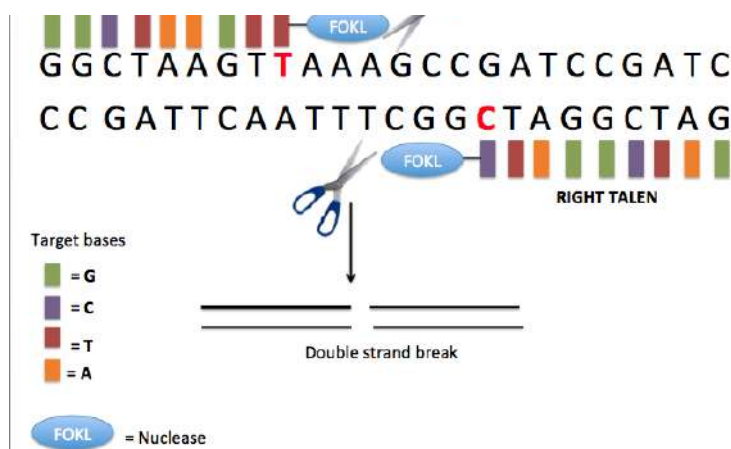
редактиране на стволови клетки и модифициране на имунни клетки за терапевтични цели. Модифицираните Т-лимфоцити в момента са във фаза I на клинични изпитвания за лечение на мозъчни тумори (глиобластом) и в борбата срещу СПИН.

TALEN

Подобните на активатор на транскрипция ефекторни нуклеази (TALEN) са

специфични ДНК-свързващи протеини, които включват набор от 33 или 34-аминокиселинни повторения. TALEN са изкуствени рестрикционни ензими, проектирани чрез сливане на ДНК режещия домейн на нуклеаза с TALE домейни, които могат да бъдат пригодени да разпознават специфично уникална ДНК последователност.

Тези протеини служат като прицелни



"ДНК ножици" за редактиране на гени, които позволяват да се извършват целенасочени модификации в генома като вмъкване на последователност, изтриване, възстановяване и заместване в живи клетки. TALEN може да създаде двойно верижно скъсване на целевото място, което може да бъде поправено чрез склонно към грешки нехомоложно свързване на краищата (NHEJ), което води до прекъсване на гена чрез въвеждане на малки вмъквания или делеции. Всяко повторение се запазва, с изключение на така наречените повторени променливи двойни остатъци (RVD) в аминокиселинни позиции 12 и 13. RVD определят ДНК последователността, към която TALE ще се свърже. Това просто съответствие между повторенията на TALE и съответната ДНК последователност прави процеса на сглобяване на масиви от повторения за разпознаване на нови ДНК последователности лесен. TALEN конструкциите съчетават специфичност и активност, ефективно генерирайки проектирани специфични за последователността нуклеази, които свързват и разцепват ДНК последователности само на предварително избрани места. TALE нуклеазите са специфични за тяхната мишена поради отчасти дължината на тяхното място за свързване от 30+ базови

двойки. TALEN може да се приложи в диапазон от 6 базови двойки на всеки отделен нуклеотид в целия геном.

TALEN имат **три предимства** при целенасочена мутагенеза: (1) **специфичността** на свързване с ДНК е по-висока от тази на мегануклеазите и ZFN, (2) **ефектите извън целта са по-малко** и (3) **конструкцията на свързване с ДНК домейни е по-лесно**.

CRISPR

CRISPR (Клъстерирани кратки палиндромни повторения) са генетични елементи, които бактериите използват за защита срещу вируси. Тези елементи се състоят от **къси последователности, които произхождат от вирусни геноми и са включени в бактериалния геном**. Cas (протеини, свързани с CRISPR) обработват тези последователности и изрязват съпадащи вирусни ДНК последователности. Чрез въвеждане на плазмиди, съдържащи Cas гени и специфично конструирани CRISPR системи в клетките, **геномът може да бъде отрязан на всяка желана позиция**. Чрез системата CRISPR-Cas **може да се прави редакция на единична база или множество редакции на група гени в генома**.

Към групата на CRISPR спада и **ARCUT (изкуствен рестрикционен ДНК нож)**, техника, която използва **псевдокомплементарна пептидна нуклеинова киселина (pcPNA)** за **идентифициране на мястото на разцепване в хромозомата**. След като pcPNA „уточни“ мястото, ексцизията се извършва с церий (CE) и EDTA, която изпълнява функцията на снаждане.

Прецизност и ефективност на инженерните нуклеази

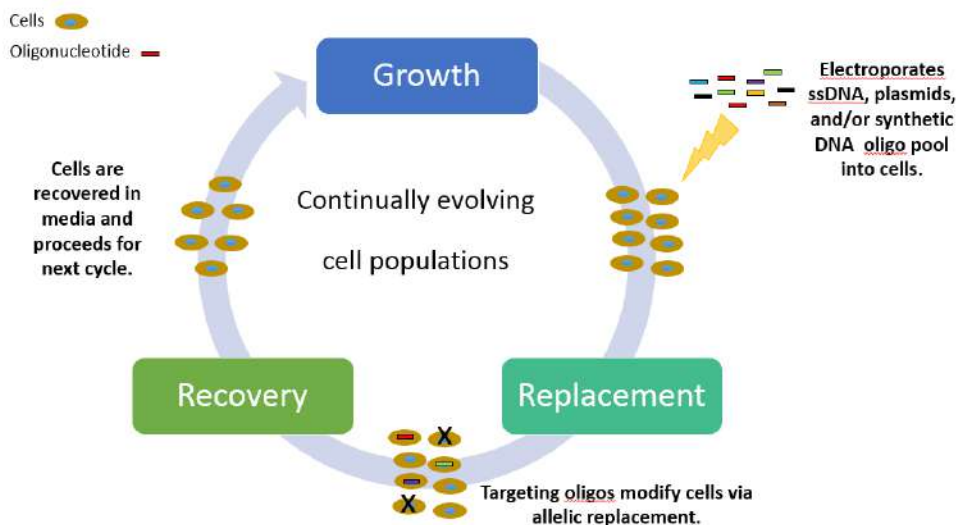
Мегануклеазният метод за редактиране на гени е **най-малко ефективният** от споменатите по-горе методи. Поради естеството на неговия ДНК-свързващ елемент и разцепващия елемент, той е ограничен до **разпознаване на една потенциална мишена на всеки 1000 нуклеотида**. ZFN е разработен, за да преодолее ограниченията на мегануклеазата. **Броят на възможните цели, които ZFN може да разпознае, е увеличен до един на всеки 140 нуклеотида**. И двата метода обаче са **непредсказуеми, тъй като техните ДНК-свързващи елементи си влияят взаимно**. В резултат на това са необходими **високи степени на експертен опит и дълги и скъпи процеси на валидиране**. TALE нуклеазите са **най-прецизният и специфичен метод**, който дава **по-висока ефективност** от предишните два метода. Той постига такава ефективност, защото ДНК-свързващият елемент се състои от масив от TALE субединици, всяка от които има способността да разпознава специфична ДНК нуклеотидна верига, независима от другите, което води до **по-голям брой целеви места и висока точност**. Създаването на нови TALE нуклеази отнема около една седмица и няколко стотин долара със **специфичен опит в молекулярната биология и биоинженерството**. Нуклеазите CRISPR имат малко по-ниска точност в сравнение с нуклеазите TALE. Доказано е, че **CRISPR е най-бързият и най-евтиният метод**, струващ само **по-малко от двеста долара и няколко дни време**. CRISPR също така **изисква най-малко опит в молекулярната биология**, тъй като дизайнът се основава на водещата РНК вместо на протеините. Едно основно предимство, което CRISPR има пред методите ZFN и TALEN, е, че **може да бъде насочен към различни ДНК последователности**, използвайки своите ~80nt CRISPR sgRNAs, докато и двата метода ZFN и TALEN изискват изграждане и тестване на протеините, създадени за насочване на всяка ДНК последователност.

Въпреки изброените положителни характеристики на дизайнерските нуклеази, все пак нецелевата активност стои като проблем на дневен ред и би имала потенциално опасни последици на генетично и организмово ниво, затова и прецизността на тези инструменти е активна област на изследване. Освен това ZFN имат по-голяма цитотоксичност от TALEN методите или PНК-насочваните нуклеази, докато TALEN и PНК-насочваните подходи имат най-голяма ефективност и по-малко нецелеви ефекти.

Мултиплексно автоматизирано геномно инженерство (MAGE)

Multiplex Automated Genome Engineering, или MAGE, е техника за редактиране на генома, която позволява на учените бързо да редактират ДНК на организма, за да произведат множество промени в генома. През 2009 г. двама генетични изследователи от Института Wyss към Харвардското медицинско училище в Бостън, Масачузетс, Харис Уанг и Джордж Чърч, са разработили технологията във време, когато изследователите са могли да редактират само едно място в генома на организма наведнъж. Създателите *Harris Wang* и *George Church* са нарекли инструментът MAGE форма на „ускорена еволюция“, защото създава различни клетки с много вариации на един и същ оригинален геном в продължение на множество поколения. MAGE е направило редактирането на генома много по-бързо, по-евтино и по-лесно за изследователите да създават организми с нови функции, които те могат да използват за различни цели, като производство на лекарства, разработване на биогорива или по-нататъшно изучаване и разбиране на гените, които могат да причинят вредни мутации при хората. Но преди да могат да се използват техники като MAGE за редактиране на генома, първо трябва да се проведе целогеномно секвениране на целеви геном и да се направи подробно геномно картиране, за да се знае точната нуклеотидна подредба. Използвайки техники като MAGE може да се промени функцията на клетките чрез манипулиране на нейния генетичен код. Инженерите могат да премахнат нуклеотиди, да вмъкнат допълнителни или да заменят нуклеотиди, което променя реда на ДНК. Това означава, че ДНК ще кодира различна аминокиселина, която след това променя функцията на получения протеин. Дори само една редакция може да повлияе на клетката, а извършването на няколко от тези промени на много места в генома може значително да промени начина, по който клетката функционира. Генетиците могат да намножават клетките с редактиран геном с цел разпространяване на промяната в други клетки. С достатъчно генетично редактирани клетки, генните инженери могат потенциално да променят функциите на цели организми, но това би била груба намеса в еволюционните пътища на организмите, както и настъпването на непредвидими дългосрочни ефекти.

Синтетична ДНК се въвежда многократно в множество целеви области на хромозомата и/или



локуси и след това се репликира, произвеждайки клетки с/без мутации. MAGE е мощна технология, която цели да подобрява процеса на редактиране на генома *in vivo*.

Синтетичната едноверижна ДНК (ssDNA) и набор от олигонуклеотиди

се въвеждат в целеви области на клетката, като по този начин се създават генетични модификации. Цикличният процес включва трансформация на ssDNA (чрез електропорация), последвана от израстване, по време на който хомоложните рекомбинантни протеини на бактериофаг медираят отправянето на ssDNA към техните мишени в целевия геном. Всеки цикъл в крайна сметка отнема 2,5 часа за обработка, с допълнително време, необходимо за израстване и намножаване на клетъчните култури и характеризиране на мутациите. Чрез итеративно въвеждане на библиотеки от мутагенни ssDNA, насочени към множество локуси, **MAGE може да генерира комбинаторно генетично разнообразие в клетъчна популация.** Може да има до 50 редакции на генома, от единични нуклеотидни базови двойки до цял геном или генни групи едновременно. **MAGE технологията** може да бъде разделена на **три класа**, характеризиращи се с различни степени на мащаб и сложност: (i) много целеви места, единични генетични мутации; (ii) единично целево място, много генетични мутации; и (iii) много целеви места, много генетични мутации. Пример за приложение на MAGE технология е програмирана *Escherichia coli*, която да произвежда пет пъти повече от нормалното количество ликопен, антиоксидант, който обикновено се намира в семената на домати и има противоракови свойства. MAGE се прилага и за оптимизиране на метаболитния път на 1-дезоксид-ксилоза-5-фосфат (DXP) в *Escherichia coli* за свръхпроизводство на изопреноид ликопен. Тези научни постижения са отнели на екипът от учени около 3 дни и малко над \$1000 за материали. Звучи примамлива лекотата, бързината и ефективността на тази технология за редакция на генома, но поради комплицирания изключително сложен процес и респективно достъпността му и поради множеството промени кои в целта кои извън целевите локуси в генома могат да настъпят неочаквани и непредвидими промени във функционално, физиологично и от всякакво естество, да не говорим за злоупотребите с тези технологии и начина, по който биват използвани от индустрията, в производството на важни съединения, в биоинженерството, в биоенергетиката, в биомедицината, синтетичната биология, фармацевтичната и селскостопанската и химическата промишленост.

В заключение, новите инструменти за редактиране на генома допълнително увеличават обхвата на възможните геномни модификации, както и тяхната сложност. Това улеснява развитието на голямо разнообразие от нови черти, включително черти, които се установяват чрез комплексни изменения на метаболитни пътища, водещи до значителни физиологични и морфологични промени. Освен това все още се наблюдава нецелева активност

за повечето от новоразработени подходи, включително редактиране на база, инструменти за редактиране на ДНК на органели, както и епигенетични редактори (*Kempton и Qi, 2019*).

Схематично представени методите на класическа селекция, нови геномни техники за редактиране на генома и техники за генетична модификация и целевите и извън целта ефекти, до които довеждат:



РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

Министерство на земеделието и храните
Център за оценка на риска
 по хранителната верига



		Техники на конвенционално развъждане		Утвърдени техники на генетична модификация	Нови геномни техники				
					Редактиране на генома				
		Класическо кръстосване	Класическа мутагенеза	Трансгенеза	Цисгенеза	Интрагенеза	(SDN3)	Целева мутагенеза (SDN2)	Целева мутагенеза (ODM, SDN1)
Желани модификации	Дълги генни инсерции	Не	не	Да (нецелев)	Да	Да	Да	Не	Не
	Делеции и/или малки инсерции	Не	Да (нецелев)	Не	Не	Не	Не	Да (целев)	Да (целев)
	Точкови мутации	Не	Да (нецелев)	Не	Не	Не	Не	Да (целев)	Да (целев)
	Мбожествени геномни промени	Не	Не	Не	Не	Не	Да	Да	Да
	Локус специфични промени	Не	Не	Не	Не	Не	Да	Да	Да
	Модификация в РНК	Не	Не	Не	Не	Не	Не	Не	Да
	Промяна в генната експресия	Не	Да (нецелев)	Да	Не	Да	Да	Да	Да
	Промяна в епигенома	Не	не	Да (нецелев)	Не	Не	Не	Не	Да
Общи нежелани модификации	Общи нежелани модификации	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
	Нежелани модификация в целевото място	Не се отнася	Не се отнася	Не се отнася	Да	Да	Да	Да	Да
	Наличие на екзогенна ДНК в продукта	Не	Не	Да	Да	Да	Да	Да	Не
	Селективен маркер	Не	Не	Да	Да	Да	Не	Не	Не
	Необходимост от прилагане на метод за доставка на екзогенна ДНК	Не	Не	Да	Да	Да	Да	Да	Да
	Регенерация посредством клетъчни култури	Не	Не (in vivo) Да (in vitro)	Да	Да	Да	Да	Да	Да

Amber Gree

1618, гр. София, бул. "Цар Борис III"

<https://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

ISO 9001

BUREAU VERITAS
 Certification



427 30 56



РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

Министерство на земеделието и храните
Център за оценка на риска
по хранителната верига



Друго приложение на програмираните дизайнерски нуклеази е **генната терапия при хора и така нареченото „изкореняване на болести“**, което само по себе си звучи доста обещаващо, но не и на практика поради не напълно разгаданите ефекти от приложението на новите геномни техники и дългосрочния им ефект. В идеалния теоретичен случай успешната генна терапия е тази, която замества дефектния ген с нормален на неговото естествено място. Това е по-добрият вариант от вирусно „доставен“ синтетичен ген, тъй като няма нужда да се включват пълните кодиращи последователности и регулаторни последователности, когато трябва да се променят само малки части от гена, както често се случва. Експресията на частично заменените гени също е по-съвместима с нормалната клетъчна биология, отколкото пълните гени, които се пренасят от вирусни вектори. **Първата клинична употреба на генна терапия е базирано на TALEN редактиране на генома при лечението на CD19+ остра лимфобластна левкемия при 11-месечно дете през 2015 г.** Редактирани донорни Т клетки са проектирани да атакуват левкемичните клетки, да бъдат резистентни към алемтузумаб и да избягват откриване от имунната система на гостоприемника след въвеждане.

Проведени са и обширни изследвания в животински моделни клетки, като е използвана **CRISPR-Cas9** технология, за да се коригират генетични мутации, които причиняват генетични заболявания като синдром на Даун, спина бифида, аненцефалия и синдроми на Търнър и Клайнфелтер. През февруари 2019 г. учени, работещи със Sangamo Therapeutics, са обявили първата по рода си терапия за редактиране на човешки гени "в тялото" за трайна промяна на ДНК при пациент със синдром на Хънтър. Клиничните изпитвания от Sangamo все още продължават.

С цел борба с векторно преносимите заболявания, изследователите са използвали **CRISPR-Cas9** генни редакции, за да модифицират определени гени, водещи до стерилитет в *A. gambiae*, векторът за малария.

Проучват се **антивирусни приложения за терапии, насочени към човешки вируси като HIV, херпес вирус и вирус на хепатит В.** През ноември 2018 г. **He Jiankui** в своето проучване е обявил, че е редактирал два човешки ембриона (близначките Лулу и Нана), за да се опита да деактивира гена за **CCR5**, който кодира рецептор, който HIV използва, за да навлезе в клетките. Момичетата все още носят функционални копия на **CCR5** заедно с деактивиран **CCR5** и все още са уязвими към ХИВ. Работата беше широко осъдена като неетична, опасна и неморална. Първата болест, с която този учен е искал да се справи, е мускулната дистрофия на Дюшен, или **DMD**, рядко и опустошително генетично заболяване, което причинява постепенна загуба на мускулна маса и засяга изключително момчета. Думите на учения са: „Те страдат. Искам да им помогна.“ Целта му е да направи **генната терапия по-достъпна и да бъде предлагана от организации с нестопанска цел така че да бъде достъпна за повечето семейства.** Завръщането на този учен към науката след присъдата му повдига сериозни въпроси за това дали трябва да бъде приет обратно в научната общност и как трябва да се гледа на изследователската му последваща работа. В документален филм „*Make People Better*“ подробно е описана аферата *He*.

☐ Amber ☐ Green ☒ White

1618, гр. София, бул. "Цар Борис III" № 136; тел. +359 2 427 30 56
<https://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg



При животните, през януари 2019 г. учени в Китай са съобщили за създаването на пет идентични клонирани маймуни с редактирани гени, използвайки същата техника за клониране, която е използвана с *Zhong Zhong* и *Hua Hua* – първите в историята клонирани маймуни – и овцата Доли, и същата техника за генна редакция CRISPR-Cas9, за която е използвана от *He Jiankui* при създаването на първите генно модифицирани ембриони - бебетата Лулу и Нана. Клонингите на маймуни са създадени с цел изследване на няколко медицински заболявания.

Горепосочените техники и приведените примери към тях не са изчерпателен списък, тъй като тези технологии търпят постоянно развитие, като с това крият и много рискове, непознати и неохарактеризирани до момента, да не говорим пък да са изпитани във времето.

В бъдеще първа цел преди внедряването в практиката на редактирането на генома е подобряването на безопасността и специфичността на действието на нуклеазите и подобряването на възможността за откриване на събития извън целта и повишаване на специфичността на синтетичните ензими. Също немаловажна цел е да се оцени дългосрочния риск от приложението и пускането на пазара и в околната среда на продукти/организми, които съдържат генна редакция, изследване на токсичността на продуктите от редактирани организми, анализ на вероятни алергени, образувани при промяна на генни локуси и образуването на нови протеини, неизследвани до момента.

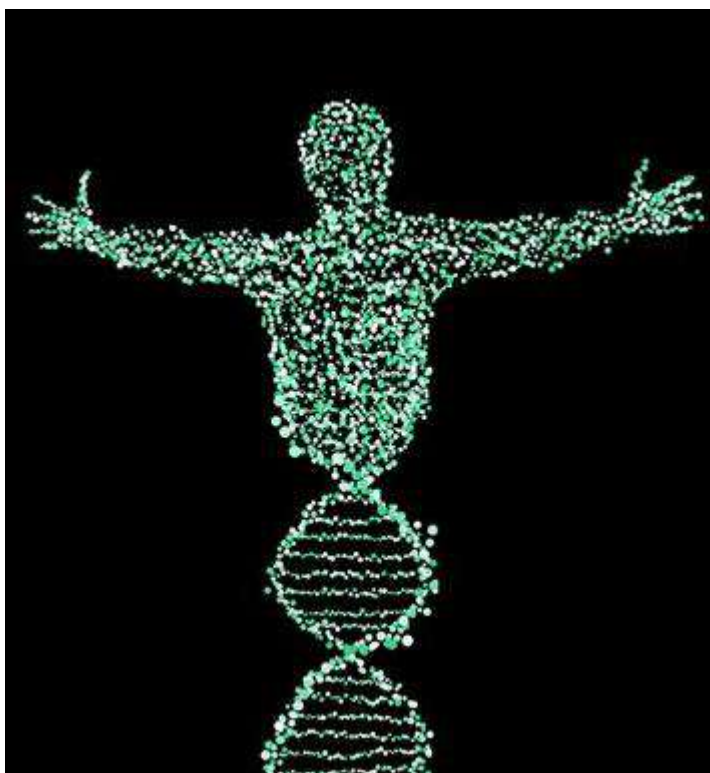
В допълнение, изследванията на *Dana Carroll* за модифициране на генома с инженерни нуклеази (голяма част от публикациите му са налични на следния линк: <https://carroll.biochem.utah.edu/publications>) показват необходимостта от по-добро разбиране на основните механизми за рекомбинация и възстановяване на ДНК както и оценяване на риска от редакции/модификации извън целта.

Поради лесната употреба и рентабилността на CRISPR, в момента се провеждат обширни изследвания върху прецизността и ефективността му. Въпреки че GEEN има много предимства като по-висока ефективност, прецизност, бързина, тези нови геномни техники все още са далеч от масово приложение и внедряване в индустриалните направления и трябва да бъдат ограничени до лабораторна среда. По данни от много проучвания помалко от половината от редактираните организми в една целева популация получават желаните промени.

При растенията редактирането на генома се разглежда като „жизнеспособно“ решение за опазване на биоразнообразието. *Gene drive* е потенциален инструмент за промяна на репродуктивната скорост на инвазивните видове, въпреки че има значителни докладвани рискове.

Много трансхуманисти виждат редактирането на генома като потенциален инструмент за подобрене на човешкия геном, което поражда не само морални и етични проблеми, а и крие неохарактеризирани и непознати все още рискове. В подкрепа на тези учени, австралийският биолог и професор по генетика Дейвид Андрю Синклер отбелязва в своята книга: „*Lifespan: Why We Age and Why We Don't Have To*“, че „новите технологии за редактиране на генома ще бъдат използвани върху хора, за да има по-здрави деца – дизайнерски бебета. Вече направихме първите крехки стъпки в един свят, предсказан от филма *Gattaca* от 1997 г., общество, в което технологиите, първоначално предназначени да подпомагат човешката репродукция, се използват за премахване на „рисковите фактори и

неблагоприятните условия“, но само за тези, които могат да си ги позволят. През следващите десетилетия, с изключение на проблем с безопасността или глобална реакция срещу неизвестното, вероятно ще се наблюдава все по-голямо либерализиране на тези технологии и приемане на редактирането на гени в световен мащаб, предоставяйки на бъдещите родители възможността да ограничат възприемчивостта на бъдещите деца към болести, да бъдат избрани желани физически черти и дори избрани интелектуални и физически способности. Онези със средства, които искат да дадат на децата си „най-добрия възможен старт“, ще могат да го направят и с идентифицираните гени за дълголетие, те също могат да получат най-добрия възможен завършек. Каквито и предимства вече да имат генетично усъвършенстваните хора, те могат да бъдат умножени по силата на икономическия достъп до лекарства за дълголетие, заместители на органи и терапии, за които дори не сме и мечтали.“. **Всичко звучи чудесно като научно фантастичен филм, но с неизвестен финал и дългосрочни последици.**



Според доклад от септември 2016 г. на *Nuffield Council on Bioethics* в бъдеще може да е възможно да се подобри човешкия геном с гени от други организми или изцяло синтетични гени, за да се подобри например нощното зрение и обонянието. Свидетелство за това е научен труд на Джордж Чърч, където е публикуван списък с потенциални генетични модификации за потенциално благоприятни черти като по-малка нужда от сън, промени, свързани с познанието, които предпазват от болестта на Алцхаймер, резистентност към болести и подобрени способности за учене, заедно с някои от свързаните проучвания и потенциални отрицателни

ефекти (*Genome Editing and Engineering: From TALENs, ZFNs and CRISPRs to Molecular Surgery* - https://books.google.bg/books?hl=en&lr=&id=-TJlDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR10&dq=George+Church+list+of+genes+for+gene+editing+in+humans&ots=w73zAWmrVx&sig=aWKjB4T7D_VUVrC2rznAGyJHZtA&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false). В продължение на казаното по-горе, Американската Национална академия на науките и Националната академия по медицина издадоха доклад през февруари 2017 г., предоставящ квалифицирана подкрепа за редактирането на човешкия геном. Те препоръчаха клиничните изпитвания за редактиране на генома да бъдат разрешени един ден, след като се намерят отговори на проблемите с безопасността и ефективността, „но само за сериозни състояния под строг контрол.“

През 2007 г. Нобеловата награда за физиология и медицина е присъдена на Марио Капечи, Мартин Еванс и Оливър Смитис „за техните открития на принципи за въвеждане на специфични генни модификации в мишки чрез използване на ембрионални стволови клетки.“, техника, която е на ръба на законността. А през 2020 г.,

Нобеловата награда за химия е присъдена на Еманюел Шарпентие и Дженифър Дудна за „разработването на метод за редактиране на генома“.

Говорейки за генно редактиране вече и при хора, най-висшите организми на земята, то за какъв контрол би могло да се говори, особено предвид фактите и научните доказателства за несигурността, не високата ефективност и не дотам високата прецизност и точност на новите геномни техники, как би било възможно дори да се говори за точност и прецизност и резултати в целта, след като дори няма диагностични методи, които да докажат или отхвърлят това. Дори в изявление на директора на Националното разузнаване на Съединените щати, Джеймс Р. Клапър, е посочено, че редактирането на генома е потенциално оръжие за масово унищожение, и редактирането на генома, извършвано от държави с регулаторни или етични стандарти, „различни от Западни страни“ увеличава риска от създаване на вредни биологични агенти или продукти. Широкото разпространение, ниската цена и ускореното темпо на развитие на тези нови геномни технологии, както и умишлената или неумишлена употреба/злоупотреба с тези технологии може да доведе до широкообхватни последици за икономиката и националната сигурност. Според доклад от септември 2016 г. на *Nuffield Council on Bioethics*, простотата и ниската цена на инструментите за редактиране на генома ще позволят на аматьори – или „биохакери“ – да извършват свои собствени експерименти, което представлява потенциален риск от освобождаването на нови биологични видове и нарушаване на биобаланса и биологичното разнообразие. Също така има установени рискове, свързани с предаване на тези генетични промени на бъдещите поколения и те са толкова сложни, че изискват спешна етична проверка. Такива модификации могат да имат непредвидени последици, които биха могли да навредят не само на редактирания организъм, но и на бъдещите им поколения. Освен това има допълнителни опасения относно екологичните рискове от освобождаването на генно редактирани организми в дивите популации.



Селскостопанската биотехнологична индустрия твърди, че тези техники могат да осигурят решения на проблемите с продоволствената сигурност и устойчивостта на земеделието, включително предизвикателствата, породени от изменението на климата, вредителите и болестите по културите. В най-добрия случай тези твърдения са недокрай доказани и изпитани в дългосрочен план.

В ЕС новите геномни техники за момента попадат под съществуващите ГМО законодателни разпоредби и така трябва да остане, тъй като тези разпоредби съществуват, за да защитят общественото здраве и околната среда и да дадат правото на потребителите и фермерите на информиран избор и на това потребителите да знаят какво слагат в чиниите си и какво ядат и какво е засадено в полетата им. За изключването на редактирането на гени и новите геномни техники от регламентите за ГМО Европейската комисия (ЕК) се аргументира с твърдението, че генно редактираните

организми са полезни и безопасни и по този начин ЕК поставя под съмнение необходимостта от оценки на безопасността и етикетиране както и ефективния контрол на продуктите, произведени чрез нови геномни техники. Изключването на редактирането на гени от регламентите за ГМО би било стъпка назад, което би довело до отслабване на здравните и екологичните стандарти в ЕС. Това е така, защото много от рисковете, свързани с по-старите ГМО, се отнасят в по-голяма степен и за генно редактираните организми, които представляват нови и нехарактеризирани опасности.

Редица научни публикации сочат, че редактирането на гени е скъпо и потенциално опасно отвличане на вниманието от реалните решения на предизвикателствата, пред които е изправена агрохранителната верига. Тези техники претендират например за висока точност, прецизност на редактирането и висок контрол, и предвидимост на резултата. Също така се твърди, че редактирането на гени е широко достъпно и по-бързо от конвенционалното размножаване и че осигурява инструментите, които позволяват да се преборим с предизвикателствата, свързани с изменение на климата, обезпечаване на продоволствената сигурност и преборване на трудностите по цялата агрохранителна верига. Нито едно от тези твърдения обаче не е издържало на проверка и изпитване особено в дългосрочен план.

Повечето твърдения, изложени в проекторегламента за новите геномни техники и употребата им в растителните култури са подвеждащи и изключването на новите геномни техники от законовите разпоредби за ГМО означава, че тези техники и продуктите от тези техники няма да бъдат подложени на изпитване за безопасност, проследимост или етикетиране както ГМО и страните от ЕС не биха могли да забранят тяхното отглеждане. В резултат на това тези генно редактирани продукти ще се окажат безпрепятствано и на нашите полета и чинии, нетествани и неетикетирани, а фермерите и производителите на храни – включително тези, работещи биоземеделие няма да имат механизъм да ги избегнат.

Терминологията, която се използва за описание на самите техники е твърде сложна, неразбираема за обикновения потребител и не е общодостъпна. Противно на твърденията на индустрията, техниките за редактиране на гени не са техники за размножаване, а са техники за генетична модификация, които споделят някои от същите методи като генетичната модификация в стар стил. Също противно на направените твърдения, тези техники не са прецизни или контролирани, нито имат предвидими резултати. В допълнение към планираната генетична промяна, редактирането на гени причинява много непредвидени промени и генетични грешки. Редактирането може да включва непреднамерено добавяне на чужда ДНК от други видове или дори цели чужди гени групи в генома на генно редактирани организми. Ефектите от тези промени върху състава на генно редактираните култури, храни и животни, както и последиците за здравето и околната среда, не са изследвани и остават неизвестни, особено в дългосрочен план. В растителните култури редакциите могат да доведат до производството на неочаквани токсини и алергени или променени нива на съществуващи токсини и алергени.

Индустрията казва, че промените, направени чрез редактиране на гени в културите и животните, са малки и същите, каквито биха могли да се случат в природата, но това твърдение е невярно и недоказано и изпитано във времето. Например, компанията, която е разработила генно редактирани безроги говеда, твърди, че те са свободни от нежелани

фенотипни характеристики чрез редактирането на гени. Но Американските регулаторни органи са разкрили, че генно редактираните безроги говеда съдържат бактериална ДНК и чужди гени, които им придават резистентност към антибиотици.

Също така е доказано, че **генното редактиране чрез CRISPR на оризови растения причинява широк спектър от нежелани мутации, както на предвиденото място за редакция, така и на други места в генома.** Изследователите, направили това откритие, предупреждават, че **генното редактиране чрез системата CRISPR/cas9 „може да не е толкова прецизно, колкото се очаква при ориза“.** Учените отправят строги препоръки, че **„трябва да бъде извършвана ранна и точна молекулярна характеристика и скрининг на поколения преди прехода към употреба и внедряване в развъдната и селекционна дейност на системата CRISPR/Cas9 и от ниво лабораторни изпитвания към полеви изпитвания“** – нещо, което обикновено не се прави от разработчиците на тези технологии.

Вземането на неправилни решения на ниво ЕС, особено свързани с узаконяване или патентоване на подобни продукти, постигнати чрез новите геномни техники, би могло да застраши здравето, околната среда и биологичното разнообразие.

Като се вземат предвид наличните научни доказателства за неточност на техниките за редактиране на гени и предизвикателствата при производството на генно редактирани растения или животни, твърденията, че редактирането на гени може да произведе много повече полезни черти по-бързо от конвенционалното развъждане и с по-голяма прецизност и точност, са доста съмнителни. Нещо повече, **постигането на полезни характеристики в растителните култури или животните не е само въпрос на скорост – това е въпрос на използване на най-добрите инструменти за работа, а ГМ подходите не са напълно доказан ефективен път.** Въпреки годините на изследвания и разрешението за употреба в някои страни, само **три генно редактирани култури са стигнали до пазара и само една от тях е постигната със силно рекламирания инструмент CRISPR/Cas.**

Твърдението, че редактирането на гени, по-специално чрез CRISPR/Cas, ще направи селскостопанските иновации достъпни публично, се опровергава от фактът, че **технологията вече е собственост и се контролира от много малко големи корпорации (пр. Corteva и Monsanto/Bayer), които притежават патент върху тези технологии.** Докато лицензите и патентите за оценка и изследване на техниките за генна редакция могат да бъдат достъпни на ниска цена или безплатно, **търговските лицензи и свързаните с тях плащания за продажбите на генно редактирани продукти ще останат твърде скъпи и недостъпни за всеки, освен за големите компании.** Генно редактираните растителни култури имат патенти, обхващащи сортовете семена, растенията и често реколтата, **повдигайки сериозни въпроси за консолидиращия контрол на доставките на храни, автономията на фермерите и загубата на хранителен суверенитет на всяка държава.**

Обещанието, че тези технологии ще позволят развитието на култури, които изискват по-малко пестициди и са адаптирани към изменението на климата са били отправени и преди години за **стари ГМО разработки, като същите не са оправдали очакванията на учени, развъдчици и търговци.** Новите ГМ техники е малко вероятно да успеят там, където **„старите ГМО разработки“ се провалиха, тъй като желани характеристики като устойчивост на вредители и болести и адаптиране към климатичните промени са генетично сложни черти, които не могат да бъдат постигнати чрез манипулиране на един**

или няколко гена или групи гени и най-важното е, че не се унаследяват трайно от растителните култури и животните, а се губят в хода на еволюцията. За разлика от това, конвенционалното развъждане продължава да бъде много успешно в постигането на такива характеристики и далеч изпреварва ГМО подходите. Не е достатъчно да се съсредоточим върху генетиката като цялостно решение на проблемите в селското стопанство, необходими са системни подходи, които биха довели наистина до широкомащабно преминаване към доказано успешни агроекологични системи на земеделие, които включват наистина устойчиви и регенеративни методи на достъпна цена. Тези методи вече са налични и трябва само да бъдат правилно приложени. Редактирането на гени е скъпо разсейване от вече съществуващите решения.

Изключването на генното редактиране от регламентите на ЕС за ГМО би послужило за насърчаване на съмнителен „глобален лабораторен експеримент“ с неизвестни последици за хората, животните и околната среда. Това също би лишило европейските потребители, фермери и животновъди от правото да знаят къде се намират тези ГМО и би възпрепятствало напредъка в подходите без ГМО, включително органичните и агроекологичните системи. Това би представлявало значително отслабване на защитата на здравето и околната среда в ЕС и би подкопало внедряването на доказано ефективни и устойчиви решения за предизвикателствата по агрохранителната верига.

Трябва да не се забравя, че генното редактиране е генно инженерство, а не развъждане и селекционен подход. Мит е, че „*Gene-editing techniques are “new breeding techniques”, “precision breeding or breeding innovation”*“. Биотехнологичната индустрия и нейните привърженици често наричат новите геномни техники (NGT), особено редактирането на гени, „иновации в развъждането“, „прецизни техники за развъждане“ и „нови техники за развъждане“, като упорито избягват термините „генна модификация“ и „генно инженерство“. Огромни компании, които контролират използването на CRISPR генно редактиране и са притежатели на патентите за NGT в различни растителни култури, твърдят, че „произведените от CRISPR растения не са ГМО“. Европейските институции избягват и термините „генна модификация“ и „ГМО“. Европейската комисия е приела термина „нови геномни техники (NGT)“, като се използва също и термина „нови техники в биотехнологиите“. Използването на термина „развъждане“ вероятно цели да постигне по-широка общественост и по-широко възприемане на тези технологии като естествено развъждане, а не генно инженерство и ГМО. Техниките за редактиране на гени обаче са технологично, на практика и законно биотехнологични техники за генна модификация и попадат в обхвата на законите на ЕС за ГМО, както е потвърдено от решението на Европейския съд от 2018 г. Законодателството за ГМО определя ГМО като организъм, в който „генетичният материал е променен по начин, който не се среща естествено чрез чифтосване и/или естествена рекомбинация“. Тази формулировка точно описва начина, по който са се създавали по-стари трансгенни и нови ГМО, както и генно редактирани растения. Генетичната модификация използва изкуствени техники, които изискват пряка човешка намеса в генома. За разлика от тях термините „чифтосване и/или естествена рекомбинация“ описват естествени процеси, използвани в конвенционалното селектиране и развъждане на растения и животни. Законодателството за ГМО на ЕС освобождава някои ГМО, като тези, произведени с помощта на десетилетна техника, наречена произволна мутагенеза, от изискванията за разрешение, проследимост и етикетиране. Но това е възможно само ако са произведени с помощта на техники, които имат „дълъг опит и история на безопасност“. Това очевидно не е случаят с редактирането на гени.

Старите техники за генна модификация и новите техники за генна редакция имат доста общи черти – доставка на ген, редактиране на ген и регенерация на целия организъм в тъканна култура – първата и последната стъпка по същество остават същите. Първата стъпка, доставка на чужд генетичен материал в растителните клетки (наричана още ГМ трансформация) обикновено се извършва с помощта на малки кръгови ДНК молекули (плазмиди), които се въвеждат в клетките с помощта на *Agrobacterium tumefaciens*. След това плазмидът се инкорпорира в растителното ДНК. По отношение на „стъпката на редактиране“, по-голямата част от приложенията за редактиране на гени включват първо разрязване на ДНК с ензими, наречени нуклеази, които се предполага, че действат само на избрани места в генома на жива клетка. Тези ензими създават двуверижно скъсване в ДНК, като най-често използваните са семейството протеини Cas (за CRISPR) и FokI (за TALEN и ZFN). Срязването е сигнал за клетката, така че клетката инициира процес на възстановяване на ДНК, за да поправи двойноверижното скъсване на ДНК. Ако първоначалното скъсване на ДНК може да бъде насочено към специфично място в генома, последващото възстановяване се извършва от закодираните в клетката механизми за „ремонт“ и не може да бъде контролирано от генния инженер.“ Често възстановяването на двойната ДНК верига е чист и прецизен процес, но може да доведе до „хромозомен хаос“. Резултатът от поправката на DSB се нарича „редактиране“. Изследователите трябва да избират от много редактирани организми, за да получат този, който желаят.

SDN процедурите са разделени на SDN-1, SDN-2 и SDN-3 и могат да предизвикват следните ефекти:

SDN-1 предизвиква нарушаване на функцията на ген (известен също като генен нокаут). Ремонтът на двойноверижното скъсване в ДНК, водещо до делеция на част от гена, или до вмъкване на допълнителни базови двойки на ДНК, които са взети от генома на организъм, който се редактира, нарушава последователността на гена и по този начин нарушава нормалната му функция.

SDN-2 предизвиква генна промяна и мутации, които след това ще произведат променен протеин с променена функция.

SDN-3 предизвиква генно вмъкване, а разкъсването на ДНК е придружено от матрица, съдържаща ген или друга последователност от генетичен материал. Естественният процес на възстановяване на клетката използва този шаблон, за да поправи счупването, което води до вмъкването на нов генетичен материал (чужда ДНК, която може да включва изцяло нов ген).

Редактирането на гени чрез олигонуклеотид-насочена мутагенеза (ODM) например не причинява двойно верижно скъсване в ДНК, а вместо това включва въвеждането на къси последователности от синтетична ДНК и РНК – наречени олигонуклеотиди – в клетките. Олигонуклеотидите се свързват с клетъчната таргетна ДНК и така подвеждат възстановителните механизми на клетката да променят собствената си ДНК, така че да съответства на тази на олигонуклеотида.

В заключение може да се каже, че всички тези разгледани техники ще променят биохимията на растението, животното или микроорганизма, което е целта на генното редактиране, така че да може да се получи нова черта. Въпреки че ГМ и конвенционалното развъждане ще доведат до създаването на нови сортове и видове, двете направления са тотално различни и не са взаимозаменяеми. Редактирането на гени

очевидно е ГМ техника, но конвенционалното развъждане не е, колкото и упорито селскостопанската биотехнологична индустрия да се опитва да размие границите.

Твърдението, че „*Gene-editing tools such as CRISPR/Cas bring about changes in the genome in a precise and controlled way, with predictable outcomes.*“ („Инструменти за редактиране на гени като CRISPR/Cas водят до промени в генома по прецизен и контролиран начин, с предвидими резултати.“), вземайки предвид все повече научни данни, **не е напълно вярно**. Генното редактиране все още не е прецизно и причинява непредсказуеми генетични грешки, известни също като нежелани мутации (увреждане на ДНК) с непредвидими резултати и неидентифицирани промени. Видовете мутации включват големи делеции, вмъквания и пренареждания на ДНК. Дори най-простото прилагане на генно редактиране (т.нар. SDN-1), което има за цел да заглуши или изключи функцията на ген, може да доведе до нежелани мутации. Тези мутации могат да доведат до създаването на нови генни последователности, произвеждащи нови мутантни протеини, с неизвестни последици за здравето на потребителите на генно редактирания организъм. В допълнение, могат да се осъществят промени в модела на генната функция в организма, чийто геном е бил модифициран, които да не са предвидени или желани.

В генно редактираните растения тези промени могат да доведат до промени в състава, или синтез на нови непознати протеини, които могат да се окажат токсични и/или алергени за хората или животните. Нежеланите мутации и техните ефекти са недостатъчно проучени в растенията в сравнение с човешките и животинските клетки. Но тъй като механизмите на редактиране на гени и последващо възстановяване на ДНК са едни и същи при животните и растенията, има всички основания да се смята, че **видовете непреднамерени мутации, наблюдавани в човешки и животински клетки, ще бъдат открити и в растенията**. Последните изследвания върху оризовите растения свидетелстват за този факт. Тези мутации възникват на различни етапи от процеса, включително етапи, които генното редактиране има общо с трансгенните ГМ методи в стар стил (напр. трансгеназа или трансформация чрез вмъкване на чужд генетичен материал в ДНК на растителните клетки чрез *Agrobacterium tumefaciens*). Дори планираните промени могат да причинят нежелани ефекти („плейотропни ефекти“) в редактирания организъм, тъй като гените и техните протеинови или РНК продукти действат едновременно, а не изолирано.



Пример за подобни нежелани ефекти или нарушения на генната функция е подобряването на добива на вече високопроизводителни сортове ориз, използвайки технологията SDN-1, при който учените са се опитали да произведат малки вмъквания и заличавания на базови двойки в ДНК генома. **Резултатът обаче е бил съвсем различен от очакваното и са открити големи вмъквания, делеции и пренареждания на ДНК, което повишава риска от промяна на функциите на други гени, а що се отнася до очаквания повишен добив, то той е бил намален.** Това не трябва да е изненада, тъй като добивът е генетично сложна характеристика, която включва функционирането на много, ако не и на всички, гени семейства на растението, което обезсмисля упражнението по промяна на единични нуклеотиди или пък единичен ген. Тези констатации водят до извода, че ранна и точна молекулярната характеристика и скрининг трябва да се извършват поколения преди да се премине към приложение на технологията CRISPR/Cas9 от лабораторията до полето. Създателите на тези технологии и операторите обикновено не правят това или ако го правят, резултатите не се публикуват. **Разбирането на несигурностите и характеризирането на рисковете при прилагане на редактиране**

на генома е необходимост и трябва да бъде извършено с необходимата критичност и безпристрастност, преди да бъде въведена новата глобална политика за прилагане на новите биотехнологии в масовото производство или развъдната дейност.

Не трябва да се подценява факта, че повечето проучвания, които търсят непреднамерени мутации в генно редактирани растения, силно подценяват броя на мутациите, произтичащи от генното редактиране и причината е, че няма адекватни методи за откриване – PCR с малък обхват и секвениране на ДНК с къси четения. Те разглеждат само къси участъци от ДНК около целевия сайт на редактиране и прогнозираните чрез компютърно моделиране нецелеви сайтове. Както *Kosicki* и екип откриха в проучване върху човешки клетки, PCR с малък обхват и секвенирането на ДНК с късо четене може да пропусне големи генетични грешки, като големи делеции и вмъквания.

Също не трябва да се пренебрегват **високите консуматори на генно редактирани продукти или ГМО**, тъй като при скрити или непредвидени и неизследвани в дългосрочен план промени в моделът на генната функция може да се **наблюдават странични ефекти** като **повишена токсичност или пък алергенност.**

През септември 2020 г. биотехнологичната компания Cibus е създала **толерантна към хербициди SU Canola (маслодайна рапица)**, като компанията твърди, че културата не е модифицирана или генно редактирана, а е резултат от произволна мутация, възникнала в лабораторна среда. След доста проучвания и изпитвания на генно редактираната култура стана ясно, че чрез олигонасочена мутагенеза (ODM) е проектирано да се **предизвика в растението различна генетична промяна от тази, за която е установено, че придава толерантност към хербициди в SU Canola** и която компанията описва в патентната си заявка. Това доказва, че **прецизният инструмент за генна редакция, който е използван не работи по**

предназначение. Това заобикаляне на нормативната уредба за ГМО в ЕС повдига въпроси относно честността и прозрачността на тези компании. По-важното е, че прецизността и контролът над тези геномни техники изискват комбинация от PCR на дълги последователности и секвениране на ДНК с дълги четения, за да се разкрие пълния набор от нежелани мутационни ефекти. Учени от FDA са направили същата препоръка по отношение на животни с редактирани гени. Този принцип на предвидимост и възможност за детекция трябва да се прилага както за растенията, така и за животните, преминали генна редакция. Научен преглед на *Kawall* и колеги потвърждава още веднъж, че „по-голямата част“ от проучванията върху генно редактирани растения използват неточни методи за откриване и за скрининг на генетични грешки, което означава, че те ще пропуснат много такива грешки и мутации извън целта. Сред проучванията върху животни с редактирани гени нито едно не включва задълбочен анализ за наличие на генетични грешки.

В проучване на *Tang, Y., Zhang, Z., Yang, Z. and Wu, J., 2023* също е демонстрирано, че техниките за генно инженерство като **CRISPR** и въвеждането на нова ДНК последователност чрез плазмиди или с помощта на *Agrobacterium tumefaciens*, са силно мутагенни и предизвикват нежелани мутации, които понякога остават скрити за учените. Проучването сочи, че въвеждането на нова последователност посредством *Agrobacterium tumefaciens* води до много нецелеви мутации при растенията (над 200 нецелеви мутации на растение), за сравнение оризовите семена, запазени от геномна модификация имат само 30-50 спонтанни мутации на растение. Това проучване свидетелства, че **CRISPR** технологията причинява голям брой нецелеви мутации и те са много повече от тези, предизвикани при конвенционалното размножаване. По ирония на съдбата това проучване често се цитира като пример за прецизността на този инструмент за редактиране на гени. Въпреки това, използването на неточни и неподходящи методи за скрининг от страна на изследователите остава факт. Въз основа на горните доказателства редактирането на гени не е нито прецизно, нито контролируемо, но може да доведе до фенотипна изява на черти, които застрашават общественото здраве и околната среда. Твърдението, че: *„Changes brought about by gene editing are the same as could happen in nature or mutation breeding. Gene editing causes genetic changes that aren't different from those that happen in nature.“* („Промените, причинени от редактирането на гени, са същите, каквито биха могли да се случат в природата или при класическата мутагенеза. Генното редактиране причинява генетични промени, които не се различават от тези, които се случват в природата.“) за съжаление все още остава мит и би било постижимо единствено в лабораторна контролирана среда.

Привържениците на тези нови геномни техники твърдят, че ефектът от приложението им и приложението на старите селекционни процедури е еднакъв. Старите селекционни процедури включват произволна мутагенеза, техника, позната от десетилетия, при която семената се излагат на химикали или радиация, за да се предизвикат мутации с крайната цел да доведат до възникване на полезна черта. Учените твърдят, че генното редактиране е по-прецизно от произволната мутагенеза, затова и се цели генно редактираните растения да бъдат освободени от законодателните изисквания и регламентите за ГМО. Също така се твърди, че редактирането на гени може да произведе организми, които биха могли да възникнат в природата и по естествен начин, което твърдение е изцяло теоретично. Никой екип от учени не е доказал до момента в пълнота и дългосрочен план, че даден генно редактиран организъм е същият като естествено срещащ се организъм.

Ако приемем тази хипотеза за вярна, то тогава би се поставил под съмнение всеки патент върху генно редактиран организъм, тъй като патентоването на даден продукт/изобретение изисква „изобретателска работа“. Д-р Майкъл Антониу, молекулярен генетик, твърди в своите научни разработки, че няма 100% доказателства за това, че генното редактиране е по-прецизно, в смисъл на причиняване на по-малко мутации, отколкото конвенционалното размножаване или произволната мутагенеза. Този учен изразява притесненията си, че *„редактирането на гени може да причини големи заличавания, вмъквания и пренареждания в ДНК, което може да повлияе на функцията на множество гени в нецелени и целени места. Не ми е известно да има проучвания, използващи надеждни методи за скрининг, които да сравняват тези видове увреждане на ДНК в конвенционално отгледани, отгледани чрез произволна мутагенеза и генно редактирани растения. Това, което знаем е, че има ясни експериментални доказателства, показващи, че редактирането на ген причинява не малки вмъквания и изтривания в генни локуси извън целта и на целени сайтове.“*

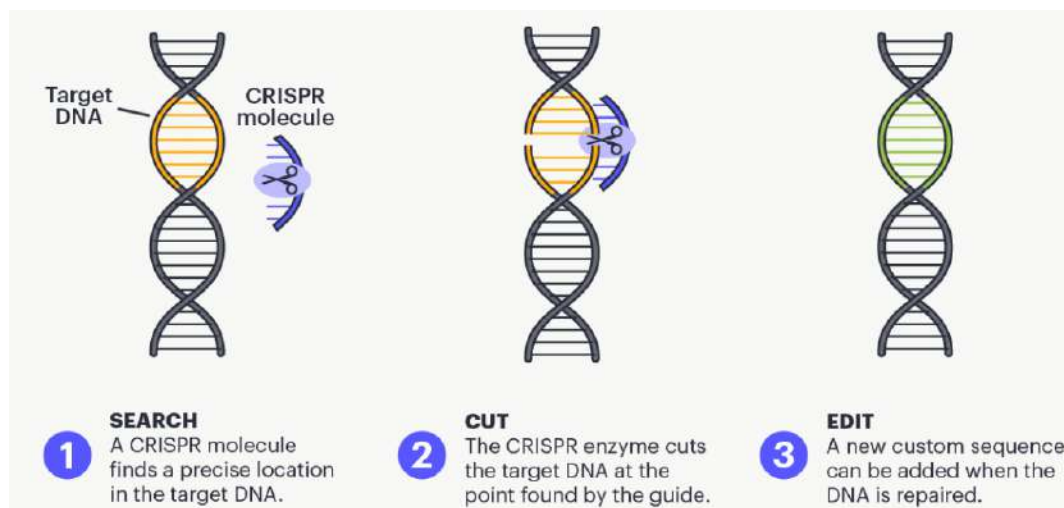
“Gene editing can cause large deletions, insertions, and rearrangements in DNA, which can affect the function of multiple genes at off-target and on-target sites“ - Dr Michael Antoniou

Доказателствата показват, че мутациите, предизвикани от редактирането на гени, не са същите като тези, предизвикани от химикали или радиация при произволната мутагенеза. В научен преглед на Д-р Майкъл Антониу се показва, че редактирането на гени може да доведе до промени в области от генома, които иначе са защитени от мутации. С други думи, генното редактиране прави целия геном достъпен за промени. Мутациите, предизвикани от произволната мутагенеза, по-често се появяват в области от генома, които не са кодиращи и нерегулаторни и следователно е малко вероятно да повлияят на генната функция, за разлика от генното редактиране, където е по-вероятно мутациите да се случат на места в генома, които пряко засягат функцията на един или повече гени. При генната редакция винаги има умишлено насочване към кодиращия регион на ген или неговите регулаторни елементи, за да се промени неговата функция. В допълнение, ако планираната цел за редактиране на генен локус е кодираща област на гена или негови регулаторни елементи, ще възникнат нецелени мутации в други генни участъци с подобна ДНК последователност. В резултат на това е вероятно мутациите извън целта и непреднамерените в целта да засегнат важни генни региони, кодиращи протеини, и генната регулаторна активност. Немаловажен факт е и възможността на генното редактиране да се използва в мултиплексен подход, позволяващ насочването и промяната на множество генни варианти, които могат да бъдат членове на едно и също или различни генни семейства едновременно.

В обобщение, генното редактиране може да причини специфични непредвидени ефекти и може да се използва за генериране на нови генетични комбинации, които не могат лесно да бъдат постигнати с помощта на конвенционални техники за размножаване или мутагенеза. Той може да преодолее генетичните ограничения, които съществуват в конвенционалното развъждане. Тези уникални характеристики на приложенията за редактиране на гени показват, че те представляват уникални неохарактеризирани, непознати и неценени рискове, изискващи стриктно регулиране и строг контрол.

Изобретателката на CRISPR Дженифър Дудна даде ясно да се разбере, че целта на редактирането на гените с CRISPR не е да се възпроизведе или подобри природата, а да се преработи и замени. Тя многократно е описала в свои изявления, че:

„Отминали са дните, когато животът е бил оформен изключително от еволюционните сили. Ние стоим на прага на една нова ера, в която ще имаме първична власт над генетичния



състав на живота и всичките му жизнени и разнообразни прояви. Всъщност ние вече измествахме глухата, тъпата и сляпата система,

която е оформила генетичния материал на нашата планета за еони и го заменяме със съзнателна, преднамерена система на насочена към човека еволюция.”

“Gone are the days when life was shaped exclusively by the plodding forces of evolution. We’re standing on the cusp of a new era, one in which we will have primary authority over life’s genetic makeup and all its vibrant and varied outputs. Indeed, we are already supplanting the deaf, dumb, and blind system that has shaped genetic material on our planet for eons and replacing it with a conscious, intentional system of humandirected evolution.”
[\(https://innovativegenomics.org/education/digital-resources/what-is-crispr/\)](https://innovativegenomics.org/education/digital-resources/what-is-crispr/)

Въпреки това, като се има предвид, че учените не разбират напълно функцията на огромните сложни мрежи от гени и техните продукти, които представляват здраво функциониращ организъм, те не биха могли напълно да предскажат резултата дори от една генна манипулация. Трудно е да се види как се е появила нова ера в ръководената от човека предсказуема, насочена еволюция. От тази гледна точка, може би генното инженерство е невъзможно да замени напълно природните закони и естествената еволюция. Доказателствата показват, че генетичните промени, предизвикани от редактирането на гени, са различни от тези, които биха се случили в природата или произволната мутагенеза и техните резултати, ефекти и рисковете, които крият, не са добре разбрани и охарактеризирани. С оглед на това редактирането на гени трябва да остане в обхвата на регламентите на ЕС за ГМО и оценката на риска следва да бъде разширена, за да се вземат предвид специалните нововъзникващи рискове, свързани с технологията.

Твърдения, че редактирането на гени е „развъждане,, че е „прецизно,, и че резултатите са „идентични на тези в природата“, често се правят, за да се наложи тезата, че модифицираните организми ще бъдат безопасни по дизайн. Някои разработчици на ГМО изрично твърдят, че генно редактираните растения са също толкова безопасни, колкото конвенционално отглежданите. Големи концерни твърдят, че в сравнение с конвенционалното отглеждане, редактирането на гени CRISPR/Cas е „по-просто, по-бързо и по-прецизно, без въздействие върху безопасността на крайната реколта в сравнение с традиционното отглеждане на растения. Голяма група учени са на мнение, че редактираните с CRISPR растения са „толкова безопасни, колкото растенията, открити в

природата или създадени чрез конвенционално развъждане“. **Индустрията твърди, че би било „непропорционално“ тези продукти да бъдат подложени на ГМО регулаторни изисквания, насочени към гарантиране на тяхната безопасност. Бизнеса не вижда необходимост да провежда тестове за безопасност на своите генно редактирани култури и казва, че тества растения, произведени от CRISPR по „същия начин“, както тества конвенционално отгледани растения.** Въпреки това, както е видно от примерите в изложението, **генното редактиране не е прецизно, нито резултатите са идентични с тези от конвенционалното развъждане.** Докато първоначалното разрязване на ДНК може да бъде насочено към специфичен регион на генома, последващото възстановяване на ДНК причинява нежелани мутации както в прицелните, така и в нецелевите места в генома. Тези нежелани генетични промени ще променят модела на генната функция в организма, както и биохимията на организмите, да не говорим за **производството на нови токсини и алергени или променени нива на съществуващи токсини и алергени.** Наличието на нежелани мутации е добре документирано в не малко научни трудове при човешки и животински клетки и е започнало да привлича повече внимание при проучванията на мутациите при растителните култури. Други **нежелани резултати от редактирането на гени са слабо засегнати и изследвани в научните трудове и не е ясно до каква степен се срещат в животинските и растителните клетки и какви биха могли да бъдат ефектите.** Пример за такива са описани в проучване на японски изследователи. Проучването е установило, че **дори SDN-2 (изменяне на гена) приложения на CRISPR/Cas геномно редактиране, е довело до непреднамерено включване на чужда ДНК в генома на генно редактирани организми.** Този нежелан резултат не се ограничава до CRISPR, но е **открит и при други инструменти за редактиране на гени също.** По-конкретно, изследователите разглеждат ефектите от **редактирането на ген чрез CRISPR/Cas в миши ембрионални клетки и откриват, че редактираните геноми на мишките незабелязано придобиват ДНК от говеда или кози.** Ефектът е проследен до използването в средата за култивиране на клетки на фетален телешки серум и серум от кози. Още по-тревожно е, че **сред ДНК последователностите, въведени в генома на мишките, има ретротранспозони от говеда и кози и миши ретровирусни ДНК.** Тези констатации свидетелстват за това, че редактирането на гени е **потенциален механизъм за хоризонтален генен трансфер** (трансфер на генетичен материал по какъвто и да е метод, различен от „вертикалното“ предаване на ДНК от родител на потомство) при организми, водещо до поява на различни заболявания. Проучването също така сочи, че **ДНК фрагмент от генома на бактериите *E. coli* може незабележимо да се интегрира в генома на целевия организъм.** В случаите, когато генетичните инженери доставят инструмента за редактиране на гени в растителни клетки, чрез плазмид, **има два начина, по които чужда ДНК може да се интегрира случайно в генома на растението, което ще се редактира.** Първо, плазмидът, който пренася инструмента за редактиране на гени, или цялостно, или фрагменти от него, може да се интегрират в таргетната ДНК. Второ, ДНК от генома на бактериите *E. coli*, използвани за разпространение на плазмидата често може да се интегрира в клетъчната ДНК. Плазмидът е малка кръгова ДНК молекула, която пренася гените, даващи инструкции за производството на компонентите CRISPR/Cas и шаблона за възстановяване на ДНК в клетките. **Затова поради възможността чужд плазмид или бактериална ДНК да бъде включена по време на редактирането на гените на различни целеви организми, регулаторната рамка трябва да включва изисквания към разработчиците да провеждат подходящи и задълбочени молекулярно генетични изпитвания.**

Разликата между самата техника за генна редакция, както и между конкретните инструменти не е полезна за разграничаване на нивата на риск за всеки вид генетично

редактиран организъм. Молекулярният генетик д-р Майкъл Антониоу е на мнение: **"Размерът на генетичните промени не определя риска, тъй като малките генетични промени могат да доведат до драматични и нови ефекти.** Например, малка делеция или вмъкване след редактиране на гени може да доведе до създаване на нова генна последователност, която може да доведе до нов мутантен протеин с неизвестни функционални последици. Ето защо **всички мутации, причинени от редактирането на гени, трябва да бъдат оценени въз основа на това, което правят, както и какъв тип и колко са на брой.**"

Макар SDN-1 и -2 често да се приемат за по-малко разрушителни от SDN-3, тъй като няма постоянно интегриране на чужда ДНК в генома, няма доказателства, че причинените мутации са по-малко, по-малки или по-малко рискови. Установено е, че **големи мутации, включително големи делеции, вмъквания и пренареждане на ДНК, се генерират дори с инструменти като SDN-1.** При промяна на множество места в генома, с която и да е техника и мултиплексния подход, насочена към няколко гени наведнъж или при повтарящи се, последователни приложения, се твърди, че направените промени са „малки, и „подобно на това, което може да се случи в природата“, но това не е точно така, тъй като **няколко индивидуални малки промени могат да се комбинират и да се получи организъм, който е много различен от родителския.** Макар че дори и малките промени могат да доведат до големи ефекти, редица малки промени, направени чрез редактиране на гени, могат да доведат до още по-големи промени, което увеличава възможността за непредвидени промени в биохимията и цялостния състав на редактирания организъм, с неизвестна информация. **Всички тези негативи могат да доведат до последици както за производителността на културите, така и здравето на потребителя.** Следователно **рисковете както от малки, така и от големи промени трябва да бъдат внимателно оценени.** Въпреки че нежеланите генетични промени са проучени до известна степен в генетично редактирани организми, **не са провеждани проучвания за безопасност с продукти, съдържащи организми с редактиран геном в дългосрочен план.** Такива изследвания са задължителни съгласно законодателството на ЕС за ГМО, преди даден ГМО продукт да може да бъде пуснат на пазара.

Също немаловажен риск при генната редакция е вмъкването в генома на целевия организъм на гени, кодиращи антимикуробна резистентност към не един клас антимикуробни средства, проблем от световен мащаб, който води до големи икономически загуби, както и застрашаващ живота и здравето на хора и животни. **Пример** за непреднамерено вмъкване на гени, кодиращи резистентност при редактирани животни са **безрогите говеда.** В едно от целевите места при редактиране на гени в генома на телетата, генът **POLLED** е вмъкнат, както е планирано. Въпреки това, **на друго предвидено място за генна редакция, две копия от цялата кръгова плазмидна ДНК, която носи последователността POLLED, е неволно интегрирана.** Тези непреднамерено интегрирани плаزمиди **съдържат пълни генни последователности, които кодират резистентност към три антибиотика (неомицин, канамицин и ампицилин).** Не е изследвано дали наличието на тези гени за антибиотична резистентност може да повлияе здравето на животното или на хората, които консумират месни продукти от редактирани животни, **въпреки това обаче това е риск, който заслужава обстойно проучване, тъй като тези гени може да се очаква да бъдат намерени в редактирания геном, но да не са търсени изобщо.** Дори компанията, която е създала тези генно редактирани говеда, *Recombinetics*, е на мнение, че **трябва да се проведат проучвания за безопасност, за да се разберат по-добре рисковете за общественото здраве и околната среда, породени от генно**

редактирания организъм. Тад Сонтесгард, главен изпълнителен директор на *Acceligen*, дъщерно дружество на *Recombinetics*, изказа твърдението: „Това не беше нещо очаквано и ние не го търсихме“. Той призна, че "е трябвало да се направи по-пълнен скрининг". В резултат на тези данни и откритието на имплементираните гени за резистентност при безрогите говеда на учените от FDA, **Бразилия отмени плановете си за създаване на стадо от генетично редактирани безроги говеда.** Поради тези и много други причини не е редно да се разчита единствено на данните и информацията, подадени от генните инженери и биотехнолозите, прилагачи тези нови геномни техники върху разнообразие от организми. Не може да се разчита на това, че тези оператори ще си налагат самоконтрол или пък сами да определят дали промените, предизвикани от редактирането на гени, са безопасни или да определят дали получените промени ще са същите, както биха могли да се случат в природата. **На разработчиците, прилагачи и създаващи нови геномни техники не може да се разчита за идентифициране на генетични грешки и нежелани черти и трябва да се въведе строга регулация и да се наложи задълбочен скрининг.**

Опитът с генетично модифицирани култури от първо поколение показва, че кръстосването, проведено от разработчиците на ГМО, не премахва надеждно нежеланите черти и че културите с такива характеристики са достигнали отдавна до пазара. Например, в случая с **царевичката NK603, която е устойчива на глифозат, в генетично модифицираната култура е установено увеличение на някои съединения в сравнение с генномодифицирания родител, освен това в генетично модифицираната царевичка са установени метаболитен дисбаланс, повлияващ качеството на храната.** Тези нежелани промени могат да обяснят неблагоприятните последици за здравето, наблюдавани от консумацията на царевичката. **Генетично модифицираната царевичка MON810** **Вt** съдържа алерген, зеин, който не присъства в родителската култура, като се оказва, че учените, разработили тази модификация не са забелязали тези промени или са ги счели за маловажни.

Често срещано погрешно схващане е, че генно редактираните организми са по-безопасни от по-старите ГМО. Но няма научни доказателства за това, както се потвърждава и от учения от Байер д-р Лари Гилбъртсън, който твърди, че рисковете от нови техники като редактиране на гени и по-стари техники за генетична модификация са еднакви: „Не мисля, че има фундаментално разлика в нивата на риска между тези две технологии, тъй като и двете са фундаментални промени в ДНК.“ През 2018 г. тази научна констатация е отразена и в решението на Съда на Европейската общност, че генно редактираните организми (наречени в случая „нови техники/методи на мутагенеза“) трябва да бъдат под контрола и регулацията на по-старите ГМО. Европейският съд е дал следното обяснение: „Рисковете, свързани с използването на тези нови техники/методи на мутагенеза, може да се окажат подобни на тези, които са резултат от производството и освобождаването на ГМО чрез трансгенеза, тъй като пряката модификация на генетичния материал на организъм чрез мутагенеза дава възможност да се получат същите ефекти като въвеждането на чужд ген в организма (трансгенеза) и тези нови техники позволяват да се произвеждат генетично модифицирани сортове със скорост, която е непропорционална на тези, получени в резултат на прилагането на конвенционални методи на мутагенеза. Техниките за редактиране на гени създават нови и различни рискове в сравнение с по-старите трансгенни ГМ техники.“ Ето защо някои учени твърдят, че насоките на ЕС за оценка на риска трябва да бъдат разширени, за да вземат предвид тези рискове. Интересно е, че нито

голяма част от учените, нито Европейският съд, нито учените, които не подкрепят новите геномни техники и предупреждават за специалните рискове от редактирането на гени, подкрепят идеята, че генно редактираните организми са по-безопасни от по-старите трансгенни ГМО.

Макар богатия натрупан опит през годините дори произволната мутагенеза е широко призната като рискована, непредсказуема и неефективна при производството на полезни мутации при растителните култури. Растителните клетки могат да бъдат убити или много от получените растения са деформирани, нежизнеспособни и/или безплодни. Макар всички доказателства, че произволната мутагенеза има негативни и непредсказуеми ефекти, и че тя се признава от законодателството на ЕС като генетична модификация, тази технология е освободена от изискванията на разпоредбите, тъй като се счита, че има история на безопасна употреба. Но не може просто с лека ръка същото изключение да бъде направено и за редактирането на гени, което няма история на употреба, да не говорим за безопасна употреба, изпитана във времето. Поради гореизброените причини строгият регулаторен надзор и контрол е от решаващо значение, както препоръчват учени от FDA и както Европейският съд се произнесе по отношение на всички генно редактирани организми в ЕС.

Възможности за откриване на направени промени в генома (за целите на контрола)

Индустрията и асоциациите твърдят, че много генно редактирани организми не могат да бъдат разграничени от тези, постигнати с конвенционално развъждане. Вече има налични стандартни техники за откриване на по-старите поколения ГМО, които позволяват недвусмислено откриване и идентифициране на широк спектър от генетични модификации, от най-малките – напр. еднонуклеотидни точкови мутации на ДНК – към най-голямата, напр. вмъкване на големи геномни последователности, при условие че е налична информация за генетичната промяна. Освен това всеки патентован продукт би следвало да може да бъде разграничен от другите конвенционални продукти, тъй като в противен случай би било невъзможно налагането на патентни права. Всъщност патентите обикновено се дават за специфични геномни последователности, независимо от това как са получени. Когато тези специфични последователности са известни, не само генният инженер, но и други заинтересовани организации могат да разработят специфични методи за откриване на тези култури. Пример за разработен специфичен метод за детекция на конкретни мутации е за SU Canola на Cibus, като целта е компанията, притежаваща патента върху конкретната модификация да идентифицира своя продукт, и да го предостави на заинтересованите власти, но властите отказват да предоставят на широката общественост тези методи за детекция с основанието, че това е поверителна бизнес информация. Въпреки това, екипи от учени са разработили свободно достъпни методи за откриване на тази генетично модифицирана култура. Детекцията на модификацията при SU Canola е особено комплициран случай, тъй като промяната в нейния генетичен код се състои само в промяна на „единична базова двойка“ в рамките на конкретен ген, което се явява като търсене на игла в купа сено. Изследователите твърдят, че промяната на единична базова двойка може все пак да бъде открита със стандартна технология за откриване на ГМО, базирана на полимеразно верижна реакция (PCR). В този ред на мисли след време е вероятно методи за откриване да могат да бъдат разработени за повечето, ако не и за всички редактирани гени в целевите организми, но само след като и ако компанията разработчик предостави достатъчно информация за естеството

на редакцията. Има обаче и едно голямо НО, да допуснем варианта, в който се открият модификациите, които са направени от генните инженери и които са известни, а как стои въпросът с детекция и доказване на настъпили редакции, модификации и изменения, които нямат фенотипна изява или респективно остават скрити, или пък такива, които не са изобщо известни. Научен преглед от Федералната служба за защита на потребителите и безопасността на храните (BVL) и института Julius Kühn също признават, че методите за откриване на ГМО обикновено не позволяват никакви категорични заключения за използвания процес, независимо дали са техники за гена редакция или по-стари техники за трансгенна генетична модификация, също така не винаги са откривани дори и чрез биоинформатиката и статистическите методи самите модификации на генома. Също така не трябва да се negliжира възможността неизвестни ГМО да преминат през официалния контрол. Откриването на неизвестни ГМО никога не е било зависимо единствено от методите за откриване, използвани в лабораторията. Съвместният изследователски център на ЕС заяви през 2017 г., че най-ефективният начин за тестване на вноса на неизвестни ГМО е да се проверят разрешителните в други страни, заявленията за патенти, научните публикации и друга информация, за да се приложи мултидисциплинарен подход. След това лабораторният тест за откриване на модификации може да се използва за потвърждаване на информацията, събрана от други източници. Днешните стратегии за скрининг на неизвестни ГМО не улавят всички от тях. Те идентифицират само тези, които носят определени общи генетични последователности, които се използват като „скриниращи мишени“. Но броят на генетично модифицираните култури, които нямат общи последователности, се увеличава през последните години. Възможно е понастоящем на пазара да има неразрешени ГМО, които не са открити, тъй като не съдържат общи последователности. Точно поради тази причина неизвестни генно редактирани култури също трябва да се категоризират просто в друга категория ГМ продукти, които изискват разработване на други по-специфични за конкретната редакция/модификация методи за скрининг, тъй като тези скриниращи вече съществуващи генни модификации методи могат да пропуснат модификацията/редакцията (например строго специфични методи като този, разработен за SU Canola).

Междувременно трябва да се изисква прозрачност от разработчиците и генните инженери на генно редактирани организми, както е за ГМО. Съгласно регламентите на ЕС за ГМО от селскостопанските биотехнологични компании се изисква да предоставят метод за откриване и „референтен“ материал за проби за всеки ГМО, който трябва да запълни пропуските в знанията, създадени от секретността на промишлеността. След като информацията от биотехнологичните компании бъде разкрита, то тя следва да бъде организирана в публично достъпен ресурс. Не е редно да бъде задача на правителствата, гражданското общество или академичните среди да запълнят пропуските в знанията, създадени от индустриалната тайна или пък на неправителствени организации, търговски организации и академични експерти, които да работят заедно, за да предоставят основна информация за генно редактираните култури, за да вдигнат воала за това как се модифицират растенията и да осигурят по-голяма прозрачност относно наличието и използването на редактиране на гени в храните. Прозрачността е от решаващо значение за изграждането на обществено доверие и доверие в генно редактираните продукти. Основната отговорност за прозрачността по отношение на генно редактираните продукти обаче се носи и от техните разработчици. ЕС трябва да гарантира, че потребителите правят информиран избор дали да консумират, купуват,

търгуват и развъждат продукти, животни, растителни култури, подложени на генна редакция или модификация. Би следвало всяка държава да вземе индивидуално решение дали на територията се внасят, развъждат, отглеждат, сеят, консумират и дистрибутират подобни продукти, съдържащи генна редакция, с цел спазване на суверенитета и идентичността на една държава и с цел правото на информиран избор, дадено на всеки гражданин. Трябва да има строги и регламентирани изисквания за етикетирание и разграничаване на тези продукти, съдържащи генна редакция или модификация, а не да се либерализира и демократизира с лека ръка подобна технология.

„Демократизацията“ на НГТ и патентните права

Като контрааргументи на гореизказаните препоръки, застъпниците на новите геномни технологии твърдят, че техниките за редактиране на гени, особено тези, които използват системата CRISPR/Cas, могат да революционират генното инженерство, защото са по-евтини и по-лесни за прилагане от по-старите техники за генетична модификация. В подкрепа, Дженифър Дудна, една от изобретателите на CRISPR, заяви, че технологията „се е превърнала в инструмент за демократизация, който позволява на лабораториите да правят експерименти, които в миналото са били забранени по различни причини, скъпоструващи или просто технически трудни или невъзможни.“ Байер от своя страна нарича CRISPR „най-демократичният„ инструмент за редактиране на гени, който е толкова „евтин и прост,, че може да се използва от „университети и институти, които нямат големи бюджети за научни изследвания“. Освен това се твърди, че ако редактирането на гени бъде освободено от обременяващите и скъпоструващи разпоредби на ЕС за ГМО, то ще бъде премахнато от контрола на големите агро-биотехнологични компании и ще бъде предоставено на публичните научноизследователски институти. Претенциите за демократизация чрез нови ГМ техники трябва да се разглеждат в светлината на факта, че тези техники са патентовани, както и техните продукти — растенията и животните, разработени чрез тях. Патентите са монополни права и притежателите на патенти имат право на до 20 години притежание въз основа на защитеното изобретение. Промислеността като заинтересована основна страна, Институтът MIT и Харвард, Калифорнийският университет, Вилнюският университет в Литва и Виенският университет като основните „изобретатели“ на CRISPR, твърдят, че регламентите за ГМО „предотвратяват развитието и използването на тези методи за развъждане на растения“. Именно тези институции държат патентните права над тези технологии, прилагането им и отглеждането на редактирани организми, което патентно право забранява на други да използват патентованото изобретение или налага такси за използването му. Става въпрос не само за ограничаване на търговията и развъдната дейност, но и за ограничаване на дребните производители или производителите на биопродукти да развиват своите стопанства и да заявят и отглеждат продукцията без ГМО или генна редакция, да не говорим за невъзможност за конкурентност на пазара.

Изключителните патентни права за част от технологиите вече са издадени и в Европа. „Основните играчи“ на арената на новите биотехнологии са гигантите Caribou Biosciences и ERS Genomics, DowDuPont (сега Corteva) и Bayer/Monsanto, както и основните създатели на технологията CRISPR Емануел Шарпентие и Дженифър Дудна. Преглед на базираните на CRISPR споразумения за лиценз на технологии за редактиране на гени е публикуван в Science през 2017 г. (<https://crispr-gene-editing-regs-tracker.geneticliteracyproject.org/>). Първата, Caribou Biosciences, е съоснована през 2011 г. от

един от изобретателите на технологията за редактиране на гени, базирана на CRISPR, Дженифър Дудна от Калифорнийския университет. Вторият, ERS Genomics, е съоснован през 2013 г. DuPont (по-късно DowDuPont и сега Corteva) е сключил лицензионното си споразумение с Caribou Biosciences през 2015 г. В сделката DuPont получи изключителни права за технологични приложения на CRISPR в основни редови култури и права върху други растителни култури. През 2016 г. Caribou Biosciences е подписал споразумение с дружеството Genus, в което последното получи изключителен лиценз за използване на технологията CRISPR при определени животински видове. DuPont също така постигна ексклузивно лицензионно споразумение с ERS Genomics през 2018 г. Споразумението дава на DuPont изключителни права за използване на технологията CRISPR в селскостопанския сектор. ERS Genomics също така **предоставя на DuPont права за подлицензи**. Основните разработки в областта на новите геномни техники в земеделието са работа на Дюпон, но под името на независима организация – **Corteva** от 2019 г., като така те **притежават лиценза за технологията CRISPR в областта на селското стопанство**. Donnenwirth DowDuPont са **комбинирали 48 основни патента в обща патентна група** (35 патента от Broad Institute, 4 от Калифорнийския университет, 2 от Университета във Вилнюс и 7 от DowDuPont). Според Donnenwirth DowDuPont достъпът до всички патенти е необходим за пълното разкриване на практика на потенциала на приложения на технологията в селекцията на растителните култури. DowDupont предлагат **право на ползване на тези патентовани технологии, но срещу конкретни такси, задължения за докладване, спазване на насоките и конфиденциалност**. Първата компания, която работи по лицензираните технологии CRISPR при тези условия през 2018 г., е американската компания Simplot, която разработва ГМ картофи. През 2019 г. последва френска компания Vilmorin & Cie.

„Демократичните“ пълномощия за използване на техниките за гenna редакция се определят не само от достъпа до технологиите, но и от достъпа до техните продукти — **генно редактирани растителни култури, семена и животни**. Но трябва да се има предвид, че както технологиите, **продуктите също са ограничени от правата на интелектуална собственост**. Като правило, **патентите обхващат методи, семена, растения, животни, а често и реколтата и микроорганизмите, подложени на гenna редакция**.

Например Bayer/Monsanto и DowDuPont са кандидатствали за патенти върху генно редактирани растения, устойчиви на глифозат. Syngenta и BASF също участват в класацията на кандидати за патентоване на устойчиви на хербициди растения като соя, царевица, маслодайна рапица/каньола (рапица) и памук. Заявления за патент са подавани и от традиционни развъдни дружества като Rijk Zwaan и KWS.“

Преглед от 2016 г. на *Egelie, K.J., Graff, G.D., Strand, S.P. и Johansen, B., 2016. „The emerging patent landscape of CRISPR–Cas gene editing technology“*, е установил, че **повечето от патентите са притежание на същите компании, които доминират на пазара на ГМО и с продукти за растителна защита**.

В дискусия по темата, *Maywa Montenegro de Wit* изказва своите опасения за получаване на достъп до технологията CRISPR, като посочва, че **„Достъпът до традиционни сортове може да бъде изместен чрез разширени пазари на нови биотехнологични култури или пък традиционните сортове да се използват като генетични ресурси за генно редактирани сортове**. Съществува опасност земеделските стопани да бъдат принудени да плащат за достъп до генно редактирани семена и породи, но да загубят достъп до семена и породи, които не са генетично модифицирани или са диви или местни видове.“

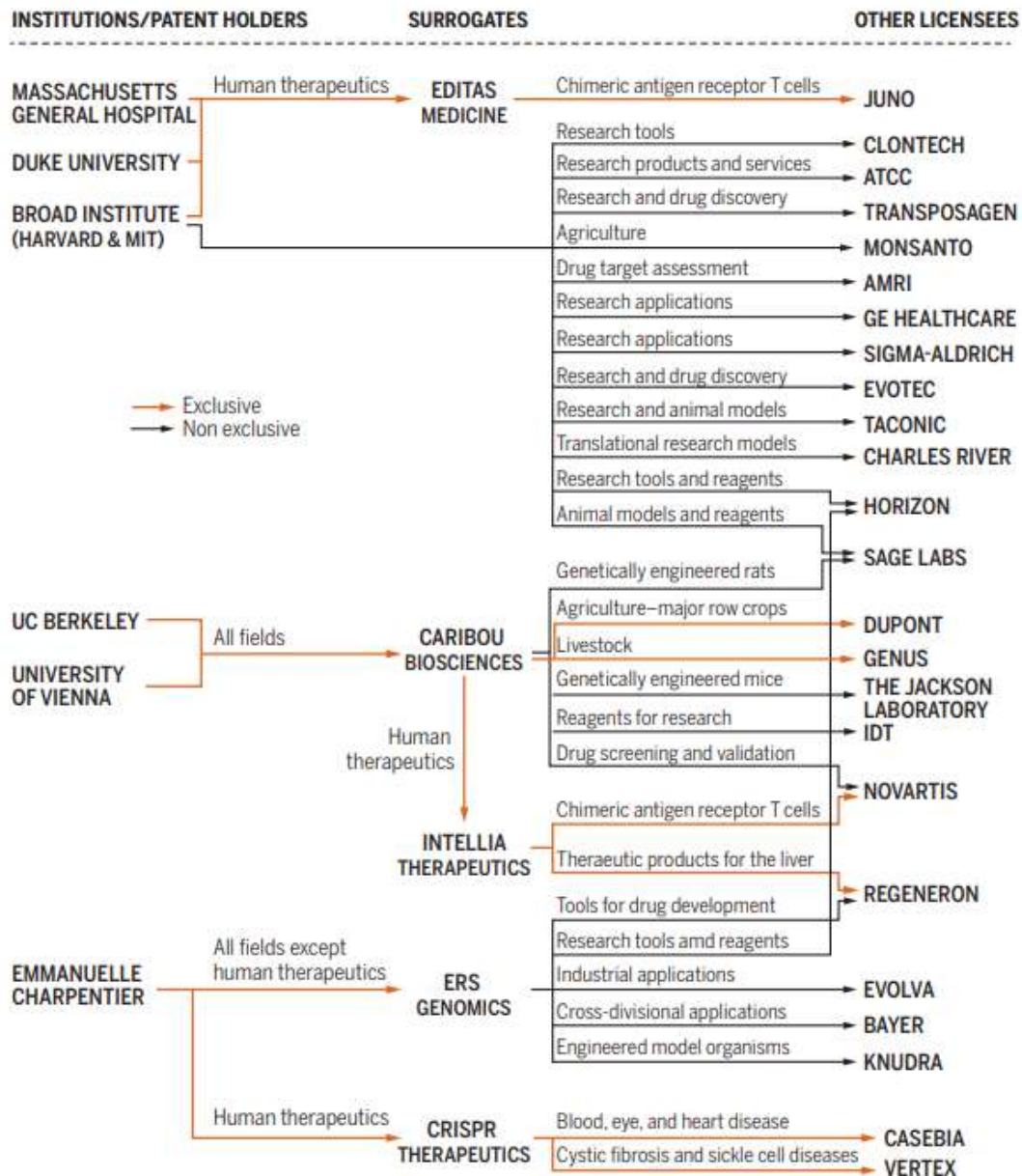
(Montenegro de Wit M. *Democratizing CRISPR? Stories, practices, and politics of science and governance on the agricultural gene editing frontier*. Kapuscinski AR, Fitting E, eds. *Elementa: Science of the Anthropocene*. 2020;8(9). doi:10.1525/elementa.405).

От изложените примери и факти става ясно, че за малките и средни предприятия има много малка перспектива първо да развиват генно редактирани култури и животински видове заради патентното право, камо ли пък да издържат на постоянно променящите се климатични условия, според молекулярния генетик д-р Майкъл Антониоу, който има дългогодишен опит в разработването на патентовани биотехнологични продукти за медицински изследвания с малки и средни предприятия и по-големи компании. Той обяснява, че заради различните видове лицензи за технологии като CRISPR редактирането на гени, както и таксите, които се изискват за използването на подобни патентовани технологии, е **трудно първо да се направят оценки на риска или каквито и да е научни изследвания, тъй като данни трябва да се предоставят от патентоприетелите или техните дъщерни дружества, за да може да се проведе предварителна работа по оценка дали технологията може да бъде полезна**. Лицензите за оценка и научни изследвания на NGT често се предоставят доста евтино, а таксите дори могат да бъдат отменени напълно, но това е едва в началото, но на етапа на комерсиализация нещата могат бързо да придобият друг облик и да станат много скъпи, като притежателите на патентите за тези технологии **изискват високи такси за използването им или при дистрибутирането и продажбите на продукти, съдържащи патентовани генно редактирани организми** или пък патентована технология за производството им. Например Кортева (Corteva) е поела ангажимент да позволи свободен достъп до технологията CRISPR за „университети и организации с нестопанска цел и за академични среди“, като целта е CRISPR технологията да попадне „в ръцете на много,“ но учените ще могат да използват CRISPR само за нетърговски или научни изпитвания, а не за разработване на търговски продукти или търговия и дистрибуция на такива сред широката общественост.

Селекционерите на растителни култури и растителен репродуктивен материал, които използват конвенционално развъждане за създаване на нов растителен сорт, могат да го защитят чрез правата на селекционерите, но ако решат да използват CRISPR (независимо дали технологията е регулирана като GM), те ще трябва да работят с много по-сложен и скъп процес и ще трябва да заплащат такси на притежателя(ите) на патент за CRISPR както на етап научноизследователска и развойна дейност, така и на етап комерсиализация на конкретен продукт.

CRISPR-CAS9 licensing agreements

Exclusive licenses to surrogates for human therapeutics limit access to CRISPR as a platform technology.



Източник: Contreras, J.L. and Sherkow, J.S., 2017. CRISPR, surrogate licensing, and scientific discovery. *Science*, 355(6326), pp.698-700.

Патентните и лицензионните такси ще повишат значително разходите за разработване на сортове. Патентните такси могат лесно да се натрупват до шест цифрени суми, като също така патентоването може да продължи с години, което за малките и средни производители би било непосилно нито да си позволят притежание на патенти и търговски лицензионни споразумения, свързани с прилагане на NGT, нито пък отглеждане и развъждане на генно редактирани животни, растения и микроорганизми. Така биотехнологиите и употребата им в агрохранителната верига ще остане достъпна единствено за големите корпорации или за изследователите, които създават и използват тези нови геномни технологии, което също важи и за патентните права върху конкретните технологии и продуктите от тях. Изводът е, че редактирането на гени е игра за големите играчи и ще остане така. Твърденията, че CRISPR ще предостави на малките и средни предприятия достъп до тези технологии и произведените чрез тях продукти, са мит. Опитът с генното инженерство

до момента показва, че **патентното право за момента е основната движеща сила и контролира развоя и внедряването на тези технологии в производствата**. Следователно технологията за редактиране на гени няма да направи генното инженерство достъпно за публично финансирани програми за развъждане, а допълнително ще консолидира контрола върху тези технологии в рамките на големите корпорации.

Дебат в Европейския съюз по предложението за ново законодателство за НГТ

Все още остава мит твърдението, че **генната редакция е бърз или надежден път към желаните резултати и че генното редактиране дава резултати много по-бързо от конвенционалната селекция и развъждане**. Макар редактирането на гени да се промотира като най-бързият и ефективен начин за постигане на целите за селекция на растенията от компании като Кортева и Байер, има все още много стъпки преди да се пуснат на пазара **генно редактирани продукти, дори без да се сравняват технологиите за генна редакция с тези при конвенционалното развъждане и селекция**. Да не говорим, че все още има неясноти и несъгласие на ДЧ на Европа с Предложение за Регламент на европейския парламент и на съвета относно растенията, получени чрез някои нови геномни техники, и храните и фуражите, произведени от тях, и за изменение на Регламент (ЕС) 2017/625.

Държавите членки на ЕС в заседание на 07.02. 2024 г. гласуваха „за“ и „против“ **проекта Регламента**, като пресъобщението е налично на следния адрес: <https://www.euractiv.com/section/agriculture-food/news/european-parliament-adopts-its-position-on-gene-edited-plants/>. В обобщение Европейският парламент на 7 февруари одобри измененията на новите правила за силно противоречивите нови геномни технологии (NGT). **Текстът е одобрен от пленарната зала с 307 гласа „за“ срещу 263 „против“ и 41 „въздържал се“**, като мнозинството подкрепи предложението за създаване на нова рамка за NGT, които в момента попадат в по-рестриктивната рамка за генетично модифицирани организми (ГМО). Депутатите от дясноцентристката Европейска народна партия (ЕНП) и либералната група Renew подкрепиха с огромно мнозинство текстовете на **проекта Регламента**, докато Зелените и левицата почти единодушно го отхвърлиха. Гласовете на социалистите и демократите (S&D) и европейските консерватори и реформисти (ECR) бяха разделени по географски признак. Много **социалисти от Южна Европа** – за разлика от техните северни колеги – подкрепиха Регламента, докато редица евродепутати от **източноевропейските страни** – за разлика от други националности – гласуваха против него. Законодателите одобриха създадените две категории NGT: **генно редактирани растения, които са „неразличими“ от тези, получени чрез конвенционално развъждане (NGT 1) – които ще бъдат освободени от изискванията на законодателството за ГМО – и тези с по-„сложни модификации“ (NGT 2) – които все пак ще трябва да подлежат на по-строги правила**. Евродепутатите са на мнение, че **всички NGT продукти трябва да имат задължително етикетироване**. Но в предложението на Комисията етикетироването на растения NGT 1 е ограничено до семената. Също така в съответствие с изпълнителната власт на ЕС, евродепутатите гласуваха **всички NGT да бъдат изключени от биологичното производство, „тъй като тяхната еквивалентност изисква допълнително разглеждане“**. Докато Комисията остави въпроса за патентите неразрешен, **евродепутатите са единодушни, че трябва да се въведе пълна забрана за патенти върху NGT, „за да се избегне правна несигурност, увеличени разходи и нови зависимости за фермерите и животновъдите“**.

Вземането на окончателните решения сега се пада на Съвета на ЕС. Часове след гласуването в Европейския парламент **държавите членки на ЕС не успяха да постигнат**

консенсус и споразумение по текстовете от проекта Регламента, тъй като основния крайгълен камък е патентното право върху NGT. Белгийското председателство на Съвета въведе промени, за да подсили разпоредбите относно патентите, които Испания предложи през декември, когато заемаше ротационното председателство. Въпреки промените в компромисния текст, позициите на държавите членки са били по същество същите в сравнение с декемврийското заседание на Съвета. Паскал Канфин, председател на комисията по околна среда на Европейския парламент (ENVI), каза пред Euractiv, че **ако страните от ЕС не постигнат споразумение през „следващите няколко дни“, е много малко вероятно законодателството да бъде одобрено преди изборите за ЕС през юни.**

Европейската асоциация на индустрията за семена Euroseeds и асоциацията на фермерите в ЕС COPA и COGECA са на мнение, че **новите геномни техники в растениевъдството са „значителна стъпка напред за селскостопанските иновации и устойчивост в Европа“** и ще помогнат на селското стопанство **„да съгласува производството и адаптирането към изменението на климата“** и че третирането им като ГМО е **„анахронично от гледна точка на науката и фермерите“**. Междувременно Грийнпийс са на мнение, че няма **„надеждно доказателство, че NGT могат да издържат на въздействието на изменението на климата“**. Неправителствената организация Friends of Earth Europe призна **„опита на Парламента да ограничи патентите“** върху NGT, но изказа мнение, че **фермерите и животновъдите все още ще бъдат изложени „на съдебни дела за нарушения“** от корпорациите в агробизнеса относно патентните права върху тези технологии. Големите корпорации като Кортева, често твърдят, че този проект Регламент само допълнително ще утежни внедряването на тези технологии в агрохранителната верига и ще забави развитието на тези биоинженерни техники. Компанията твърди, че **„причисляването на CRISPR-произведените култури като ГМО значително ще забави пътя им към пазара и възприемането на иновациите CRISPR в селското стопанство“**.

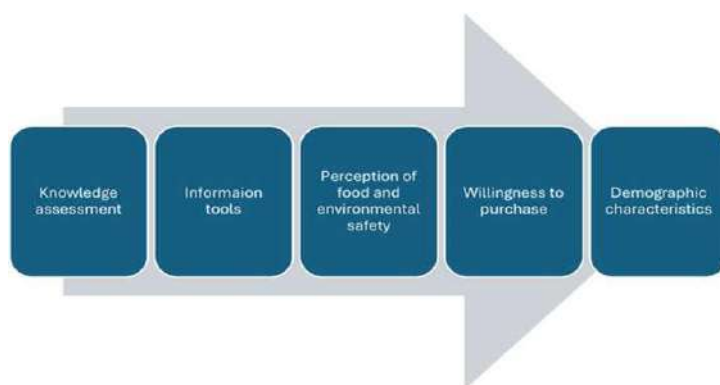
Социологически проучвания - бързина при разработката на НГТ и приемането им от обществото. Изводи и препоръки за оценка на риска, контрол и мониторинг.

Като контрааргумент, отглеждането на нов растителен сорт обикновено е продължителен процес и **няма категорични доказателства в подкрепа, че производството на жизнеспособен генно редактиран сорт ще бъде по-бързо.** Дори в страни с облекчени регулаторни механизми за контрол над новите геномни техники, като САЩ и Канада, **много малко генно редактирани продукти са стигнали до пазара и подкрепата на обществеността не е 100%.** Например, създаването на генно редактираните домати, одобрен от японското правителство през 2020 г., които са проектирани да съдържат съединение, за което се твърди, че понижава кръвното налягане, е отнело 15 години. Това е същият период от време, необходим за конвенционално селектиране на растителна култура с желани характеристики с по-стари методи. Освен това, генно редактираните растения трябва да преминат през труден процес на скрининг, подбор и кръстосване с родителските линии, за да се премахнат всички очевидни нежелани мутации, също така задължително трябва да бъде извършена обстойна оценка на риска. **А какво ще се случи с недоказаните или скритите мутации, които не са изследвани изобщо, особено в дългосрочен план?**

Става ясно, че макар някои от продуктите като домати, рапица и ориз, постигнати с генна редакция да са създадени, патентовани и одобрени за пускане на пазара още преди 15 - 20 години, все още те **не са стигнали до големите световни пазари, а се предлагат на местно ниво, тъй като недоверието на потребителите и широката общественост към генно**

редактираните храни също забавя така „желаната“ комерсиализация на подобни продукти. Например, в Япония, проучване на около 10,000 души показва, че едва 10% от анкетираните показват интерес към изпробване на генно редактирани продукти.

В подкрепа на проучването от Япония, в обстойно анкетно проучване и анализ на нагласите на населението в Италия (*Consumer Evaluations of and Attitudes towards New Genome Editing Techniques: An Italian Case Study* на авторски колектив *Simona Romeo Lironcurti, Federica Demaria, Raffaele D'Annolfo and Roberta Sardone*), става ясно, че от основно значение за потребителите са: познанията им за генетичните техники, информационните инструменти, с които информацията за тези технологии достига до тях, екологичната устойчивост и безопасността на храните и здравето на потребителите. Изследователските цели в това анкетно проучване са две: а) да се оцени нивото на знания и б) да се определи как социалните и демографските характеристики на населението влияят на нивото на осведоменост на потребителите. Структурата на този въпросник и анализ включва следните компоненти: първи етап от въпросника - самооценка на знанията по въпроси, свързани със субективни и обективни знания за NGT (т.е. изследва това, което потребителите мислят, че знаят за новите геномни техники (NGT) и това, което те наистина знаят); следващите въпроси се отнасят до инструментите, използвани за получаване на информация за NGT; третият раздел включва възприятията на населението относно NGT и безопасността за околната среда, безопасността на храните и желанието за закупуване на ГМ продукти и на последно място, но не по важност – демографските характеристики на дадена популация.



Анализът показва, че само малък процент от потребителите познават новите геномни техники; и обратно, повечето потребители са запознати с ГМО. Само 16% от анкетираните заявяват, че съществуват различия между ГМО продуктите и продуктите, получени чрез използването на нови геномни техники, и знаят какви са те. Освен това става ясно, че потребителите се чувстват по-уверени, ако NGT продуктите произхождат от най-заможните страни (Западна Европа и САЩ). Тези резултати показват, че и нивото на образование зависи от субективните и реални знания, както и от различните информационни инструменти, използвани за подобряване на познанията на потребителите. Потребителите често предпочитат ненаучни информационни инструменти, като интернет и медии, които могат да съдържат не само достоверни източници, но и субективни и неподкрепени научни факти. Освен това субективните знания са свързани и с доходите на потребителите и покупателната им способност.

Информацията за новите геномни техники и ГМО трябва да бъде адаптирана към населението, трябва да бъде достъпна и разбираема и тук ролята на научната общност е ключов момент: изследователите, заедно с други заинтересовани страни (напр.

правителствени агенции, регулаторни органи, неправителствени организации, бизнес операторите и биотехнологични дружества), следва да си сътрудничат при разработването на комуникационни стратегии и дейности за разпространение, за да има обикновения потребител информиран избор за в бъдеще и как новите геномни техники се различават от вече познатото ГМО. Правилната комуникация и правото на информиран избор биха могли да играят ключова роля в информирането на хората и евентуална промяна на нагласите на обществото. В бъдещо проучване на авторския колектив се предвижда изследване на нагласите на обществото относно бъдещото законодателство за новите геномни техники, кой следва да упражнява контрол върху вноса, търговията, отглеждането и консумирането на тези храни, строго наложителното етикетиране на NGT продуктите, възприемането на риска и готовността на потребителите да закупуват и консумират подобни генно редактирани храни.

В проучване и отчетен вот на консуматорите от BfR (*Consumer vote, results of the BfR Consumer Conference "Genome Editing in the Field of Nutrition and Human Health" 2019* - <https://www.bfr.bund.de/cm/349/consumer-vote-genome-editing.pdf>) също са набелязани притесненията на обществеността относно приложението на новите геномни техники. Анкетиранията в Германия са на мнение, че нито една технология не е 100% безопасна и винаги могат да възникнат грешки. Принципът на предпазливост следва да ръководи всички решения и действия. Нито един метод не е добър или лош сам по себе си. Редактирането на генома е инструмент, с който трябва да се борави с огромна отговорност и предпазливост, само в контролирани условия. Затова са необходими адекватни и строги правила и закони. Запазването на биоразнообразието и опазването на околната среда и почвите следва винаги да се вземат предвид. Все пак трябва да се отбележи, че алтернативите на генното инженерство като завишената употреба на пестициди и класическата мутагенеза също не са с нулев риск, като например употребата на пестициди засяга и много нецелесъобразни видове животни и влияе върху здравето на потребителите, а класическата мутагенеза създава хиляди нежелани модификации в генома. Методите за редактиране на генома трябва да се разглеждат спрямо всяка отделна употреба и спрямо вида целеви организъм. NGT продуктите трябва да преминат строга и обективна оценка на риска, като не е достатъчно да бъде оценен само процесът или методологията, която се използва. Трябва да се изясни дали крайният продукт на технологията за редактиране на генома наистина попада в обхвата на Законодателната рамка за ГМО или бъдещият проект Регламент за новите геномни техники. Трябва да се разработят техники и лабораторни методи за изпитване и проверка на конкретни генни редакции, ефектите от тях, дали не са предизвикали ефекти извън целта в генома на таргетния организъм и в дългосрочен план дали тези редакции са устойчиви в поколенията и какъв ефект би имала дългосрочната консумация на генно редактирани продукти. Към днешна дата няма методи, позволяващи безопасното прилагане на редактирането на генома директно върху хора, макар да са правени неетични и неморални опити по въпроса. Основните изследвания на възможните рискове от приложението на геномното редактиране трябва да бъдат финансирани и осъществени от държавата. Финансирането следва да бъде насочено към защита на хората, животните и околната среда. Целта на подобни изследвания е да се подобри и защити живота на хората и благосъстоянието на животните, а не да се реализира печалба. Към финансирането на приложенията за редактиране на генома трябва да се подхожда критично и притежателите на патенти трябва да документират процедурата и да предоставят, проверяват и публикуват методи за проверка и контрол.

Съществува почти общ консенсус, че е **необходимо да се разпространяват и прилагат успешни и изпитани във времето методи и техники за отглеждане от екологичното земеделие в конвенционалното земеделие**. Съществува единодушие и по темата, че хербицидната резистентност на някои генно редактирани култури и създадените Bt царевица/Bt памук в крайна сметка са довели до увеличаване на употребата на пестициди и до намаляване на добива, което не е крайната цел на тези разработки. Освен тези отрицателни ефекти от употребата на тези технологии, повечето от участниците в това проучване са на мнение, че **трансферът на чужди гени е съмнителен от етична гледна точка**.

В тази връзка в този вот, обобщен от BfR, са посочени **конкретни изисквания за прилагане на тези нови технологии**:

- **Запазване на принципа на предпазливост**
- **Свобода на избор за потребителите**
- **Свободен достъп до информация и прозрачност**
- **Даване на приоритет на социалните аспекти пред икономическите интереси**
- **Реформа на патентното право: липса на патентна защита за живи същества**
- **Отговорност за неочаквани ефекти от приложението на новите геномни техники, причинени от производителя**
- **Етикетиране на геномно редактирани храни, дори когато във фуражите се съдържат NGT продукти (напр. за мляко и месо).**

Относно процедурите за одобрение на храни и фуражи за животни, които съдържат NGT продукти са посочени следните изисквания:

- **Независимо изследване**
- **Оценките на риска не трябва да се основават на проучвания, които самата компания-заявител е извършила.**
- **Унифицирани насоки относно доказателствата и проучванията, които трябва да бъдат изготвени**
- **Универсални насоки за извършване на качествен контрол върху храната за животни**
- **Оценката на риска трябва да бъде адаптирана, за да отговори на предизвикателствата на редактирането на генома, напр. в сектор храни и фуражи: 90-дневните опити за с плъхове са твърде кратки.**
- **Дългосрочни опити, свързани с консумацията на съдържащи NGT продукти храни и фуражи трябва да се извършват дори след одобрение.**
- **Повторна оценка на риска трябва да се извърши една година след одобрението или периодично с цел проследяване на дългосрочните ефекти от консумацията на NGT продукти.**

- Трябва да се наблюдават по подходящ начин общите екологични ефекти от приложението на новите геномни техники и също така щателно да бъдат тествани.

Контролните органи трябва да са постоянно нащрек за злоупотреба с технологията и биохакинг/биотероризъм, а когато няма подходящ механизъм за контрол, то тогава „всеки сценарий“ е възможен. За да се избегнат измами, независими експерти следва да изготвят стратегия за наблюдение с цел подобряване на контрола. Немаловажен факт е липсата на независима комисия, която да прави оценка на риска или да осъществява самостоятелен контрол над тези технологии и продуктите, постигнати чрез тях, за да се постигне така желаното устойчиво и социално балансирано селско стопанство.

Тези констатации от проведените анкетни проучвания в Япония, Италия и Германия и гореизложените факти относно ефективността и безопасността на NGT водят до извода, че редактирането на гени не е най-ефективният и бърз начин за получаване на успешни селскостопански характеристики, за които толкова много се лобира, камо ли пък да послужат като инструмент за справяне с продоволствена сигурност или пък постоянно изменящите се климатични условия, както се твърди. Дори в Китай, където обществеността е широко отворена към новости и по-специално в биотехнологиите и във внедряване на новите геномни техники в агрохранителната верига, са отчели в проучвания на широката общественост едва 30-40% подкрепа и ограничени предпочитания за консумация на генно редактирани храни, същият е процентът в нагласите на обществеността и за отглеждане на генно редактирани култури или животни.

В продължение на проведените проучвания върху нагласите на населението относно новите геномни техники, в съвсем ново обстойно анкетно проучване на тема: „*New genomic techniques, old divides: Stakeholder attitudes towards new biotechnology regulation in the EU and UK*“ на авторски колектив Jonathan Menary, Sebastian S. Fuller (<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0287276>) към заинтересованите страни са отправени следните въпроси: 1) Как трябва да се регулират новите методи и разработки в биотехнологията в ЕС/Обединеното кралство?, 2) Какъв вид информация е необходима за процеса по регулиране на новите геномни техники?, 3) Дали консултацията със заинтересованите страни относно новите геномни техники е правилният подход?, 4) Кои организации или субекти са най-влиятелни при определянето на политиката за селскостопански биотехнологични разработки?, и 5) Какви пътища се използват за влияние върху политиката? Отговорните институции за научни изследвания и иновации подчертава важността на диалога между разработчиците на технологии и заинтересованите страни, включително обществеността. Какви са обаче мненията на заинтересованите страни относно регулирането на NGT в Европа и виждат ли те тези консултации като възможности за ангажираност с управлението и регулаторната рамка на тези технологии? Проведени са интервюта с експерти от редица групи заинтересовани страни в хранително вкусовата промишленост в Европейския съюз и Обединеното кралство, за да се разберат настоящите нагласи към новата регулаторна рамка за биотехнологиите и новите геномни техники, как се възприема процеса на консултации и на двете места и какво влияние чувстват заинтересованите страни, че имат при оформяне на законовата рамка. Установено е, че дискусиата е подобна както в ЕС, така и в Обединеното кралство, с предвидими и фиксирани мнения, ръководени от нагласите към възприеманите рискове, свързани с директната мутагенеза. Анкетните проучвания на заинтересованите страни в Обединеното

кралство и ЕС показват, че е **необходим активен диалог и да бъде взето мнението на всички страни – включително широката общественост и неправителствените организации.**

Установено е също, че **участниците в проучването могат да бъдат групирани в два „лагера“, като възгледите на участниците за това как най-добре да се управлява употребата на NGT обикновено се корени в биологичния риск.**

За представителите на неправителствени организации, биологичните производители, привърженици на агроекологията и др. групи производители и фермери, пчелари, които са групата „против“ смекчаването на регулаторните процеси за генно редактирани култури, директната модификация на генома на растението е от първостепенно значение: не става дума дали то съдържа чужди гени или не, това е тази директна модификация на генома, която според тази група от заинтересовани страни е несъвършена, като според тях биотехнологията е несъвършена наука. Според тази група от заинтересовани страни като негатив и висок рисков фактор се изтъкват неизвестните въздействия върху целевия организъм, нецелевите генетични ефекти, съмнение за специфичността на технологиите и относителната вреда/полза на единични точкови мутации. Тази група призовава за базирана на процеса оценка на риска от културите, получени чрез NGT. Те смятат за рискова всяка директна модификация на геномите (напр. представители на неправителствени организации), виждат и присъщ риск в използването на биотехнологиите и в растителните култури.

Обратно, повечето участници от научните институти, занимаващи се с биотехнологии, индустрията и бизнесоператорите са подкрепили продуктово базирана регулация на такива култури и като обосновка посочват факта, че NGT водят до промени в генома на таргетното растение, неразличими от тези, получени чрез конвенционалната селекция. Те разглеждат организмите, редактирани посредством NGT, като неразличими от „естествено селектираните“ еквиваленти и не виждат повишен риск спрямо конвенционалното развъжданите и са склонни да се фокусират върху ползите от NGT, а не върху рисковете.

Големите надежди и обещаващи постижения, които се възлагат на биотехнологиите като цяло не са изпълнени и **причината за негативното отношение към тези технологии вероятно се дължи точно на неоправданите очаквания и на не дотам ефективната технология, което от своя страна води и до трудности за комерсиализация на тези генно модифицирани или генно редактирани култури в Европа.** Ако в дългосрочен план тези технологии се изпитат и покажат категорично неоспорими ползи за агрохранителната верига и се докаже тяхната неоспорима безопасност за човека, животните и околната среда, спазено е напълно законодателството и респективно е извършена критична и обстойна оценка на риска спрямо всяка конкретна употреба на NGT, то тогава всеки регулаторен процес ще доведе до разрешение на тези продукти и всеки би се осмелил да използва тези растения. – мнение, изразено от представител на НПО от групата против новите геномни техники. **Най-често изтъквания риск от NGT са неизвестни или непредвидени последици от новите геномни техники, както за околната среда чрез генетично замърсяване, така и за човешкото здраве чрез консумация на модифицирани култури.** Значителен акцент е поставен върху сегашните знания за генетиката на растенията, които са недостатъчни, за да се оценят адекватно тези непредвидени последици.

От друга страна, **изследователи в областта на биотехнологиите и представители на индустрията подчертават като ключови предимства на NGT подобрената устойчивост на болести, по-бързото постигане на целевите черти в растителните култури и толерантността на генно редактирани растения към топлинния стрес и към сушата,**

както и намаляването на употребата на пестициди и торове. Подобряването на хранителния профил на генно редактираните култури и намаляването на нивата на токсигенни съединения, открити в определени храни, също се изтъкват като ключови предимства. Някои изследователи в областта на биотехнологиите подчертават риска от неизползване на биотехнологиите в основните растителни култури, тъй като според тази група подкрепяща NGT, европейската конкурентоспособност при отглеждането на подобни редактирани растения ще се повиши, добивите също, както и способността да се предоставят на европейските фермери и потребители подобрени устойчиви сортове и храни. Представители на групата, подкрепяща NGT, от индустрията са дали като пример за успешно приложение на тези технологии ваксините срещу COVID-19, като разработването им изцяло е плод на генното инженерство и синтетичната биология. Тази група от заинтересовани страни също така изтъква новите геномни техники като възможен вариант за справяне с острата продоволствена несигурност в Европа и категорична необходимост от внедряване час по-скоро на тези нови технологии в селското стопанство.

Относно оценката на риска, многобройни фактори са счестени от участниците за релевантни за регулирането на употребата на биотехнологиите при растителните култури. За привържениците на тези технологии, е желателно смекчаване на мерките в законодателството относно техниките SDN-1. Според някои заинтересовани страни регулаторната рамка на Европейския съюз е достатъчна като бъде negliжирана и Директива 2001/18/ЕО, за да се справи с проблемите около новите храни. Трябва да се прави оценка на риска за конкретен продукт, отколкото основана на процеса форма на регулиране, при която всички мутагенни събития се оценяват за всеки отделен случай. Най-често срещаното мнение сред индустрията и бизнесоператорите е да се настоява за техническо изменение на приложенията на Директива 2001/18/ЕО. Обратно, представители на неправителствени организации са на мнение, че генетично редактираните култури трябва да останат включени в законовата рамка за ГМО и да останат в обхвата на настоящата директива.

На въпроса дали има разлика между по-новите и по-старите геномни техники, е отбелязано, че се наблюдават същите проблеми, същите дебати, същите групи за и против, и нищо не се е променило в това отношение при NGT спрямо техниките от по-старо поколение.

Патентното право и интелектуалната собственост са изтъкнати като ключови проблеми от представителите на НПО, като са представени ясни възможности за по-лесно патентоване на генно редактирани култури и респективно насърчаване на корпоративния контрол върху хранителните системи.

Поставен е въпросът за патентните права върху сортовете семена от *Community Plant Variety Office* (CPVO), който проблем е критичен за привържениците на NGT и за тези, които отказват да приемат новите геномни техники в ЕС, тъй като селекционерите ще трябва да знаят произхода на определени сортове – или по-конкретно, постигнатите чрез генна редакция фенотипни черти – за техните собствени програми за развъждане и ще трябва да заплащат патентни такси.

Въпросите за проследимостта и етикетирането на продуктите, съдържащи генно редактирани растителни/животински продукти също са важни за много от участниците в това проучване. Наблюдава се загриженост както от страна на индустрията, така и от представители на неправителствени организации, че неетикетирани генно редактирани

сортове могат да застрашат сертифицирането на органичното производство и биоземеделнието. И двете страни са категорични, че трябва в проекта Регламента да се разпише задължително условие за етикетиране на тези NGT продукти.

В Обединеното кралство са повдигнати и въпроси относно възможността за износ и търговия с определени NGT храни за ЕС, ако законопроектът остане рестриктивен относно новите геномни техники и употребата им при растителни култури и употребата на тези технологии от селекционерите.

Относно една от често „рекламираните“ ползи от редактирането на гени, а именно едноточковите мутации, представители на неправителствени организации са отбелязали, че селекционните програми за растения рядко са ограничени до една цел, а включват множество други промени, въведени по време на процеса по селекция. Според независими учени, участници в проучването, в оценката на риска трябва да се вземат предвид и броят на отделните модификации, направени в процеса на селектиране. За повечето от разработчиците на биотехнологии и представители на индустрията научнообоснованата оценка на риска не се възприема като окончателна, а по-скоро бива повлияна и от политически мотиви като е поставен сериозен въпрос: „Кой решава кои фактори се вземат предвид при оценка на риска?“ Участниците, представляващи неправителствени организации, също са поставили под въпрос дали оценката на риска отразява адекватно „баланса на интересите“ в европейското селско стопанство и насърчава по-широка форма на оценка, която включва социални и икономически съображения.

Относно комуникацията и достигането на информацията относно новите геномни техники и техните приложения до по-голяма аудитория, по-голяма част от заинтересованите страни са на мнение, че дискуссионните форуми, организирани от ЕК и заинтересованите страни трябва да са по-отворени, диалогични, да са на достъпен за широката общественост език, да бъдат обсъждани и обществените опасения относно приложението на тези технологии, с цел постигане на висока информираност на широката общественост.

Продължаващото влияние на големите мултинационални компании и корпоративните им интереси като цяло и основната им роля в разработването, отначало на ГМО, а после и на NGT, е третирано с подозрение от представители на НПО и много фермерски организации. Също така в това проучване се отбелязва, че е необходима активна комуникация между двата „лагера“ „за“ и „против“ при разработването на политики в областта на биотехнологиите на културите. Според цитати на представители на индустрията: „... потърсихме споразумение с неправителствените организации, включващи сектор биоземеделие, и разбираме, че те никога няма да приемат цисгенезата като не-ГМО техника.“, „...друг начин за комуникация може да бъде това, да бъде организиран открит форум за диалог относно предимствата и недостатъците на NGT и потенциалните им приложения, като поканихме различни заинтересовани страни и обществеността и след това проведохме разговори и дискусии...“

По този модел в България Институтът по физиология на растенията и генетика (ИФРГ) към Българската академия на науките (БАН) организира на 16 февруари 2024 г. дискуссионен форум и информационен ден на тема: „Новите геномни техники - възможности и предизвикателства пред изследователите и земеделските производители“. Информационният ден беше насочен към представяне на иновациите и постиженията в геномното редактиране на организмите, както и към предизвикателствата в

условия на климатични промени, пред които са изправени учените и земеделските производители. Лекторите дискутираха последните тенденции и научни разработки в областта на геномните технологии, които засягат селското стопанство и медицината, като акцентираха върху конкретни резултати и ползи. Направи впечатление, че **в презентациите, представящи продуктите на NGT – животни и растения, бяха изтъкнати само ползите, а не бяха разгледани обективно страничните ефекти, несполуките, спрени от одобрение NGT продукти и евентуалните рискове и опасности.** В допълнение по време на дискусиата между различните участници, бяха засегнати етичните и правни въпроси, както и нормативната регулация, свързана с приложението на новите геномни техники. Въпреки това, **участниците се сблъскаха с неразрешимите възгледи между различните групи заинтересовани страни.**

От своя страна сдружения на биопроизводителите в България проведоха няколко форума от началото на 2024 г. с представители на независими граждански и браншови организации и сдружения, медии, експерти, учени, лекари, адвокати, потребители, депутати от Народното събрание, Министерството на земеделието и храните, Министерството на околната среда и водите, Министерство на здравеопазването, с цел да запознаят обществеността с новото законодателство за новите геномни техники в растениевъдството и да **изразят силните си притеснения и възражения по проблеми, които според тях това законодателство ще създаде:**

Сдружение АГРОЛИНК организира пресконференцията във връзка с изключването от контрол на новите геномни техники, която се проведе на 08.12.2023 г., след което на Кръглата маса в София на 05.01.2024 над 120 земеделски и пчеларски организации, граждански и браншови организации, учени, адвокати, лекари и потребители и учени заявиха своята **Обща позиция**³ с настояване българското правителство и парламентаристи да гласуват против изключването на новите ГМО от регулиране поради **силни опасения за опасностите, които растенията, постигнати с нови геномни техники ще създадат за земята, храната и природата, за здравето на хората и налагането на патенти за контрол върху земеделските производители.**

Същите организации (вече 140 на брой) на 08.02.2024 г. организираха **още една конференция, с която стартираха Движение „Да опазим българската земя и храна“** и представиха своята позиция за **защита правото на избор на семена за производството, достойнството на българската земеделска наука, както и с каква храна да се хранят българите, правото да се живее сред природа с богато естествено биоразнообразие – най-ценно наследство и завет за бъдещето.**

В България се очертава силна позиция на неприемане на освобождаването от законодателството за ГМО на новите геномни техники от страна на гражданското общество и голяма част от земеделските производители.

Обобщение и заключение на раздела:

В обобщение, **позицията на различните групи заинтересовани страни към биотехнологиите и приложението им остава зависима от възприеманите рискове, като се започне от самите процеси по генна редакция/модификация, достигайки до социално-икономически съображения.** Тези позиции са валидни както в Европейския съюз, така и в Обединеното кралство. Двата широки лагера „за“ и „против“, които са формирани още около

³ <https://www.agrolink.org/bg/novini/210-obshta-pozicia-ngt>

използването на трансгенни техники и други ГМО технологии от първо поколение, останаха в сила и по отношение на NGT, обстойно описано в проучването на *Poort et al., 2022* (<https://link.springer.com/article/10.1007/s10460-022-10328-z>). Според авторския колектив тези две групи в рамките на Европа набелязват проблеми и решения на тези проблеми с различни термини, информирани от различни ценностни системи, като и двете групи се стремят да повлияят на политиката относно новите геномни техники. **Сами по себе си това са противоположни визии за бъдещето на селското стопанство, околната среда и храните.**

Изложените до момента мотиви, факти и съображения подчертават различията във възприятията за биотехнологичния риск между заинтересованите страни, което затруднява постигането на съгласие относно приемливите нива на риска. Особено безпокойство и разединение сред заинтересованите страни будят патентните права върху семената и използването им, собственост на големи корпорации, което е в разрез със стремежа за демократизиране на биотехнологиите в земеделието чрез използването на NGT. Има опасения, че научната оценка на риска, фокусирана върху човешкото здраве и здравето на животните и околната среда, се разглежда повече на ценностно ниво, а не като такава, която е базирана на експертни знания и включваща решения, които в крайна сметка отразяват ценностите на отговорниците за вземане на решения. Предложено е оценката на риска да включва и социално-икономическа оценка, като по този начин се разшири групата от фактори, считани за съотносими за регулирането на тези технологии, и да се приведе в съответствие управлението на NGT с принципите на отговорното изследване.

От Норвежкия консултативен съвет по биотехнологии е предложено регулирането на новите геномни техники и оценяването на рисковете да включва многостепенна система за оценка за всеки отделен случай на нови приложения на NGT, като тези приложения, които крият по-голям риск да бъдат предмет на консултации със заинтересованите страни в началото на процеса на разработка и резултатите да бъдат върнати на разработчиците преди конкретната разработка да е във финален етап.

В заключение, основната критика към биотехнологичните подходи се коренят в множеството промени в целевия геном, респективно трудността тези промени да се анализират и да се оцени риска, също така основен крайъгълен камък се явяват и доказаните промени в генома извън целта и неизвестните или скрити ефекти на тези геномни редакции извън целта и не на последно място патентните ограничения за употребата на тези технологии.

Друг проблем е опитът за дерегулиране на трансгенните култури и опитът да бъдат възприемани като растителни култури, постигнати с конвенционални техники за селекция/развъждане. Въпреки че селекцията на растителните култури трябва да отговаря на глобални цели като обезпечаване на продоволствената сигурност и борбата с климатичните промени, употребата на новите геномни техники и респективно целевите характеристики в културите, които трябва да бъдат постигнати, не винаги са свързани с обезпечаване на горепосочените глобални цели, а по-скоро задоволяване на интересите на частния сектор. Макар че темповете на развитие на новите технологии и подобрения относителен добив все още са под изискванията за глобалното обезпечаване на продоволствената сигурност на населението през 2050 г., стратегиите за подобряване на растителните култури, ориентирани само към повишаване на добива все още не могат да се считат за оптимални предвид набора от въпроси, които изискват обстоен преглед и

„теста на времето“, за да се стигне до стабилни и изпитани във времето решения на продоволствената несигурност и ниските добиви в условията на постоянно променящия се климат и абиотичния стрес в културите.

Също въпросът за общественото недоверие към тези нови технологии трябва да получи задоволителен отговор, което показва от своя страна необходимост от някаква форма на обществено участие в дебатите и вземането на регулаторни решения относно тези технологии. Слабостите в процесите по консултации и обществени обсъждания на проекторегламентата за новите геномни техники в растениевъдството, всички плюсове и минуси на тези технологии и достъпността на информацията относно тези технологии до широката общественост могат да допринесат за намалено доверие в разработването на политики в областта на биотехнологиите, както и „филтрираните“ мнения на част от заинтересованите страни, като се създава усещането, че част от мненията, изразени от заинтересованите страни са били игнорирани в полза на предварително определена политика спрямо NGT.

Освен това, относно самите техники за гена редакция или модификация, не трябва да се забравя, че са необходими и няколко години оранжерийни и полеви изпитвания, след лабораторните изпитвания, за да се гарантира, че желаната черта е фенотипно изразена и стабилно унаследявана в и през поколенията и че растението се справя със стресовите фактори на околната среда, като постоянно променливи метеорологични условия и атаки от вредители. Вземайки предвид и факта, че патентоването на подобни генно редактирани продукти отнема доста години, става неоспоримо, че не регулаторната рамка и изискванията към генно редактираните продукти са „пърт в колелото“ на биотехнологичното развитие, а факторите, свързани с процеса по разработване на генно редактирани продукти, етапите им на изпитвания – първо в лабораторна контролирана среда, а после на контролирани полета или оранжерии или стопанства, после патентоването им и накрая обширната и многоетапна оценка на риска до пускането им на пазара и консумацията им от хора и най-вече дългосрочните ефекти - желани или нежелани. Немаловажен фактор е финансирането на подобни изпитвания.

Бързината при пускането на пазара на нови генно редактирани продукти и бързата замяна на стандартно разработените продукти е бизнес модел, който е водещ за някои огромни компании за сортови семена и продукти за растителна защита, както и някои животновъдни асоциации, но бизнес моделът на тези корпорации не може да се сравни с този при дребните или средни производства и в този ред на мисли тези технологични решения не са съвсем подходящи за земеделските дребни производители, които добре се справят с породи или растителни култури, адаптирани към местните условия на средата и биха оцелели в дългосрочен план и биха осигурили безопасно, здравословно и достъпно снабдяване с храни. Скоростта не бива да е водещ мотив за безконтролно пускане на пазара на генно редактирани култури или животни и продукти от тях. Редактирането на гени е рисковано и скъпо разсейване от доказани успешни решения за проблемите, свързани с прехраната и селското стопанство. Все още остава мит, че генното редактиране е жизнено необходимо за създаване на животни и растителни култури с подобрени характеристики и получаване на храна, която е по-добра за хората и околната среда, с цел обезпечаване на продоволствената сигурност и борба с климатичните промени. Ако бъдат прилагани доказани във времето съществуващи успешни решения като конвенционално развъждане и

агроекологията, то във времето тази стратегия би дала по-адекватни, контролирани и успешни решения на проблемите в агрохранителната верига от генното инженерство.

Реалистични ли са заявените претенции за ползите от генното инженерство в земеделието? Становища на големите научни центрове и институти по проекта Регламента на ЕК за NGT.

Привърженици на NGT и лобисти от индустрията твърдят, че използването на генно редактиране е от „безпрецедентно значение“ за справяне с изменението на климата и недостига на природни ресурси като обработваема земя и вода. Те казват, че е необходимо да се развиват култури, които са устойчиви на вредители и болести и могат да се адаптират към трудни климатични условия като суша, топлина и соленост. Според Байер редактирането на гени е „фундаментално за постигане на целите на Зелената сделка на ЕС“, която има за цел да се справи както с изменението на климата, така и с влошаването на околната среда и да направи икономиката на ЕС устойчива. Компанията твърди, че ако ЕС не успее да „отмени законодателството“, което блокира разрешаването на генното редактиране, може: „да пропусне една от най-обещаващите иновации в нашия живот, за да даде възможност за по-устойчиви хранителни системи“.

Твърденията, че генното инженерство може да помогне на фермерите да се справят с неблагоприятните условия и да опазят околната среда, не са нови. Както и за новите геномни техники сега, така и преди за трансгенните генетично модифицирани култури от първо поколение беше промотирано, че те ще бъдат адаптирани към сурови климатични условия, като суша и към намаляване на употребата на пестициди. **За съжаление тези обещания се оказаха не съвсем верни.** Относно сушата, трансгенна генетично модифицирана сухоустойчива царевица от Monsanto беше пусната през 2011 г., но Министерството на земеделието на САЩ (USDA) каза, че не е по-ефективно от конвенционално отгледаните сортове. **Твърдението за намалена употреба на пестициди също „не издържа във времето“ и се оказа не напълно вярно.** Устойчивите на хербициди ГМ култури се предлагат от големи корпорации успоредно с хербицидите, предлагани от същите компании. Оказа се след време, че се е увеличило използването на химически средства за борба с плевелите, включително продукти, съдържащи глифозат. Също така произвеждащите инсектициди ГМ култури (така наречените **Vt култури**) бързо загубиха ефективност срещу целевите вредители, станаха жертва на устойчиви на Vt токсини и вторични вредители и сега се използват в комбинация с химически инсектициди. Те включват силно токсични **неоникотиноидни съединения** и обработка на семената, която употреба нарасна успоредно с Vt културите в САЩ.

Твърдението, че „забранителните ГМО регулаторни инструменти на ЕС, които за момента обхващат и NGT, пречат на иновациите за по-устойчива агрохранителна верига“ и аргументите на привържениците на тези технологии, създават **усещането за морален императив, което не оставя възможност за друго мнение или избор в развълнатата дейност, различен от употребата на NGT.** Бъдещата регулаторна рамка за NGT растенията в ЕС от гледна точка на целите за опазване здравето на човека и животните, околната среда и биологичното разнообразие, би следвало да **налага необходимост от провеждането на системно и независимо изследване на потенциалните рискове, свързани със съзнателното освобождаване или пускането на пазара на подобни модифицирани/редактирани продукти,** както и **строго категорично изискване за**

етикетиране и обозначаване на подобни продукти, с цел информиран избор на потребителите.

Становище на ANSES⁴

В подкрепа на горепосочените опасения в проведен анализ относно новите геномни техники и тяхното приложение от Франция и в частност ANSES, е направен подробен преглед на научната литература и експертна оценка, претегляйки плюсовете и минусите на проекта регламента за растенията, получени чрез нови геномни техники, като са направени доста критични заключения за NGT. Целият материал плюс оценка на рисковите фактори може да бъде намерен на следния линк: <https://www.anses.fr/en/content/avis-2023-auto-0189-en> и <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2021SA0019Ra.pdf>

На 6 ноември 2023 г. ANSES се е самосезирала да извърши експертна оценка по следния въпрос: **научен анализ на приложение I към предложението на Европейската комисия за Регламент от 5 юли 2023 г. относно новите геномни техники (NGT) и да направи обстоен преглед на предложените критерии за еквивалентност за определяне на методите за NGT от категория 1.**

Тези нови техники подлежат на правни действия, за да се определи дали продуктите, получени от тях, попадат в обхвата на определението за ГМО и на приложното поле, посочено в Директива 2001/18/ЕО на Европейския парламент и на Съвета от 12 март 2001 г. относно съзнателното освобождаване на генетично модифицирани организми в околната среда и за отмяна на Директива 90/220/ЕИО на Съвета.

Според ANSES **направеното от Комисията предложение за Регламент не може да гарантира безопасността на здравето или околната среда, ако растенията с редактиран геном или продуктите, получени от NGT, се пускат в околната среда или се пускат на пазара на ЕС.** Поради това **предложението в настоящия му вид следва да бъде отхвърлено или подробно преразгледано.**

Още през 2018 г. в решение на Съда на Европейския съюз по дело C-528/16 (решение от 25 юли 2018 г.) се стигна до заключението, че **новите техники на мутагенеза попадат в приложното поле на настоящата директива за ГМО**, като същевременно се **повдигат практически въпроси, свързани с приложимостта.** В проучването на Европейската комисия относно статута на новите геномни техники съгласно правото на Съюза (Решение (ЕС) 2019/1904 на Съвета от 8 ноември 2019 г.), публикувано на 29 април 2021 г., Комисията заключи, че **действащото законодателство на Европейския съюз (ЕС) относно ГМО не е подходящо за някои от тези NGT, които за първи път официално са определени като „техники, които са в състояние да променят генетичния материал на даден организъм и които са се появили или са били разработени от 2001 г. насам“.** По-конкретно се посочва, че **оценката на риска, предвидена в действащото законодателство, понякога не е подходяща или е непропорционална и че изискванията за откриване на редакциите в генома често са неприложими за растения и растителни продукти, получени чрез целенасочена мутагенеза или техники на цисгенеза.** В този контекст на 5 юли 2023 г. Европейската комисия прие **предложение за Регламент, чиято цел беше да даде отговор на въпросите, повдигнати с появата на тези нови техники и натиска от страна на бизнес операторите**

⁴ ANSES – Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail – Национална агенция по здравеопазване, храни, околна среда и безопасност на труда на Франция

да прилагат на практика тези геномни техники. Обхватът на настоящото предложение за Регламент е „ограничен“ до всички видове растения и растителните продукти, получени чрез някои NGT, и не включва други видове организми, като част от исканията включват освобождаване в околната среда за цели, различни от пускането на пазара (полеви изпитвания), и заявления за разрешение за търговия (РТ). *Mora et al. (Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G. and Worm, B., 2011. How many species are there on Earth and in the ocean?. PLoS biology, 9(8), p.e1001127.)* в проучването си посочва, че има около 300 000 вида растения на Земята и ако в проекта Регламента е посочено, че всички растителни видове биха могли да бъдат подложени на генна редакция, съществува почти 100% риск от появата на нови гено- и фенотипове, непознати до момента, което тотално би объркало фината хармония в природата и биоразнообразието. Точно поради тази причина е задължително правилата, определени в проекта Регламента, да имат за цел да дадат яснота и конкретика за видовете растения, които ще бъдат подлагани на генна редакция, типа NGT технология, която ще бъде използвана, като бъдат сравнени със съществуващото законодателство (по-специално Директива 2001/18/ЕО и Регламент (ЕО) № 1829/2003) по отношение на пускането на пазара на растения, продукти или части от продукти, получени от такива растения, за употреба и влагане в храни и/или фуражи. Регламентът трябва да бъде приет съгласно обикновената законодателна процедура, която включва дебати и гласуване в Европейския парламент и Съвета.

Проучването на ANSES е съсредоточено върху преразглеждане на критериите за еквивалентност за определяне на техниките за NGT от категория 1, посочени в приложение I към предложението за Регламент. Тази точка от проекта Регламента се счита за чувствителна, тъй като с нея се узаконява нова категория генетично модифицирани растения, които ще бъдат освободени от изискванията на законодателството на ЕС в областта на ГМО, по същия начин, както растенията, получени от конвенционални техники за кръстосване или случайна мутагенеза съгласно настоящата правна рамка. В този ред на мисли анализа, изготвен от ANSES има за цел да заключи дали някои NGT техники и продуктите от тях са еквивалентни на конвенционалната развъдна дейност и селектиране. Тези критерии, определени в приложение I към предложението за регламент, са анализирани заедно с определението на въпросните NGT, с цел да се отговори на следния ключов въпрос: **До каква степен растенията, определени по този начин, могат действително да се считат за еквивалентни на конвенционалните растения?** Според анализа на ANSES, анализът на критериите за еквивалентност, определени в приложение I към предложението за Регламент, изисква предварителен етап на изясняване на целта на тези критерии чрез определяне на използваните термини и след това на обхвата на сравняваните обекти, въз основа на останалата част от текста на предложението за Регламент и техническия документ на Европейската комисия относно обосновката на използваните критерии, публикуван на 16 октомври 2023 г. В предложението за регламент се посочва, че целта на „критериите за еквивалентност“ е да се определи подгрупа растения, получени чрез NGT, които биха могли да се появят естествено или да са произведени чрез конвенционални техники за развъждане. Следователно целта е в рамките на тези растения да се сравнят генетичните модификации, предизвикани от NGT, с генетичните вариации или модификации, които биха могли да възникнат естествено или да са резултат от конвенционални техники за селекция и развъждане, както и да се определят обективни и научно обосновани критерии, които да гарантират, че NGT растенията, отговарящи на тези критерии, действително биха могли да се появят по естествен път или да бъдат произведени чрез използване на конвенционални техники за развъждане.

NGT са определени в обяснителния меморандум на предложението за Регламент като **„разнообразни техники, които могат да променят генетичния материал на даден организъм и които са се появили или са били разработени от 2001 г. насам, когато е прието законодателството на Съюза относно генетично модифицираните организми (ГМО).**

Терминът „NGT растение“, използван в предложението за Регламент, се отнася до подгрупа от растителни култури, получени чрез тези NGT. В член 3 от предложението за Регламент „NGT растение „се определя като „генетично модифицирано растение, получено чрез целенасочена мутагенеза или цисгенеза, или комбинация от тях, при условие че не съдържа генетичен материал с произход извън генофонда на селекционерите, който временно може да е бил въведен по време на създаването на NGT растението“. Термините „целева мутагенеза,“ и „цисгенеза“ и „генофонд на развъдчиците/селекционерите,“ са определени в член 3 от предложението за Регламент. По този въпрос ANSES изказва мнението, че **определението за „генофонд на селекционерите“ е неясно, което е абсолютно валидно и за термина „генетична информация“, който трябва да бъде прецизиран.** Направена е справка и с други официални документи и становища на ЕОБХ относно цисгенезата (група ГМО на ЕОБХ, 2012 г.), за да се подчертае, че **генетичните ресурси са тези ресурси на разположение на селекционерите за селектиране на растителни култури, а не просто целия генофонд, т.е. набора от кодиращи гени.** С други думи, това изглежда обхваща генетичен материал от всички геноми на растенията, с които въпросното растение може да бъде кръстосано, било то естествено или чрез повече или по-малко напреднали конвенционални техники за размножаване, извън обхвата на Директива 2001/18/ЕО. Поради това предложението за Регламент не включва определени техники за генетична модификация, а се отнася до характеристиките на техните крайни продукти, при които са предизвикани специфични генетични модификации, т.е.: целеви мутации (ограничени до промени в последователността на ДНК на определени места в генома, с изключение на промените в епигенома или РНК); вмъкването на генетичен материал от генетичния фонд на селекционерите. За да бъде анализирана уместността на критериите за еквивалентност, посочени в приложение I на проекта Регламента, е сметено за **необходимо да се определят техниките, които могат да генерират тези генетични модификации, за да може да се вземат предвид всички генетични модификации, които те могат да предизвикат, независимо дали са преднамерени или непреднамерени.**

От Съвместния изследователски център (JRC) на Европейската комисия през 2021 г. (*Broothaerts et al., 2021*) е предложена нова класификация, при която NGT са разделени на четири групи, като е подчертано, че **тяхното прилагане може да доведе едновременно до непреднамерени промени на конкретно нецелево място и извън целта в различни генни локуси и с различни честоти в зависимост от използваната техника** (*Broothaerts et al., 2021*). Също така, в обстойния преглед на научната литература от ANSES са изтъкнати като **негатив на приложението на тези технологии нежеланите ефекти особено що се отнася до CRISPR-Cas от непреднамерени изменения** (малки замествания или индели) **или промени извън целта, но в рамките на целевия ген** (по същество делеции с различни размери),(*Sturme et al., 2022*). **Непреднамерените нецелеви генетични модификации** могат да бъдат предизвикани **поради липса на специфичност към целта в местата с известна степен на хомология.** Същият авторски колектив на *Sturme et al., 2022* е докладвал за **малки индели и нуклеотидни замествания в геномни локуси, хомоложни на целта.** Други нежелани **нецелеви генетични модификации** са докладвани и **на други локации в генома,** а също така са намерени **остатъчни трансгенни елементи на мястото на временно**

въвеждане на ефекторите на целевите модификации и елементи на трансформационни векторни последователности.

Според доклада на ANSES **определението за цисгенеза, дадено в член 3 от предложението за Регламент, също трябва да бъде допълнително изяснено.** В обяснителния меморандум се посочва, че **цисгенезата, разгледана в предложението за Регламент, включва интрагенеза: „Вкарване на генетичен материал (напр. ген) в реципиентен организъм от донор, който е видово съвместим (с реципиентния). Екзогенният генетичен материал може да бъде въведен без (цисгенеза) или с модификации/преподреждания (интрагенеза)“.** **Механизмът на действие не е така описан в определението за цисгенеза, разгледано от ЕОБХ (експертна група по ГМО на ЕОБХ, 2022) и JRC (Broothaerts et al., 2021).** Освен това следва да се отбележи, че както при целенасочената мутагенеза, някои от тези техники може да изискват ефекторите да бъдат въведени в генома като междинна стъпка. Ще бъде необходимо да се гарантира, че те са напълно премахнати след извършване на желаното изменение.

Различните NGT техники са изброени в таблицата в зависимост от техния потенциал и възможните им нежелани ефекти.

”

ANSES Opinion
Request No 2023-AUTO-0189
Related Request No 2021-SA-0019

Summary table of NGTs capable of targeted mutagenesis and cisgenesis, with the genetic modifications that they can induce intentionally and are liable to induce unintentionally.

	Intended genetic modifications ¹ considered in the proposed Regulation						Possible unintended genetic modifications ² (occasionally observed, at various frequencies, in the use of these techniques)			
	Targeted mutagenesis			Cisgenesis			Unintended on-target modifications		Unintended off-target modifications	
	Substitutions of one or a few bases	Small and well-defined insertions/deletions	Large deletions (flanked by 2 targeted nucleotides sites)	Modifications within a gene resulting in a stop-gene	Substitution of a sequence for an endogenous gene	Insertion outside an endogenous gene (flanked or non-flanked)	Substitutions of one or a few bases, small and well-defined insertions/deletions, large deletions	Substitutions of one or a few bases, small and well-defined insertions/deletions, large deletions	Residual elements of targeted modifications, transformation vector elements, markers, etc.	Substitutions of one or a few bases, small and well-defined insertions/deletions, insertion outside
SDN-1	(not predetermined) 1 bp (2-4 bp)	(not predetermined) 1-4 bp (1-100)	Yes	No	No	No	reported	reported	reported	reported
SDN-2	1 bp 2-4 bp -4 bp	1-4 bp -4 bp	No	Yes	No	No	reported	reported	reported	reported
OCM	1 bp 2-4 bp	1-4 bp	No	Yes	No	No	(not analysed) ³	(not analysed)	not applicable (no transposons)	(not analysed)
Base editing	1 bp	No	No	Yes	No	No	not reported ³	reported	not reported	not reported
Prime editing	1 bp 2-4 bp	1-4 bp -100	Yes ⁴	Yes ⁴	Yes ⁴	Yes ⁴ (targeted)	(not analysed)	(not analysed)	(not analysed)	(not analysed)
Site-specific recombination (DSB)	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes (targeted)	(not analysed)	(not analysed)	(not analysed)	(not analysed)
SDN-3	No	No	No	Yes	Yes	Yes (targeted)	potential ³	potential ³	potential ³	potential ³
Transformation by Agrobacterium at a preferential landing site	No	No	No	No	No	Yes ⁵ (targeted)	potential ³	not applicable (a priori no other sequences similar to the target)	potential ³	potential ³
Stable transformation techniques	No	No	No	No	No	Yes ⁵ (not targeted)	not applicable (no target)	not applicable (no target)	potential ³	potential ³

¹ Information primarily taken from the JRC's state-of-the-art review on NGT (Broothaerts et al., 2021). ² Information primarily taken from the systematic literature review on the unintended effects of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas (Sharma et al., 2022). ³ Means that the information, outside the scope of the publications considered, was not analysed by this field or "Non-analysed". ⁴ A modification is reported in the analysis by Sharma et al. (2022). ⁵ According to JRC (2022), 6. 019-040-P006 (2022).
SDN: site-directed nucleases, including zinc finger nucleases (ZFN), meganucleases (MNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and clustered regularly interspaced short palindromic repeats with associated protein (CRISPR/Cas); SDN-1 and SDN-2: specific application conditions for SDN, resulting in point mutations or insertions/deletions of a few nucleotides, without any insertion of exogenous DNA. These targeted mutations can be either not predetermined (SDN-1) or predetermined (SDN-2); SDN-3: specific application conditions for SDN, resulting in the insertion of an exogenous sequence; OCM: oligonucleotide-directed mutagenesis.

“

ANSES подчертава, че въпреки че стандартните техники за трансгенеза не се споменават в определението за NGT растения и техниките, с които се постигат, те все още се използват като междинен етап от повечето приложения на NGT в растенията, за да се даде възможност за експресиране на ефекторите, участващи в целевите модификации (напр. CRISPR-Cas). Инсерциите трябва да бъдат премахнати, след като целевото изменение е извършено по редица причини, по-специално: 1) за да се увеличи

специфичността на техниката, тъй като тяхната продължителна експресия е свързана с повишен риск от нецелевы модификации, 2) за намаляване на рисковете, потенциално свързани с произволното вмъкване на чужд генетичен материал в генома, и 3) защото от регулаторна гледна точка наличието на трансгенни елементи в дадено растение го прави трансгенно растение, подчинено на изискванията на законодателството на ЕС за ГМО. Относно критерия за изключване на чужд генетичен материал от целия геном, посочен в проекта Регламента и самото определение за NGT растения, и поради несигурността на този критерий, ANSES подчертава, че ако този генетичен материал действително е бил вмъкнат „временно“, той вече не следва да присъства в NGT растението. Съгласно чл. 6 от Регламента този критерий е един от елементите, които заявителят трябва да докаже в процедурата за проверка на съответствието на NGT техниките от категория 1 (член 6 от предложението за регламент).

Немаловажен факт, отбелязан в анализа на ANSES е, че в предложението за Регламент не е дадено определение за „конвенционално развъждани растения“. Същевременно в критериите за еквивалентност е посочено: „естествено срещащи се или конвенционално отгледани растения“, което би могло да бъде това, което предложението за регламент има предвид под „конвенционални растения“ в приложение I. Тъй като естествената вариация е основният източник на генетична променливост, използвана при развъждането на растения, ANSES счита, че има смисъл тя да се разглежда заедно с конвенционалните техники за развъждане. Предложението за Регламент обаче също не дава определение на разгледаните конвенционални техники за развъждане. Все пак случайната мутагенеза е една от тези техники, определена в доклада за оценка на въздействието като „обобщен термин, използван за описване на конвенционални техники за размножаване/селекция, основани на мутагенеза, които са били използвани от 50-те години на миналия век; те включват облъчване или третиране с химикали, за да се получат случайни мутации в генома и обикновено включват скрининг на голям брой мутанти, за да се избере такъв с желани свойства“. Анализът на научната литература за естествено срещащи се мутации и мутации, получени чрез конвенционални техники за развъждане и селекция, и предоставен като обосновка на критериите за еквивалентност в приложение I, се основава до голяма степен на мутации, причинени от техники на случайна мутагенеза. ANSES подчертава, че съгласно Директива 2001/18/ЕО (случайната) мутагенеза е техника за генетична модификация, която произвежда модифицирани организми, и като се има предвид, че NGT в настоящото предложение за Регламент се посочват като напълно сравними с „постигнатите с конвенционална селекция растения, е абсолютно необходимо терминологията да бъде прецизно подбрана, ясна и категорична и изрично да бъде пояснено кои техники попадат в обхвата на новите геномни техники и кои в конвенционалните методи за селекция, посочени в проекта Регламента и респективно определенията за тях да бъдат прецизирани.

Количеството генетична вариация, което се поддържа в естествените популации, е резултат от баланса между процесите: мутации и миграции на генетичен материал между различните популации и генетичен дрейф и естествен подбор (*Charlesworth, 2010*). Поради това генетичното разнообразие, присъстващо в избрания вид, е резултат от комбинираното действие на всички изброени процеси. Селекционерите имат частичен достъп до това генетично разнообразие, и макар наличието на все по-голямото разнообразие от биотехнологии, все пак естествените процеси или естествено възникналите промени в генома не могат да бъдат напълно с точност повторени чрез изкуствени методи като NGT, нито пък могат да повторят генетичното разнообразие, постигнато в природата.

Анализът на ANSES на критериите за еквивалентност, предложени в приложение I на проекта Регламента сочи, че:

По критерий „Общи условия“ от проекта Регламента се посочва, че „NGT растение се счита за еквивалентно на конвенционалните растения, когато се различава от реципиента/родителското растение с не повече от 20 генетични модификации.“. Този критерий трябва да бъде строго индивидуален спрямо всеки отделен целеви вид растение и всеки тип генетична модификация трябва да съответства на един от категориите NGT. Също така, по предложение на ANSES, текстът е желателно да се измени така: „Всяко NGT растение, не трябва да се различава с повече от 20 генетични модификации (...) от реципиента/родителското растение, тогава би могло то да се счита за еквивалентно на конвенционалните растения“.

В предложението за Регламент не са посочени подробности по отношение на термина „целеви обект“, което е от критично значение за прилагането на всеки от предложените критерии за еквивалентност. Трябва да се вземат предвид два аспекта: (1) генните локуси, които ще се използват за идентифициране на последователности, които биха могли да бъдат непреднамерено променени поради липсата на специфичност на техниката, и (2) региона, в който ще се търсят генетични модификации на различните видове. Тези два аспекта могат да бъдат конкретизирани в сложна дефиниция: (1) последователност, ограничена около целевия сайт за търсене на прилики между секвенциите и (2) по-дълга последователност, подходяща за търсене на свързани генетични модификации. В тази връзка поради различните NGT техники, които се прилагат, не е ефективно и приложимо да се посочи или определи стандартна дължина на сравняваните последователности, разглеждани във всяко заявление. ANSES препоръчва големината и местоположението на последователността, използвана за търсене на сходство с родителския геном, да се определят въз основа на конкретната използвана техника за гена редакция. Същото се отнася и за целевия геномен locus, който ще бъде редактиран и в който ще се търсят модификации. Целият целеви ген може да бъде разгледан за търсене на нежелани генетични модификации. Това би осигурило начин за откриване на делеции, които могат да възникнат в целевия ген, но и извън обекта, към който е насочена модификацията, както е докладвано в прегледа на *Sturme et al. (2022)*. Но това търсене на сходства между секвенциите важи само за познатите и в целта модификации, а тези, които са нежелани или извън целта надали биха могли изобщо да бъдат установени или открити.

Поради тези изброени причини се препоръчва определението за „целеви обект“ да бъде изяснено и по-конкретно, така че и съответните критерии да са целесъобразни. При липсата на такова определение съществува риск от пропуск или неправилно тълкуване на информацията, предоставено от заявителя в досиетата на NGT растенията.

Целта всяко NGT растение да се различава с не повече от 20 генетични модификации от реципиента/родителското растение като праг на сравняване на NGT растения и конвенционално развъждани растения не е съвсем ясна и ANSES е на мнение, че няма основание да се избере за референтен максимален брой генетични модификации 20. Обяснението за избора на точно толкова нуклеотидни промени – 20 на брой се базира на идентифицираните от 30 до 100 мутации на растение, резултат от произволна мутагенеза. ANSES е на мнение, че това сравнение е неприложимо, като се има предвид, че броят на тези мутации варира в зависимост от интензивността на приложение на мутагенните методи и факта, че след това селекционерите се налага да премахват нежелани мутации чрез генетична сегрегация. Освен това еквивалентността на редактираните растения с конвенционалните и геномната еквивалентност ще зависи и от размера на генома на

конкретен растителен вид и респективно от броя претърпени модификации, техниката за гenna редакция и не на последно място - растителната геномна вариабилност. Геномната редакция в 2 - 20 или 200 нуклеотида няма отношение към обема и вида на постигнатите ефекти и функционални последици, както и към нанесения брой модификации в- и извън целта. Това важи и за геномната еквивалентност – тя не може да бъде „отрязана с нож“ или да бъде строго ограничена до някаква конкретна стойност. Численият праг не винаги е най-подходящият критерий за вземане на решение дали дадена NGT техника е еквивалентна на конвенционалното развъждане и селекция. Също немаловажен факт е, че цифровият подход към генетичните модификации е вероятно да доведе до практически трудности при идентифицирането им, както от страна на заявителя, така и от контролните органи, отговарящи за разглеждането на досието на дадено гено редактирано растение.

ANSES подчертава, че нежелани или „нецелеви“ генетични модификации, предизвикани поради липса на специфичност, в обекти с определена степен на хомология спрямо целта, могат да бъдат отчетени сред 20-те допустими генетични модификации, без да се разглеждат от гледна точка на потенциалните отрицателни ефекти. Анализът за еквивалентност често се основава на прост молекулярен анализ на появата на определени видове генетични модификации, но не разглежда потенциалните рискове. В анализа на ANSES се подчертава, че критериите за еквивалентност, които се фокусират върху максимален брой приемливи генетични модификации в целевите локуси в генома и в подобни последователности, изглежда пренебрегват, а не изключват настъпване на възможни редакции в останалата част от генома. Следователно възниква въпросът толерира ли се каквато и да е модификация извън целта и подобни последователности (освен наличието на трансгенни елементи, изключени от определението за NGT техники)? Например при нецелеви ефекти от цисгенеза/интрагенеза нито един от предложените критерии не би бил приложим. Това важи и за всички нежелани модификации, настъпили извън целта или пък за вмъквания/заличавания, мутации в отделни нуклеотиди и всякакъв вид генни участъци, които биха могли да се появят на мястото на временно въвеждане на NGT ефекторите - те ще бъдат negliжирани без да съществуват конкретни изисквания или пък необходимост да бъдат преброявани или търсени в нецелеви места в целия растителен геном.

В обобщение на казаното, по критерий 1: заместване или вмъкване на не повече от 20 нуклеотида, ANSES е дала следните бележки:

Въпреки че предложеният праг от 20 нуклеотида не надвишава наблюденията, докладвани в научната литература за размера на генетичните модификации в резултат на прилагането на конвенционални техники за размножаване (по-често наблюдавани под 10 нуклеотида, но достигащи до 50 нуклеотида за малки вмъквания), екипът от учени на ANSES подчертава, че **размерът на модификацията сам по себе си не предоставя информация за нейните функционални последици**. Тази максимална граница на заместване/вмъкване от 20 нуклеотида няма биологично значение. **В един екзон, ако броят на модифицираните бази е кратен на 3, това може да модифицира аминокиселинната последователност на кодиращия протеин**, докато при размер на модификацията не кратен на 3, може да се предизвика изместване на рамката на четене и стоп кодона, което може да доведе или до липса на експресия на гена, или до нефункционален протеин. **В промоторната област модификацията може да потисне или измени експресията на ген. В регулаторен ген или транскрипционен фактор, експресията на голям брой гени в един и същ регулаторен път може да бъде също модифицирана и изменена** и т.н. ANSES подчертава, че генетичните модификации, наблюдавани в сортове, получени с помощта на конвенционални техники, са

результат от по-нататъшно размножаване, последвано от прилагане на мутагенни агенти. Всички потенциални нежелани модификации обаче се отстраняват чрез генетична сегрегация в полза на желаните модификации, обикновено чрез фенотипна селекция, а не въз основа на молекулярни модификации. Освен това се посочва, че **размерът от 20 нуклеотида е границата, под която става много малко вероятно конкретна последователност да бъде уникална в генома и да се среща еднократно (Broothaerts et al., 2021).** ANSES препоръчва тази граница да варира в зависимост от размера на генома и че трябва да бъде по-висока за големи и/или полиплоидни геноми. От тази статистическа оценка следва, че последователност, която е по-малка от 20 нуклеотида, има много голяма вероятност вече да присъства естествено в генома. Обаче функционалната природа на тези съществуващи последователности в генома може, в зависимост от тяхното геномно разположение в генома, да бъде различна от тази на идентична последователност, умишлено въведена на различно място за постигане на специфична функционална черта.

Кодиращите последователности представляват само малка част от генома, например при царевицата представляват около 8% от генома (Hufford et al., 2021). Следователно е възможно идентични последователности, съществуващи преди това в генома, да нямат биологична/функционална роля, за разлика от последователност, която е заместена или вмъкната умишлено в дадена мишена или неволно в подобна последователност. Трябва също така да не се пренебрегва факта, че някои мотиви за свързване на транскрипционен фактор и мотиви за инициране на транскрипция, които могат да активират или потискат генната експресия, са с дължина под 20 нуклеотида.

Заклучението е, че няма научна основа за приемане (в смисъл на еквивалентност) на замествания или вмъквания въз основа на техния размер. Освен това, максималният праг от 20 нуклеотида за вмъкване или заместване не е доказано, че е особено подходящ за определяне на еквивалентност с конвенционалните растения.

В обобщение, по **критерий 2:** делеция на произволен брой нуклеотиди, ANSES е внесла следните бележки:

Работната група на ANSES счита, че този безусловен критерий за делециите не изглежда оправдан вземайки предвид и проведени пангеномни анализи. Съществуват големи генетични вариации, но са много по-рядко срещани и са основно транслокации, инверсии или дублиране. Учените са на мнение, че от гледна точка на функционалните последици, заличаването на цял ген би било идентично с вариацията на присъствие-отсъствие на ген, която се наблюдава широко при конвенционално отглежданите сортове. Учените подчертават, че големината на делецията или ограничението в големината/дължината на промяната в генома сама по себе си не би могла да послужи за гаранция за еквивалентност между новоиндуцирани делеции в NGT растения и делеции в растения, получени с помощта на конвенционални техники. И не на последно място трябва да се отбележи факта, че големи делеции, които биха довели до едновременно потискане на голям брой свързани гени, рядко се наблюдават при сортове, получени с помощта на конвенционални техники. Заклучението е, че заличаванията в структурен ген или генна група и функционалните последици от тези делеции трябва да бъдат характеризирани независимо от техния размер и произход (конвенционално развъждане или прилагане на NGT техники).

Критерий 3: при условие, че генетичната редакция не прекъсва ендегенен ген:

- а) целево вмъкване на непрекъснатата ДНК последователност, съществуваща в генофонда на развъдника;
- б) целенасочено заместване на ендегенна ДНК последователност с непрекъснатата ДНК

последователност, съществуваща в генофонда на развъдчика;

Вмъкването на ДНК последователност, насочено извън ендогенен ген без да го нарушава, повдига следния въпрос: Каква е разликата между целево вмъкване в място, което не прекъсва ендогенен ген, без да има допълнителни условия за целевото място, и вмъкване, постигнато чрез нецелеви техники за трансформация, за което впоследствие се установява, че не прекъсва ендогенен ген? Съгласно предложения критерий само първият случай може да бъде освободен от изискванията на законодателството за ГМО в категория 1. Също така някои NGT техники могат да позволят целта на цисгенезата да бъде дефинирана, така че цисгенната последователност да бъде вмъкната на мястото на ортоложния ген или последователност, евентуално замествайки новия алел с оригиналния алел, когато е приложимо, което демонстрира по-ясна еквивалентност с конвенционално растение в което същият алел е въведен чрез интрогресия. **Не са дадени подробности относно потенциална ортоложна връзка между оригиналната последователност и новата последователност.**

Експертният екип от ANSES е на мнение, че **насочването на цисгенната последователност към мястото на ортоложната последователност ще избегне всякакви позиционни ефекти, характерни за стандартните техники за генетична трансформация, свързани с ново място на вмъкване.**

Изключването на интрагенезата от всички посочени в приложение I критерии за еквивалентност, следва да бъде посочено по-ясно в приложението. Изключването на растения, получени чрез интрагенеза, от категория 1 NGT растения е оправдано според анализа на ANSES и това е така, защото пренарежданията между различни последователности от генофонда на селекционера, които са характерни за интрагенните последователности, не могат да се появят естествено или да бъдат получени с помощта на конвенционални техники.

Критерий 4: целева инверсия на последователност от произволен брой нуклеотиди, както при критерий 2 за изтриване, без условия за дължина и размер на промяната, според ANSES е не оправдан предвид и данните от проведени пангеномни анализи в литературата. Освен това ще са необходими подходящи аналитични техники за откриване на този тип редакция.

Според експертите от ANSES, **критерий 5:** всяка друга целенасочена модификация от всякакъв размер, при условие че получените ДНК последователности вече се срещат (евентуално с модификации, приети в точки (1) и/или (2)) във вид от генофонда на селекционера, **не е специфичен, противоречив е, а ограниченията на предходните 4 критерия не са валидни за този случай на редакция.** На практика всяка модификация изглежда е разрешена, стига получената последователност да е цисгенна последователност в целевото място. Същевременно **тази последователност може да варира в рамките на границите, определени в критерии 1 и 2** (всяка делеция и възможни замествания или вмъквания на последователности с дължина под 20 нуклеотида), а **от друга страна изглежда непоследователно да се допускат вариации в тази цисгенна последователност, когато те не са разрешени съгласно критерий 3.** От друга страна, **позволяването на всякакъв вид модификация, стига получената последователност да е цисгенна последователност, е в съответствие с подхода за еквивалентност, фокусиран върху молекулярната природа на получения продукт.** Въпреки това, използваните техники ще останат ограничени до техниките за целенасочена мутагенеза и цисгенеза, определени за NGT растения.

Формулировката на този критерий също не е точна и има нужда да бъде преработена. Експертите от ANSES считат, че **критерий, който либерализира интрагенните растения да бъдат освободени от изискванията на законодателството за ГМО, не би бил оправдан.**

ANSES е на мнение, че няма научна основа за поставяне на еквивалентност на черта или ниво на риск между две категории растения с еквивалентни генетични вариации или модификации, които са определени като такива единствено от техния тип, размер и брой. Експертите от ANSES отново подчертават, че **генетичната променливост и генетичните вариации, наблюдавани в природата, са продукт на хиляди години еволюция, генетичен дрейф и естествен подбор. Генетичните вариации и модификации, наблюдавани в растителните видове, произведени чрез конвенционални селекционерски техники или пък чрез NGT, са подбрани от селекционерите и рядко могат да са същите като естествено придобитите. И в двата случая се премахват генетичните вариации и модификации, свързани с негативни ефекти, като тези вариации и модификации се премахват или избират въз основа не на техния тип, размер или брой, а на тяхното потенциално биологично значение. ANSES отново подчертава, че функционалните или биологичните последици от дадена генетична вариация или модификация не се определят от нейния тип или размер.**

Заклучения на ANSES:

Предложението за регламент относно NGT, прието от Европейската комисия на 5 юли 2023 г., има за цел да освободи определени растения, генетично модифицирани чрез NGT, от законодателството за ГМО на основание, че те са еквивалентни на конвенционалните растения. За целта се предлагат критерии за еквивалентност, които биха гарантирали, че NGT растения, които отговарят на тези критерии (категория 1 NGT растения), биха могли да бъдат произведени и чрез конвенционални техники. Учените от ANSES отново напомнят **ключовия въпрос: До каква степен растенията, получени чрез NGT могат да се считат за еквивалентни на растенията, получени чрез конвенционални техники?**

В търсене на точен отговор на този въпрос, в хода на анализа стана ясно, че **термините и понятията, необходими за разбирането на тези нови геномни техники не са ясни и конкретни и имат нужда от допълнително прецизиране, критериите за еквивалентност не са адекватни спрямо механизмите на действие на конкретните посочени в проекта регламента геномни техники, не може с абсолютна сигурност да се твърди, че новите геномни техники и ефектите от тях са напълно еквивалентни с конвенционалните техники за развъждане, както не може на 100% да се твърди, че няма останали чужди геномни секвенции в редактираните организми след прилагане на описаните в регламента технологии. След анализа на научната литература и респективно критериите за еквивалентност, се повдигнаха редица въпроси, като ANSES в обобщение е набелязала следните точки:**

1) Липса на яснота:

- „Критериите за еквивалентност са всичко друго, но не и ясни, особено защото се използват двусмислени термини („целево място“, „сходство“, „ген“, „генофонд на селекционерите“, „непрекъсната ДНК последователност“);

- Критериите се фокусират единствено върху генетични модификации на „целево място“ и в подобни последователности. „Целевият локус“ и подобни последователности трябва да бъдат дефинирани; тяхната дефиниция ще определи въпросите генетични модификации;

- Изключването на интрагенни растения от категория 1 NGT растения не е изрично посочено в критериите и трябва да бъде изяснено;

- Изключването на растения, получени чрез нецеленасочена цисгенеза, от NGT растения от категория 1 не е изрично посочено в критериите и трябва да бъде изяснено“.

2) Недостатъчна научна обосновка на заявената еквивалентност между отделните

NGT и конвенционалните техники за развъждане:

- „Предложеният максимален брой допустими генетични модификации (20 нуклеотидни двойки) не е достатъчно обоснован;
- Трябва да се вземе предвид възможността или вероятността дадена модификация или комбинация от модификации да бъдат постигнати чрез конвенционални техники;
- Въз основа на пангеномни анализи, приемането на делеции и инверсии, независимо от техния размер, не е научно обосновано;
- Липсата на съображение за непреднамерени генетични модификации, потенциално локализиращи извън целевите места и подобни последователности (с изключение на трансгенни елементи), не е оправдана.“

3) Неотчитане на връзката между предложените критерии за еквивалентност и свързания риск:

- „В документа се посочва, че категориите растения, които са еквивалентни по отношение на вида, размера и броя на генетичните вариации и модификации, ще имат еквивалентни характеристики и нива на риск. Това предположение няма научна основа;
- Предложението за максимален брой приемливи генетични модификации няма научна основа по отношение на риска: свързаният риск не е пряко пропорционален на който и да е брой модификации;
- Предложението за максимално приет размер на вмъкванията и заместванията няма биологичен смисъл; функционалните последици и рискове, потенциално свързани с вмъкване, не са пропорционални на дължината на тяхната нуклеотидна последователност;
- Приемането на каквото и да е заличаване или инверсия без отчитане на функционалните последици и потенциалните свързани рискове не е оправдано;
- Фактът, че неволни генетични модификации, предизвикани поради липса на специфичност в последователности, подобни на целта, са включени в предложения брой генетични модификации, без да се вземат предвид техните възможни отрицателни ефекти, не е оправдан.“

ANSES и други екипи от учени препоръчват тези критерии за еквивалентност, които се основават единствено на молекулярни аспекти и които освен това са недостатъчно обосновани, да вземат предвид характеристиките на растенията и възможните свързани рискове. ANSES е на мнение, че функционалните последици и потенциалните рискове не се вземат предвид в критериите за еквивалентност. Но се подчертава, че това вече е така и в законодателната рамка за ГМО (Директива 2001/18/ЕО). Факт е, че само растенията, получени чрез трансгенеза, изискват досие, демонстриращо контрола или липсата на рискове, а растенията, получени чрез конвенционални техники, включително произволна мутагенеза, са освободени от това изискване, като част от аргумента се крие в конвенционалния характер на техниките и дългата им история на употреба.

Френската агенция ANSES е изготвила и **експертна оценка относно методите за оценка на рисковете, свързани с приложението на NGT и тяхното социално-икономическо въздействие** (<https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2021SA0019Ra.pdf>). Тази експертна оценка се фокусира по-специално върху **идентифицирането на адаптациите, които трябва да бъдат направени в методологията за оценка на рисковете за здравето и околната среда, свързани с редактирани растения, като оценката се отнася до растения, получени чрез сайт-насочена мутагенеза с помощта на CRISPR-Cas9 и свързани техники.**

Становище на Testbiotech⁵ – Институт за независима оценка на въздействието в биотехнологиите

В подкрепа на становището на ANSES, според експертно мнение на Testbiotech Комисията разделя NGT техниките на две категории: такива, които се нуждаят от оценка на риска, и такива, които може да изискват само регистрация. Въпреки това, предложените критерии за разграничаване на тези две категории, т.е. **20 генетични промени, не се основават на науката.** От научна гледна точка е погрешно да се приеме, че рисковете за здравето или околната среда от освобождаване на NGT растенията като цяло са по-ниски в сравнение с трансгенните растения. Следователно и в двата случая (трансгенни растения и NGT растения) **риските за здравето, околната среда и биологичното разнообразие трябва да се оценяват за всеки отделен случай.**

Както беше подчертано от Съда на ЕС, **регулирането на генетично модифицираните организми в ЕС се основава на принципа на предпазливостта**, както е определен в Директива 2001/18/ЕО. Според Комисията този принцип на предпазливостта ще остане заложен в основата на регулирането на NGT растенията, за да се гарантира, че няма да бъдат нанесени значителни вреди. Трябва задължително да се запази изричното изискване за задължителна оценка на риска на NGT технологиите в растениевъдството както и оценка на риска на ефектите в- и извън целта в генома на таргетното растение, и не на последно място ефектите, които могат да бъдат получени от NGT продукти или растения, пуснати в околната среда, включително и оценка на риска от NGT преди да бъдат пуснати свободно на пазара.

В съответствие с принципа на предпазливост всички NGT растения трябва да бъдат подробно изследвани за всеки отделен случай, за да се определи кои планирани или непредвидени генетични промени (генотипове) или биологични характеристики (фенотипове) присъстват в растенията, които е малко вероятно да бъдат постигнати чрез използване на конвенционални методи за размножаване, и което е важно, включително оценка на всички свързани рискове, както понастоящем е предвидено в Директива 2001/18/ЕО.

Дори университета в Тюбинген е на мнение, че: *„Научните екологични познания изискват прилагането на принципа на предпазливостта и оценка на риска за всеки отделен случай.“*



Scientific ecological knowledge must call for the precautionary principle and a case-by case risk assessment

Адаптирането на действащото законодателство, вземайки предвид последните технически развития и по-голямата гъвкавост, не е добра стратегия, като според голяма група учени съществуващото законодателство в областта на ГМО има достатъчна яснота и гъвкавост, за да разглежда и заявленията за освобождаване или пускане на пазара на растения и продукти от NGT.

⁵ Testbiotech e. V., Institut für unabhängige Folgenabschätzung in der Biotechnologie (Institute for Independent Impact Assessment in Biotechnology, Институт за независима оценка на въздействието в биотехнологиите); www.testbiotech.org; Testbiotech е независим институт за оценка на въздействието в областта на генното инженерство. Работата му е строго базирана на научни принципи и оценява наличната информация от гледна точка на защита на здравето, околната среда и природата.

Становище на университета Тюбинген и Асоциацията на еколозите в Германия, Австрия и Швейцария

В подкрепа на казаното, според учени в университета Тюбинген и Асоциацията на еколозите в Германия, Австрия и Швейцария (Ecological Society of Germany, Austria and Switzerland (GFÖ)) „NGT са предполагаем опит за **решаване на проблеми на високо организационно екологично ниво с методи на молекулярно ниво**, но поради сложността на екосистемите и пренебрегването на екологичната наука в предложението, **този опит вероятно ще се провали**“ („NGTs are... an alleged attempt to solve problems at a high organizational ecological level with methods on a molecular level, but due to the complexity of ecosystems, & disregard of ecological science in the proposal, this attempt is likely to fail“) (цялото изказване и материал по темата може да бъде намерено на следния линк: https://gfoe.org/sites/default/files/ngt_gfoe_final.pdf)

В действителност - и както е посочено от Съда на ЕС – **регулирането на NGT технологиите и продуктите от тях са ГМО, както са определени в Директива 2001/18/ЕО**, и съгласно настоящата директива, е **необходимо**, тъй като те **имат сходни рискови профили с трансгенните растения**. Също немаловажен факт е, че **новите NGT не са достатъчно проучени и не са „конвенционално използвани“** и както посочва Съдът на ЕС „**няма дълго досие за безопасност**“ за генетичните модификации или селекции на около 300 000 вида диви растения и освобождаването им в природата...Идеята за еквивалентност на класическата селекция е неприложима към дивите популации... „

No ‘history of safe use’ for genetic modification or breeding of ~300,000 wild plant species and introduction into the wild

‘Equivalence to breeding-idea’ is irrelevant for wild populations

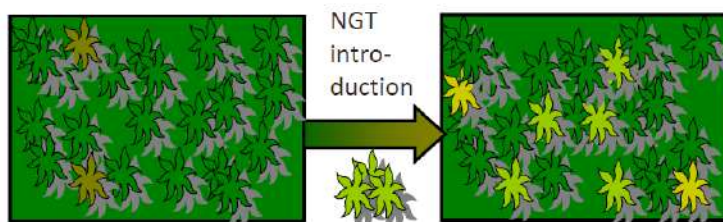
Освен това широк спектър от видове, напр. растителни култури и диви растения, както и черти, напр. повишена годност, драстични модификации във физиологията на растенията или промени във взаимодействието с околната среда, в бъдеще биха могли да бъдат проектирани с NGT с бързи темпове. Поради това би било **наложително да се въведат мерки за контрол и ограничаване на общия мащаб на освобождаванията по отношение на броя на редактирани организми и характеристиките**. Както вече беше обсъдено в други области на опазване на природата, **всяка потенциално нарушаваща намеса в естествената „симбиоза“ в околната среда трябва да бъде ограничена и избегната, доколкото е възможно**. В тази връзка при евентуално освобождаване на генно редактирани растения, учени от Тюбингския университет са достигнали до извода, че има три възможности:

- a) **Aggressive spread** – insights from invasion ecology
- b) **No effect**
- c) **Outbreeding depression: overlooked** (e.g. Montalvo & Ellstrand 2001) „

Изразът „*Outbreeding Depression*“ означава кръстосване на далечни видове или индивиди от различни популации или подвидове. Кръстосването може да предизвика различни видове генетични несъвместимости между гените от различните популации (аутбридинг депресия). Аутбридинг депресията е **намаление на репродуктивната**

способност, намалена способност за чифтосване или опрашване, оплождане, трудност при създаване на потомство, невъзможност за оцеляване или липса на възпроизвеждане на целевата черта в първото или по-късните поколения след кръстосването на популациите. Причини за аутбридинг депресия: хромозомни несъвместимости, адаптивна диференциация между популациите и генетичен дрейф (Montalvo, A.M. and Ellstrand, N.C., 2001. *Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub Lotus scoparius (Fabaceae)*. *American Journal of Botany*, 88(2), pp.258-269).

В продължение на казаното, генетичната цялост на дивите растения трябва да се запази, за да се даде възможност за протичане на естествени еволюционни процеси и да се намали рискът от изчезване на диви видове. Прилагането на NGT при диви растения е в противоречие с международното (CBD) и местното законодателство (напр. в Германия *Gesetz über Naturschutz und Landschaftspflege (Bundesnaturschutzgesetz – BNatSchG § 40 Ausbringen von Pflanzen und Tieren* § 40 Abs. 2 Satz 3) и трябва да бъде предотвратено „генетично замърсяване“ („genetic contamination“): напр. нерегулирани приложения на NGT в дивата природа, които представляват безпрецедентна опасност за дивите популации, общности, екосистеми и биоразнообразието. В светлината на кризата с биоразнообразието приложението на тези геномни техники с лека ръка не е приемливо.

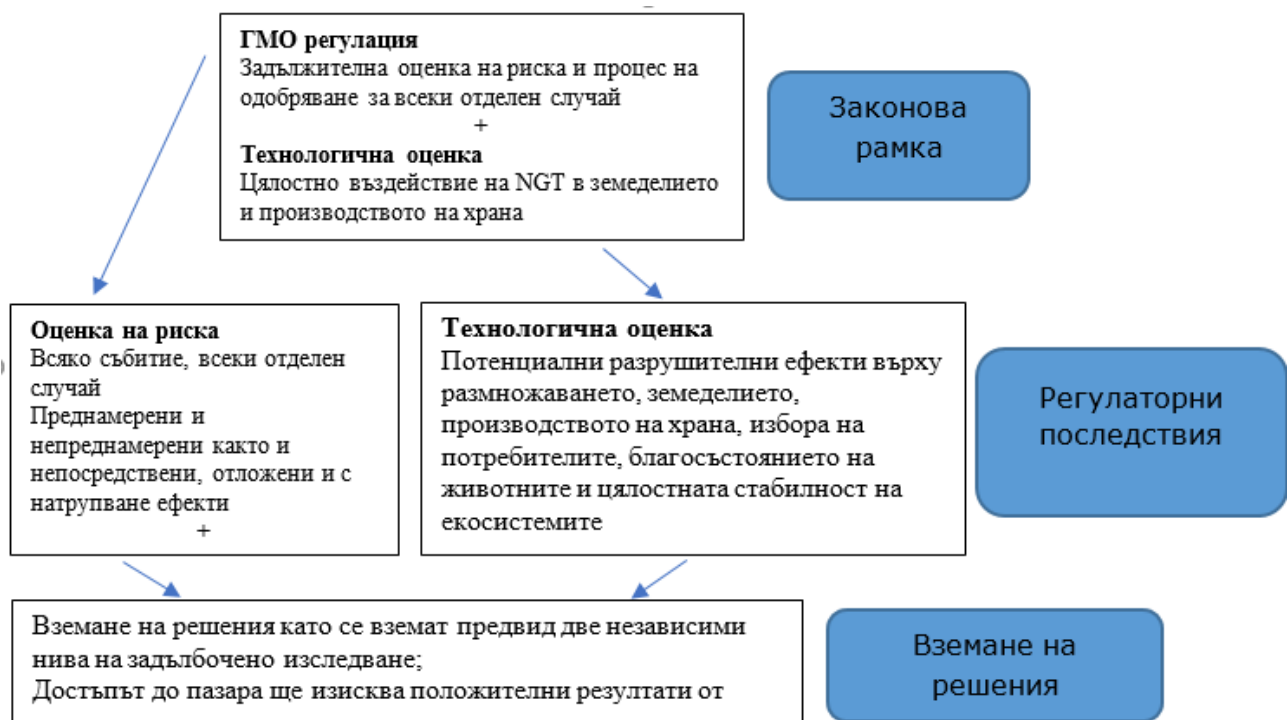


Gesetz über Naturschutz und Landschaftspflege (Bundesnaturschutzgesetz - BNatSchG)
§ 40 Ausbringen von Pflanzen und Tieren

- (1) Das Ausbringen von Pflanzen in der freien Natur, deren Art in dem betreffenden Gebiet in freier Natur nicht oder seit mehr als 100 Jahren nicht mehr vorkommt, sowie von Tieren bedarf der Genehmigung der zuständigen Behörde. Dies gilt nicht für künstlich vermehrte Pflanzen, wenn sie ihren genetischen Ursprung in dem betreffenden Gebiet haben. Die Genehmigung ist zu versagen, wenn eine Gefährdung von Ökosystemen, Biologen oder Arten der Fauna/Flora nicht auszuschließen ist. Von dem Erfordernis einer Genehmigung sind ausgenommen
1. der Anbau von Pflanzen in der Land- und Forstwirtschaft,
 2. der Einsatz von Tieren zum Zweck des biologischen Pflanzenschutzes
 - a) der Arten, die in dem betreffenden Gebiet in freier Natur in den letzten 100 Jahren vorkamen oder vorkamen,
 - b) anderer Arten, sofern der Einsatz einer pflanzenschutzrechtlichen Genehmigung bedarf, bei der die Belange des Artenschutzes berücksichtigt sind.
 3. das Ansiedeln von Tieren, die dem Jagd- oder Fischereirecht unterliegen, sofern die Art in dem betreffenden Gebiet in freier Natur in den letzten 100 Jahren vorkommt oder vorkam,
 4. das Ausbringen von Gehölzen und Saatgut außerhalb ihrer Vorkommensgebiete bis einschließlich 1. März 2009; bis zu diesem Zeitpunkt sollen in der freien Natur Gehölze und Saatgut vorzugsweise nur innerhalb ihrer Vorkommensgebiete ausgebracht werden.
- Artikel 22 der Richtlinie 60/43/EWG sowie die Vorschriften der Verordnung (EU) Nr. 1143/2014 sind zu beachten.
- (2) Genehmigungen nach Absatz 1 werden bei im Inland noch nicht vorkommenden Arten vom Bundesamt für Naturschutz erteilt.
- (3) Die zuständige Behörde kann anordnen, dass ungenehmigt ausgebrachte Tiere und Pflanzen oder sich unabsichtlich in der freien Natur ausbreitende Pflanzen sowie dorthin artfremde Tiere beseitigt werden, soweit es zur Abwehr einer Gefährdung von Ökosystemen, Biotopen oder Arten erforderlich ist.

(https://www.gesetze-im-internet.de/bnatschg_2009/_40.html)

В заключение ако се предприеме пускане на NGT растения с различни характеристики в обща среда, това би наложило установяването на ясни критерии и методики за оценка на потенциалните взаимодействия и кумулативни ефекти, за да се избегне нарушаване на функцията на екосистемите и процесите в организми, които не са се адаптирали чрез еволюционни процеси. NGT организмите, които имат потенциал да се задържат, възпроизвеждат или разпространяват в открита среда, трябва да бъдат оценени с възможно най-голям контрол по отношение на тяхното въздействие върху природата и околната среда. В случай на каквато и да е форма на несигурност, тяхното пускане в околната среда трябва да бъде забранено. Единственият всеобхватен принцип трябва да бъде общото ограничаване на освобождаването на NGT-GMO в околната среда, за да се избегнат потенциални повратни точки, които биха причинили необратими щети на екосистемите.



Що се отнася до безопасността на храните, трябва да се вземе предвид също така, че процесите на NGT могат да причинят непредвидени промени в ДНК и нежелани ефекти в (извън)целеви геномни локуси, които е малко вероятно да се появят в конвенционално развъжданите растения. Без подробен молекулярен анализ и оценка на риска не може да се изключи, че произтичащите от това промени в генните функции и биохимията на редактираното растение могат да окажат въздействие върху здравето на хората или животните на етапа на консумация.

Необходимо е да се стартират научноизследователски програми и да се установят насоки за оценка на технологиите, така че предполагаемите ползи от NGT да могат да бъдат реалистично оценени. Това трябва да включва сравнение с алтернативи с по-нисък риск.

Патентите за NGT семена трябва да бъдат строго ограничени до техническите процеси по постигане на генните редакции, за да се избегне тяхното разширяване в конвенционалното развъждане: много от тези патенти претендират към генетични ресурси и генни варианти, които също са необходими в конвенционалното развъждане. Патентите могат да блокират достъпа до биологично разнообразие по такъв начин, че традиционното развъждане, извършвано от малки или средни развъдни предприятия, да стане невъзможно в бъдеще.

Инструментите за NGT трябва да подлежат на задължително проследяване и етикетирание по целия път до потребителите, за да се даде възможност за намеса и проследяване в случай на увреждане на здравето на хора и животни, околната среда или биологичното разнообразие. Тези „крайъгълни камъни и неизвестности“, следвайки принципа на предпазливостта не трябва да бъдат поставяни под въпрос или negliжирани от новия регламент. Както в изложението бе подчертано, на потребителите, производителите на храни, земеделските стопани и животновъдите следва да се осигури пълна прозрачност по отношение на NGT растенията и тяхното използване на различни етапи от

производството на храни и фуражи. Не бива да се отказваме от горепосочените предимства, предвидени в действащия регламент за ГМО.

Също така дори и в Китай наскоро е излезнало предупреждение за възможните „слепи петна“ и рискове от приложението на CRISPR и подобни биотехнологии, продиктувано от сериозните етични нарушения, които възникнаха след създаване на първите генно редактирани хора в Китай и нерегламентираното приложение на CRISPR редакция на гени при трима пациенти, болни от рак през 2020 г. в САЩ, макар съществуващите разпоредби, според които всеки, който манипулира човешкия геном чрез техники за генно редактиране, подобни на CRISPR, трябва да бъде държан отговорен за всички свързани неблагоприятни последици. (*US Trial Shows 3 Cancer Patients Had Their Genomes Altered Safely by CRISPR* - <https://www.sciencealert.com/researchers-genetically-alter-the-immune-system-of-cancer-patients-without-side-effect>). Тези разработки и реализации на новите геномни техники са меко казано неморални, неетични и противоречат на всякакви норми и законодателство. От тези проучвания и публикации произтича въпросът, щом вече има на практика генно редактирани хора, то може ли наистина да бъде упражняван контрол от страна на отговорните институции, и може ли изобщо да се говори за критерии за еквивалентност при растения или продукти от тях или при генно редактирани животни?

Още през 2021 г. Обединеното кралство е премахнало ограниченията върху генно редактираните растения и животни, преминавайки от регулиране, съответстващо на Европейския съюз, към правила, по-близки до тези на САЩ и някои други страни. Доклад на Европейската комисия от април 2021 г. ясно свидетелства, че настоящият регулаторен режим не е подходящ за регулиране на генното редактиране и техниките за постигането му.

След всички изложени доводи за и против новите геномни техники възникват не малко въпроси, които добре са формулирани от *Testbiotech Institut für unabhängige Folgenabschätzung in der Biotechnologie*, чиито становища служат на Министерството на околната среда, запазване на природните ресурси, ядрена безопасност и безопасността на консуматорите в Германия и VfR:

В превод:

- Какви са основните изисквания за оптимално регулиране на новите процеси на генно инженерство от гледна точка на потребителите, околната среда и благосъстоянието на животните?
- Какви са доказателствата против освобождаването на генно редактирани организми от европейските регламенти за генно инженерство?
- Какви методи има разработени по отношение на откриваемостта на нови процеси на генно инженерство и какво означава това за оценката на риска, одобрението, проследимостта и етикетирването на продуктите, постигнати чрез новите геномни техники?
- Какви са наличните познания за нежеланите ефекти и кои трябва да бъдат взети предвид при оценката на риска?
- Какви доказателства има, че новите процеси на генно инженерство крият специфични рискове?
- Какви причини говорят за необходимостта от оценка на риска за всеки индивидуален случай (индивидуална оценка на риска и одобрение) и при какви условия (доказателства за безопасност) цяла група от процеси на генно инженерство може да се обработва еднакво?

- Как промените могат да бъдат изследвани и оценени не само от гледна точка на предвидените свойства на дадено растение, но и от гледна точка на нежеланите?
- Какви доказателства има, че промените, причинени от новите методи на генно инженерство, се различават от естествено срещащите се мутации?
- Колко надежден е аргументът, че само нови процеси на генно инженерство могат да произведат растения, които са адаптирани към променящия се климат?
- Как трябва да се оцени използването на новото генно инженерство в животновъдството?

Накрая, ANSES в лицето на проф. Беноа Валет прави генералното заключение, че преди „нещо ново“ да бъде пуснато с лека ръка в природата, то трябва да има история на безопасна употреба, да е безопасна храна за хора и животни, и да не нарушава биологичното равновесие в природата. Изводите от всичко казано до момента са, че критериите за еквивалентност, посочени в проекта регламента не са релевантни, понятията не са точни и проект регламента има нужда от сериозни корекции и преразглеждане на текстовете. Препоръчително е да се даде обстоен отговор на множеството възникнали въпроси, преди да се узакони употребата на тези технологии в растениевъдството, като най-съществените е: Наистина ли е толкова неотложна и има ли изобщо реална необходимост да се прибегва до NGT и да се „бърка“ в толкова фина система като генома, „играейки си на Бог“, вместо да се постигнат близки или същите характеристики с конвенционални техники за развъждане?



NGTs may have a potential (in agriculture), but are still in a stage of promises

За потенциалното практическо приложение на NGT трябва също да бъдат зададени и още няколко ключови въпроса:

- Какъв е процентът на успеваемост на предишни опити за контрол на инвазивни видове?
- Има ли геномна информация за целевите видове и за целевите гени?
- Какви са ползите от използването на подход за генно редактиране?
- Какъв е графикът и мащабът за осъществяване на контрол на ефектите от приложението на тези технологии?
- Съществува ли риск NGT растенията да се разпространят сред растенията, които са плод на конвенционално развъждане и селекция и да станат доминантни?
- Дали новите геномни техники ще получат социална, етична и регулаторна приемливост?
- Какви са заинтересованите страни в генетичния биологичен контрол? Ще се разработят ли стандартни оперативни процедури, наръчници и законодателство, определящо безопасността на тези нови геномни техники?

- Има ли едновременно срещащи се местни видове в целевата зона, които могат да бъдат засегнати от хибридизацията?
- Може ли оценката на риска от полеви изпитвания да се извърши въз основа на хипотеза за внедряване?
- Какви са потенциалните рискове за случайно или умишлено освобождаване на генетично редактирани организми в нецелеви популации?

Изготвил:

Красимира Захариева,
Началник отдел ЗРЖ, дирекция ОРХВ
21.03.2024г.

Използвана литература:

- *Становище на ЦОРХВ по предложението на Европейската комисия за Регламент на Европейския Парламент и на Съвета относно растенията, получени чрез някои нови геномни техники (NGT) и произведените от тях храни и фуражи, и изменящ Регламент (ЕС) 2017/625*
- <https://corh.v.government.bg/%D0%95%D0%9A%D0%98%D0%9F-%D0%A6%D0%9E%D0%A0%D0%A5%D0%92:-%D0%A1%D0%A2%D0%90%D0%9D%D0%9E%D0%92%D0%98%D0%A9%D0%95-%D0%BD%D0%B0-%D0%A6%D0%9E%D0%A0%D0%A5%D0%92-%D0%BE%D1%82%D0%BD%D0%BE%D1%81%D0%BD%D0%BE-%D1%80%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%8F%D1%82%D0%B0-%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D1%83%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%B8-%D1%87%D1%80%D0%B5%D0%B7-%D0%BD%D1%8F%D0%BA%D0%BE%D0%B8-%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B8-n-74-2261>
- *Нови разработки в областта на геномните технологии и тяхното значение за опазването на биоразнообразието – за и против мнения на страните членки на ЕС* - <https://corh.v.government.bg/%D0%9A%D1%80%D0%B0%D1%81%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%80%D0%B0-%D0%97%D0%B0%D1%85%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%B5%D0%B2%D0%B0:-%D0%9D%D0%B0%D0%B2%D0%B8-%D1%80%D0%B0%D0%B7%D1%80%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%82%D0%BA%D0%B8-%D0%B2-%D0%BE%D0%B1%D0%BB%D0%B0%D1%81%D1%82%D1%82%D0%B0-%D0%BD%D0%B0-%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D0%BD%D0%B8%D1%82%D0%B5-%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D0%B8-n-27-1723>
- *Настоящи и бъдещи пазарни приложения на нови геномни техники (NGT)* - <https://corh.v.government.bg/%D0%9A%D1%80%D0%B0%D1%81%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%80%D0%B0-%D0%97%D0%B0%D1%85%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%B5%D0%B2%D0%B0:-%D0%9D%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%BE%D1%8F%D1%89%D0%B8-%D0%B8-%D0%B1%D1%8A%D0%B4%D0%B5%D1%89%D0%B8-%D0%BF%D0%B0%D0%B7%D0%B0%D1%80%D0%BD%D0%B8-%D0%BF%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%BE%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%8F-%D0%BD%D0%B0-%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B8-%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D0%BD%D0%B8-n-27-1618>
- *Оценка на риска и критерии за оценка на риска от растения, произведени чрез целеви мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза* - <https://corh.v.government.bg/%D0%9A%D0%A0%D0%90%D0%A1%D0%98%D0%9C%D0%98%D0%A0%D0%90-%D0%97%D0%90%D0%A5%D0%90%D0%A0%D0%98%D0%95%D0%92%D0%90:-%D0%9E%D1%86%D0%B5%D0%BD%D0%BA%D0%B0-%D0%BD%D0%B0-%D1%80%D0%B8%D1%81%D0%BA%D0%B0-%D0%B8-%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%B8-%D0%B7%D0%B0-%D0%BE%D1%86%D0%B5%D0%BD%D0%BA%D0%B0-%D0%BD%D0%B0-%D1%80%D0%B8%D1%81%D0%BA%D0%B0-%D0%BE%D1%82-%D1%80%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%8F-n-30-2029>
- *Wolf TM (April 1998). "Therapeutic repair of mutated nucleic acid sequences". Nature Biotechnology. 16 (4): 341–4. doi:10.1038/nbt0498-341. PMID 9555723. S2CID 9210810.*
- *Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, et al. (2006). "A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences". Nucleic Acids Research. 34 (22): e149. doi:10.1093/nar/gkl720. PMC 1702487. PMID 17130168.*
- *Seligman LM, Chisholm KM, Chevalier BS, Chadsey MS, Edwards ST, Savage JH, Veillet AL (September 2002). "Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease".*

Nucleic Acids Research. 30 (17): 3870–9. doi:10.1093/nar/gkf495. PMC 137417. PMID 12202772.

- Chevalier BS, Kortemme T, Chadsey MS, Baker D, Monnat RJ, Stoddard BL (October 2002). "Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease". *Molecular Cell*. 10 (4): 895–905. doi:10.1016/S1097-2765(02)00690-1. PMID 12419232.
- Arnould S, Chames P, Perez C, Lacroix E, Duclert A, Epinat JC, et al. (January 2006). "Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets". *Journal of Molecular Biology*. 355 (3): 443–58. doi:10.1016/j.jmb.2005.10.065. PMID 16310802.
- *Rationally-designed meganucleases with altered sequence specificity and DNA-binding affinity*, 2006-10-18, retrieved 2018-08-11
- Ashworth J, Taylor GK, Havranek JJ, Quadri SA, Stoddard BL, Baker D (September 2010). "Computational reprogramming of homing endonuclease specificity at multiple adjacent base pairs". *Nucleic Acids Research*. 38 (16): 5601–8. doi:10.1093/nar/gkq283. PMC 2938204. PMID 20435674.
- Redondo P, Prieto J, Muñoz IG, Alibés A, Stricher F, Serrano L, et al. (November 2008). "Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases". *Nature*. 456 (7218): 107–11. Bibcode:2008Natur.456..107R. doi:10.1038/nature07343. PMID 18987743. S2CID 4300643.
- Baker M (January 2012). "Gene-editing nucleases". *Nature Methods*. 9 (1): 23–6. doi:10.1038/nmeth.1807. PMID 22312637. S2CID 37050234.
- Rebar EJ, Huang Y, Hickey R, Nath AK, Meoli D, Nath S, et al. (December 2002). "Induction of angiogenesis in a mouse model using engineered transcription factors". *Nature Medicine*. 8 (12): 1427–32. doi:10.1038/nm1202-795. PMID 12415262. S2CID 23318821.
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (February 1996). "Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 (3): 1156–60. Bibcode:1996PNAS...93.1156K. doi:10.1073/pnas.93.3.1156. PMC 40048. PMID 8577732.
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD (September 2010). "Genome editing with engineered zinc finger nucleases". *Nature Reviews. Genetics*. 11 (9): 636–46. doi:10.1038/nrg2842. PMID 20717154. S2CID 205484701.
- Reik A, et al. (2008). "Zinc finger nucleases targeting the glucocorticoid receptor allow IL-13 zetakine transgenic CTLs to kill glioblastoma cells in vivo in the presence of immunosuppressing glucocorticoids". *Mol. Ther.* 16 (Supplement 1): S13–S14. doi:10.1016/S1525-0016(16)39437-0.
- Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, et al. (August 2010). "Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo". *Nature Biotechnology*. 28 (8): 839–47. doi:10.1038/nbt.1663. PMC 3080757. PMID 20601939.
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF (July 2013). "ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering". *Trends in Biotechnology*. 31 (7): 397–405. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004. PMC 3694601. PMID 23664777.
- Pérez-Quintero AL, Rodríguez-R LM, Dereeper A, López C, Koebnik R, Szurek B, Cunnac S (2013-07-15). "An improved method for TAL effectors DNA-binding sites prediction reveals functional convergence in TAL repertoires of *Xanthomonas oryzae* strains". *PLOS ONE*. 8 (7): e68464. Bibcode:2013PLoSO...868464P. doi:10.1371/journal.pone.0068464. PMC 3711819. PMID 23869221.
- Young S (11 February 2014). "Genome Surgery". *MIT Technology Review*.

- Woolf TM, Chase JM, Stinchcomb DT (August 1995). "Toward the therapeutic editing of mutated RNA sequences". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92 (18): 8298–302. Bibcode:1995PNAS...92.8298W. doi:10.1073/pnas.92.18.8298. PMC 41144. PMID 7545300.
- Woolf TM, Gurumurthy CB, Boyce F, Kmiec EB (April 2017). "To cleave or not to cleave: therapeutic gene editing with and without programmable nucleases". *Nature Reviews. Drug Discovery*. 16 (4): 296. doi:10.1038/nrd.2017.42. PMID 28303022.
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (May 2016). "Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage". *Nature*. 533 (7603): 420–4. Bibcode:2016Natur.533..420K. doi:10.1038/nature17946. PMC 4873371. PMID 27096365.SharedIt
- Cervantes-Gracia K, Gramalla-Schmitz A, Weischedel J, Chahwan R (2021). "APOBECs orchestrate genomic and epigenomic editing across health and disease". *Trends Genet*. 37 (11): 1028–1043. doi:10.1016/j.tig.2021.07.003. ISSN 0168-9525. PMID 34353635. S2CID 236934922.
- Anzalone AV, Gao XD, Podracky CJ, Nelson AT, Koblan LW, Raguram A, Levy JM, Mercer JA, Liu DR. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing. *Nature biotechnology*. 2022 May;40(5):731-40.
- Tang, Y., Zhang, Z., Yang, Z. and Wu, J., 2023. CRISPR/Cas9 and *Agrobacterium tumefaciens* virulence proteins synergistically increase efficiency of precise genome editing via homology directed repair in plants. *Journal of Experimental Botany*, p.erad096.
- Doudna, J.A. and Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), p.1258096.
- Contreras, J.L. and Sherkow, J.S., 2017. CRISPR, surrogate licensing, and scientific discovery. *Science*, 355(6326), pp.698-700.
- Egelie, K.J., Graff, G.D., Strand, S.P. and Johansen, B., 2016. The emerging patent landscape of CRISPR–Cas gene editing technology. *Nature biotechnology*, 34(10), pp.1025-1031.
- <https://data.consilium.europa.eu/doc/document/ST-16443-2023-INIT/en/pdf>
- <https://www.anses.fr/en/system/files/BIOT2023AUTO0189EN.pdf>
- Broothaerts, W., Jacchia, S., Angers, A., Petrillo, M., Querci, M., Savini, C., Van den Eede, G. and Emons, H., 2021. *New genomic techniques: State-of-the-art review*. Publications Office of the European Union.
- Sturme, M.H., van der Berg, J.P., Bouwman, L.M., De Schrijver, A., de Maagd, R.A., Kleter, G.A. and Battaglia-de Wilde, E., 2022. Occurrence and nature of off-target modifications by CRISPR-Cas genome editing in plants. *ACS Agricultural Science & Technology*, 2(2), pp.192-201.
- *New Genetic Engineering - possible unintended effects (208) - MICHAEL ECKERSTORFER / ANDREAS HEISSENBERGER, Umweltbundesamt–Environment Agency Austria*
- *Recommendations for the Assessment of Potential Environmental Effects of Genome-Editing Applications in Plants in the EU - Michael F. Eckerstorfer , Marion Dolezel, Andreas Heissenberger (Umweltbundesamt–Environment Agency Austria (EAA)), Margret Engelhard, Samson Simon, Wolfram Reichenbecher (Federal Agency for Nature Conservation, Division of Assessment of GMOs/Enforcement of Genetic Engineering Act, Germany), Valeria Giovannelli, Matteo Lener, Giovanni Staiano (ISPRA (Italian Institute for Environmental Protection and Research), Italy), Marcin Grabowski (Ministry of Climate and Environment, Poland), Anne Gabrielle Wüst Saucy, Jan Zünd 5 and Christoph Lüthi (Federal Office for the Environment (FOEN), Switzerland;*

- Eckerstorfer, M.F., Grabowski, M., Lener, M., Engelhard, M., Simon, S., Dolezel, M., Heissenberger, A. and Lüthi, C., 2021. Biosafety of genome editing applications in plant breeding: Considerations for a focused case-specific risk assessment in the EU. *BioTech*, 10(3), p.10.
- New genomic techniques (NGTs): agriculture, food production and crucial regulatory issues - Christoph Then, *Testbiotech* - https://www.vzbv.de/sites/default/files/2022-11/vzbv-report_final_final.pdf
- EFSA (2010) Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants: EFSA guidance document on the ERA of GM plants. *EFSA J* 8(11): 1879. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1879>
- EFSA (2014) Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-UK-2009-76) for the placing on the market of soybean MON 87769 genetically modified to contain stearidonic acid, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *EFSA J*, 12(5): 3644. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3644>
- EFSA (2020a) Applicability of the EFSA Opinion on site-directed nucleases type 3 for the safety assessment of plants developed using site-directed nucleases type 1 and 2 and oligonucleotide directed mutagenesis. *EFSA J* 18(11): 6299. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6299>
- EFSA (2020b) Scientific Opinion on the evaluation of existing guidelines for their adequacy for the microbial characterisation and environmental risk assessment of microorganisms obtained through synthetic biology. *EFSA J*, 18(10): 6263. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6263>
- EFSA (2021) Scientific Opinion on the evaluation of existing guidelines for their adequacy for the molecular characterisation and environmental risk assessment of genetically modified plants obtained through synthetic biology. *EFSA J* 19(2): 6301. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6301>
- EFSA (2022a) Draft updated opinion on plants developed through cisgenesis and intragenesis, <https://connect.efsa.europa.eu/RM/s/publicconsultation2/a017U0000011Zb2/pc0176>
- EFSA (2022b) Scientific Opinion on the evaluation of existing guidelines for their adequacy for the food and feed risk assessment of genetically modified plants obtained through synthetic biology. *EFSA J*, 20 (7): 7410. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7410>
- EFSA (2022c) Them (Concept) paper - Application of OMICS and BIOINFORMATICS Approaches: Towards Next Generation Risk Assessment. EFSA supporting publication 2022: e200506. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.e200506>
- EFSA (2022d) Scientific Opinion on the evaluation of existing guidelines for their adequacy for the food and feed risk assessment of microorganisms obtained through synthetic biology. *EFSA J*, 20(8): 7479. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7479>
- EFSA (2022e) Updated scientific opinion on plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal* 2022;20(10):7621, 33 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7621>
- EFSA (2022f) Public consultation on the updated scientific opinion on plants developed through cisgenesis and intragenesis www.efsa.europa.eu/sites/default/files/2022-10/ON-7621_Annex%20B_Outcome%20of%20Public%20consultation.pdf
- EFSA (2022g) Statement on criteria for risk assessment of plants produced by targeted mutagenesis, cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal* 2022;20(10):7618, 12 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7618>
- EU Commission (2021) Study on the status of new genomic techniques under Union law and in light of the Court of Justice ruling in Case C-528/16, Commission staff working document, SWD(2021) 92 final, https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/modern_biotech/new-genomic-techniques_en.

- FAO (2017) *Sustainable Agriculture for Biodiversity – Biodiversity for Sustainable Agriculture*. Rome, <https://www.fao.org/3/I6602E/i6602e.pdf>
- New genetic engineering (NGT): EU Parliament in the maze - <https://www.testbiotech.org/node/3182>
- 10 questions and answers: What do we really know about NGT plants? - <https://www.testbiotech.org/node/3181>
- How to ensure a science-based and up-to-date regulation of NGT plants - <https://www.testbiotech.org/node/3175>
- <https://www.eu-sage.eu/genome-search> - Number of published studies for NGT applications in plants categorised by country / regions
- Patents for plant gene editing - https://patentscope.wipo.int/search/en/result.jsf?_vid=P11-LTMO6O-18802
- <https://crispr-gene-editing-regs-tracker.geneticliteracyproject.org/>
- Montenegro de Wit M. Democratizing CRISPR? Stories, practices, and politics of science and governance on the agricultural gene editing frontier. *Elem Sci Anth*. 2020;8:9.
- Frankham, R. and Ballou, J.D., *Inbreeding and Outbreeding* Katherine Ralls Smithsonian Conservation Biology Institute, National Zoological Park, Washington DC 20008 USA.
- *Most of the traits developed in NGT-plants are new!* - [vzbv-report_final_final.pdf](#)
- Kawall, K., 2019. New possibilities on the horizon: genome editing makes the whole genome accessible for changes. *Frontiers in plant science*, 10, p.447494.
- Kawall, K., Cotter, J. and Then, C., 2020. Broadening the GMO risk assessment in the EU for genome editing technologies in agriculture. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), p.106.
- Kawall, K., 2021. The generic risks and the potential of SDN-1 applications in crop plants. *Plants*, 10(11), p.2259.
- Fortuna G, Foote N. Bayer scientist: “Regulation and risk assessment must evolve with technology.” *EurActiv.com*. Published online December 11, 2019. Accessed January 8, 2021. <https://www.euractiv.com/section/agriculture-food/video/bayer-scientist-regulation-and-risk-assessment-must-evolve-with-technology/>
- European Court of Justice. C-528/16 – Confédération Paysanne and Others: Judgement of the Court. (European Court of Justice 2018). Accessed September 27, 2019. <http://curia.europa.eu/juris/documents.jsf?num=C-528/16>
- European Commission. Explanatory Memorandum to COM(2023)411—Plants Obtained by Certain New Genomic Techniques and Their Food and Feed; European Commission: Brussels, Belgium, 2023.
- EC study on new genomic techniques: https://ec.europa.eu/food/plants/genetically-modified-organisms/new-techniquesbiotechnology/ec-study-new-genomic-techniques_en
- Charlesworth, B., 2010. Molecular population genomics: a short history. *Genetics research*, 92(5-6), pp.397-411.
- Hufford, M.B., Seetharam, A.S., Woodhouse, M.R., Chougule, K.M., Ou, S., Liu, J., Ricci, W.A., Guo, T., Olson, A., Qiu, Y. and Della Coletta, R., 2021. De novo assembly, annotation, and comparative analysis of 26 diverse maize genomes. *Science*, 373(6555), pp.655-662.
- EFSA Panel on Genetically modified organisms (GMO); Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function. *EFSA Journal* 2012;10(10):2943. [31 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2943. Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2943>.
- European Commission, Directorate-General for Research and Innovation, *New techniques in*

- *agricultural biotechnology, Publications Office, 2017,*
<https://data.europa.eu/doi/10.2777/574498>
- https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:a3c806a6-9ab3-11ea-9d2d-01aa75ed71a1.0020.02/DOC_1&format=PDF
- <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/BG/TXT/PDF/?uri=CELEX:52021DC0082>
- *Gene editing and agrifood systems - FAO -* <https://www.fao.org/3/cc3579en/cc3579en.pdf>