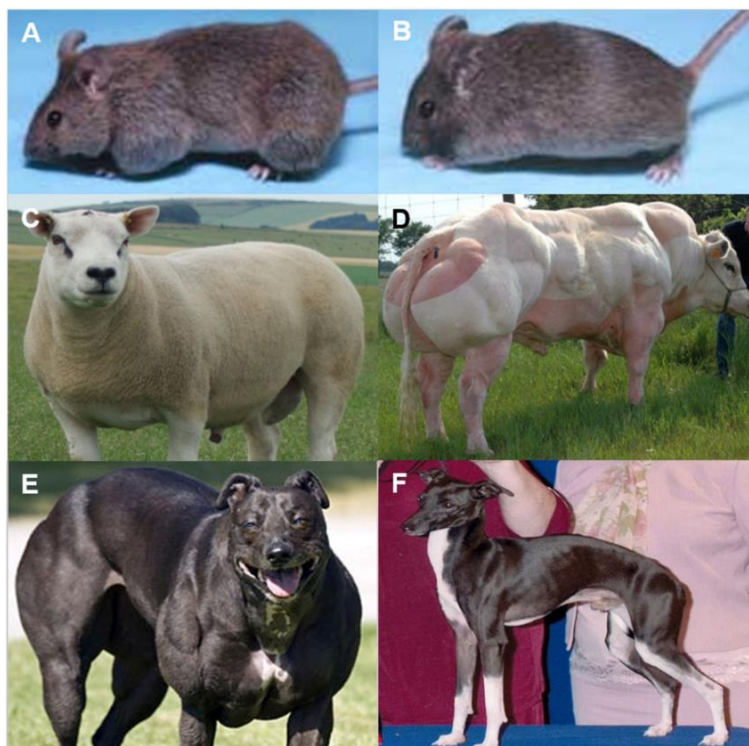




ИНФОРМАЦИЯ за
НАУЧНО СТАНОВИЩЕ Нови разработки в областта на
биотехнологиите, прилагани по отношение на животните: Оценка на
съответствието и пълнотата на настоящите насоки на ЕОБХ за оценка
на риска за животните

Експертна група на ЕОБХ по генетично модифицирани организми (ГМО)



Инактивирането на гена за миостатин причинява хипермускулен (двойно замускулен) фенотип; Източник: Montasir Al Mansi (2018)¹.

Центърът за оценка на риска по хранителната верига (ЦОРХВ) представя на обществеността информация относно новото становище на Европейския орган по безопасност на храните (ЕОБХ), по искане на Европейската комисия (ЕК), за риска, който може да представляват новите геномни техники и тези на синтетичната биология върху животни за храна и фураж.

На 5 юли 2023 г. ЕК стартира законодателно предложение за Регламент относно **растенията**, получени чрез някои нови геномни техники (НГТ/NGT), и произведените от тях храни и фуражи. Становището на ЦОРХВ можете да прочетете тук: <https://s.shopeee.com/MRJG>

¹ Montasir Al Mansi. In vitro study of the structure / function relationship of the proteins GASP-1 and GASP-2 : Involvement of the second Kunitz domain in the functional duality of the GASP proteins. Human health and pathology. Université de Limoges, 2018. English. ffnNT : 2018LIMO0064ff. fftel01980588f;

Две години след НГТ растенията се прави преглед на НГТ животни, които са разработени и стигнали близо до пускане на пазара за храна и фураж и най-вероятно скоро ще последва и законодателно предложение, което да регламентира тази пазарна ниша.

Примери за ГМ/НГТ домашни животни на етапа преди пускането на пазара са:

- **Прасета** резистентни към вируса на репродуктивния и респираторен синдром при свинете (с отстраняване на екзон на гена CD163)
- **Говеда** по-способни да се справят с горещи/влажни условия (с въвеждане на кодон за преждевременно спиране в гена на пролактиновия рецептор),
- **Говеда без рога** (с дублиране на кратък регион на не кодираща последователност, въвеждащ добре характеризирания келтски анкетиран (безрог) алел,
- **Зебу** двойно замускулени (с нокаут на гена MSTN),
- **Пилета** резистентни към инфекция с вируса на левкозата-J по птиците (с единична аминокиселинна промяна в транспортния ген на NEPH),
- **Пъдпъдъци** с 10% увеличаване на скелетната мускулатура (с малка делеция, въведена в миостатиновия ген),
- **Пиле** с резистентност към грип (чрез CAS9/насочващ плазмид и къс олигонуклеотид, трансфектиран в култура от пилешки първични зародишни клетки),
 - **Тилапия** с двойна мускулна маса, по-дебели филета и по-бърз растеж (с нокаут на гена MSTN),
 - **Фагри** (червена ципура) с двойна мускулна маса, по-дебели филета и по-бърз растеж (с нокаут на гена MSTN, генерираща риба),
 - **Лъчеперка** с повишен апетит, който води до по-бърз растеж (с нокаут на четири лептин рецепторни гена),
 - **Японска писия** с повишен апетит, което води до по-бърз растеж (с нарушаване на гена MSTN).

Редактирането на гени при **безгръбначни** за храна, фураж и други селскостопански цели (с изключение на генното задвижване) има ограничено приложение до момента и до момента не са установени случаи на етапа преди пускането на пазара

Според научната литература научните изследвания в областта на редактирането на гени за различни видове насекоми напредват, включително модификацията на видове от значение за селското стопанство:

- Медоносна пчела,
- Копринена пеперуда
- Зелев молец
- Ръждиво-червен брашнен бръмбар

и видове, които могат да се използват за храна и фураж:

- Двупетнист шурец (наричан и „африкански“ или „средиземноморски полеви шурец“,
Черната муха войник.

Други безгръбначни – съществуват изследователски групи, работещи по редактиране на гени при скариди и стриди. Редактирането на гени в тези групи животни все още е в

ранните етапи на научните изследвания и в тези групи безгръбначни не са идентифицирани приложения на етапа преди търговската реализация.

Съдържание

Абстракт	3
1. Въведение и становището накратко	4
2. Определения и понятия	7
<i>Синтетична биология (SynBio)</i>	7
<i>Нови разработки в областта на биотехнологиите, включително синтетична биотехнология и НГТ</i>	7
<i>Клониране</i>	8
<i>Химеризъм и мозаицизъм</i>	8
<i>Традиционно (или класическо) развъждане</i>	8
<i>Установени геномни техники (УГТ)</i>	9
<i>Генетична промяна</i>	9
<i>Редактирането на бази и първичното редактиране</i>	9
<i>SDN (Site-Directed Nuclease)</i>	9
<i>Видове генетични изменения на животно реципиент</i>	10
<i>Редактиране на генома</i>	10
<i>Цисгенеза</i>	10
<i>Интрагенеза</i>	11
<i>Трансгенеза</i>	11
<i>Интеграция на генетични елементи</i>	11
<i>Нови геномни техники (НГТ)</i>	12
<i>Сексуална съвместимост между животинските видове</i>	12
<i>Непреднамерени/нежелани генетични промени</i>	13
3. Редактиране на генома в програмите за животновъдство	13
а) НГТ при отглеждани в стопанства бозайници	14
б) НГТ при отглеждани в стопанства птици	16
в) НГТ в риба, отглеждана в рибовъдни стопанства	17
г) НГТ при безгръбначни	19
4. ОЦЕНКА	20
4.1. Оценка на риска от генно редактирани животни през различните етапи на търговско развитие	20
4.2. Идентифициране на потенциални опасности и рискове от нови продукти	21
4.3. Оценка на риска от ЕОБХ за здравето и благосъстоянието на животните	23
4.4. Оценка на съществуващите документи с насоки на ЕОБХ	26
5. ВСИЧКИ ЗАКЛЮЧЕНИЯ	26
6. Източник	28

Абстракт

Европейската комисия поиска от Европейския орган за безопасност на храните (ЕОБХ) да предостави научно становище относно новите разработки в областта на биотехнологиите, включително новите геномни техники (НГТ) и синтетичната биология (SynBio)², прилагани за животни, предназначени за храна, фураж и други

² Синтетичната биология е нова сфера на биологични изследвания, която съчетава науката и технологията. Тя включва разнообразие от различни подходи и методи от математическата и системна биология, биоинформатика, биомолекулярно инженерство, генетика, геномика, и клетъчна биология.

селскостопански цели. „Сканирането на хоризонта“ установи разнообразие от животни, получени с нови геномни техники, с потенциал да достигнат до пазара на Европейския съюз (ЕС) в краткосрочен, средносрочен и дългосрочен план.

Експертна група на ЕОБХ по ГМО не установява нови опасности, които да са свързани или с процеса на модификация, или с нововъведения признак, когато SDN-1, SDN-2 и сравними техники (напр. базово редактиране или основно редактиране) са сравнени с установени геномни техники (УГТ) или традиционна селекция. Опасностите, породени от SDN-3, са от същото естество като тези, породени от УГТ и целенасоченото въвеждане може да намали потенциалните опасности, свързани с нарушаването на ендогенните гени и/или регулаторните елементи в генома на приемателя. Опасностите, породени от новия признак, произтичащ от въведената трансгенна или интрагенна ДНК секвенция, са от същото естество като тези, породени от УГТ. Експертна група на ЕОБХ по ГМО смята, че опасностите, породени от новия признак, произтичащ от въведената цисгенна ДНК последователност, са от същото естество като тези, породени от традиционното размножаване. Нецелевите мутации от редактирането на генома са сходни по естество с тези от традиционното развъждане и не представляват нови опасности. Следователно, въз основа на наличните понастоящем данни, не са установени нови потенциални опасности и следователно нови рискове за хората, животните или околната среда.

Задълбочената оценка на съществуващите документи с насоки на ЕОБХ за оценка на риска от генетично модифицирани (ГМ) животни показва, че техните принципи и препоръки предоставят основата за оценка на рисковете от животните с нови геномни техники (НГТ) за употреба в храни, фуражи и други селскостопански цели; настоящите текстове обаче обхващат само частично някои области (напр. здравето на животните и благосъстоянието на тях) и може да се нуждаят от актуализации, адаптации или подобрения за всеки отделен случай, за да се преодолеят изцяло рисковете, свързани с НГТ.

1. Въведение и становището накратко

ЕОБХ получи искане от Европейската комисия за изготвяне на-научно становище относно новите развития в областта на биотехнологиите, включително синтетичната биология (SynBio) и новите геномни техники (НГТ), като се има предвид също така, че НГТ могат да се използват за приложения на SynBio, прилагани към животни, които понастоящем се използват за храна, фураж и други видове употреба в селското стопанство или са близо до пазара (наричани по-долу „НГТ животни“), с последици за методологиите за оценка на риска и адекватността на настоящите документи с насоки на ЕОБХ за оценка на риска, обхващащи всички аспекти на молекулярното характеризиране, безопасността на храните и фуражите, здравето на животните и благосъстоянието на тях, както и въздействието върху околната среда.

Обхватът на настоящия мандат е ограничен до употребата в хранително-вкусовата промишленост, като се разглеждат селскостопански животни – бозайници, птици, риба и безгръбначни – отглеждани за получаване на храни, фуражи и други селскостопански продукти, попадащи в обхвата на компетентност на ЕОБХ. Животните, отглеждани само за медицински цели или за приложения, свързани с генно задвижване, не попадат в обхвата на настоящия мандат. Животни, които по определение не са предназначени за храна, фураж и други селскостопански и културни цели, попадат извън обхвата на настоящия мандат. НГТ, прилагани за производството на продукти, получени от клетъчни култури, са извън обхвата на настоящия мандат. ЕК предостави контекста и

разширения мандат за това искане, като поиска окончателното становище да бъде прието до 30 юни 2025 г.

По-специално от ЕОБХ беше поискано да предостави:

1) събиране на знания относно известни случаи на животни и техните хранителни и фуражни продукти, получени чрез нови разработки в областта на биотехнологиите, и

2) становище на ЕОБХ относно потенциалните нови опасности/рискове от нови разработки в областта на биотехнологиите, прилагани към животни, които понастоящем се намират на пазара или са близо до него, и

- да се идентифицират, когато е възможно, потенциалните рискове от гледна точка на въздействието върху хората, животните и околната среда, които биха могли да породят настоящите и бъдещите разработки на SynBio, които понастоящем се намират или са близо до пазара, в сравнение с конвенционалното развъждане или установените техники за генетична модификация; във връзка с това от ЕОБХ беше поискано също така да идентифицира потенциални нови опасности в сравнение с установените техники за генетична модификация.
- да се предостави технически и научен експертен опит относно оценката на риска от ГМО, получена чрез SynBio, за да се подкрепи ЕС в работата по Конвенцията за биологичното разнообразие и Протокола от Картахена по биологична безопасност

3) адекватността на настоящите насоки на ЕОБХ за оценка на риска, обхващащи всички аспекти на молекулярната характеристика, безопасността на храните и фуражите, здравето на животните и благосъстоянието на тях, както и въздействието върху околната среда.

- да се определи дали съществуващите насоки за оценка на риска са приложими и достатъчни за настоящите и бъдещите разработки на SynBio и по кои конкретни области и аспекти съществуващите насоки следва да бъдат актуализирани, адаптирани или допълнени, в случай че съществуващите насоки за оценка на риска се считат за неприложими, частично приложими, неподходящи или недостатъчни.

Мандатът, получен от ЕК (М-2018-0205), е организиран в шест работни пакета (РП) от ЕОБХ, които да бъдат отразени в шест научни становища, обхващащи адекватността на настоящите насоки на ЕОБХ за:

- РП1: ГМ микроорганизми — молекулярно характеризиране и оценка на риска за околната среда
- РП2: ГМ растения — молекулярно характеризиране и оценка на риска за околната среда
- РП3: ГМ микроорганизми — оценка на риска за храните и фуражите
- РП4: ГМ растения — оценка на риска за храните и фуражите
- РП5: ГМ животни — оценка на риска за храните и фуражите
- РП6: ГМ животни — оценка на риска за околната среда

Към момента на публикуване на настоящото становище ЕОБХ е финализирал четири становища (Експертна група на ЕОБХ по ГМО, 2021 г., 2022а; Научен комитет на ЕОБХ, 2020 г., 2022 г.), които обхващат микроорганизми и растения, разработени чрез SynBio за аспектите на околната среда и фуражите за храни [2].

Настоящото становище се отнася до РП5 и РП6 с известна адаптация спрямо първоначалния мандат.

За целите на тази задача докладът на JRC³, картографиращ „Текущи и бъдещи пазарни приложения на НГТ“, беше посочен на ЕОБХ като основа за допълване и актуализиране. Очакваните резултати от тази дейност са:

- идентифициране на животните и техните продукти, получени чрез ново развитие на биотехнологиите, описано от 2001 г. насам, включително техните характеристики и употреба.
- изброяват се използваните техники и модификации, включително обяснение на съответната терминология.
- идентифицират животните и техните продукти, разработени след 2001 г., които подлежат на процедури за разрешаване от международни органи, и съответните налични оценки на риска (напр. становища, насоки, разрешения), които съществуват.
- събира за всеки отделен случай данните и информацията, които са от значение за оценката на риска, и ги структурира в съответствие с насоките на ЕОБХ.

Сканирането на хоризонта информира Експертната група по ГМО за животните, получени чрез НГТ, и потвърди, че няколко от тях са стигнали вече много близо до пускане на пазара.

В някои страни извън ЕС животните, получени чрез НГТ, бяха счетени за „не-ГМО“, ако към породата не е добавена екзогенна ДНК (SDN-1 и SDN-2), което означава, че в някои държави (напр. Аржентина и Бразилия) тези животни ще се считат за еквивалентни на традиционно отглежданите животни (Van Eenennaam, 2023 г.).

Проектите във фазата на изследване и разработване също са докладвани в научната литература, включително бозайници, птици, риби и безгръбначни (напр. насекоми, ракообразни и черупкови организми), които могат да бъдат предназначени за храна, фураж и други селскостопански цели. Наличните знания показват, че най-големият брой животни, получени чрез НГТ, докладван в научната литература, е представен от бозайници, следвани от риби, след това птици и безгръбначни.

По-голямата част от приложенията на НГТ включват генетични промени, постигнати чрез техниките SDN-1, следвани от SDN-3 и SDN-2. Сред различните докладвани НГТ най-често използваните са CRISPR/Cas, следвани от TALENS и ZFN.

Най-често срещаната целева категория характеристики е:

- увеличен добив на месо и фибри, следван от
- репродукция,
- биотичен стрес,
- производство на хипоалергенни продукти,
- комбинации от характеристики,
- цвят, качество на продукта,
- абиотичен стрес и няколко други.

³ JRC – Joint Research Centre – Съвместният изследователски център е службата за наука и знания на Европейската комисия, която наема учени за извършване на изследвания с цел предоставяне на независими научни съвети и подкрепа за политиката на Европейския съюз.

2. Определения и понятия

Предвид липсата на насоки на ЕОБХ относно прилагането на геномни техники при животни за храна, фураж и други селскостопански цели, работната група счита, че е полезно да се определят съответните понятия, които да помогнат на читателя да разбере този документ.

Синтетична биология (SynBio) синтетичната биология (SynBio) – е приложението на науката, технологиите и инженерството за улесняване и ускоряване на проектирането, производството и/или модификацията на генетични материали в живи организми (Научен комитет на ЕОБХ, 2020г.). Възможно е да се създаде нова генетична информация, биологични мрежи (включително пълни геноми) и/или нови биологични функции или чрез комбиниране и/или модифициране на съществуващи естествено срещащи се ДНК модули.

Синтетичната биология е нова сфера на биологични изследвания, която съчетава науката и технологията. Тя обединява идеите и методите на биологията, инженерството и компютърната наука. Включва разнообразие от различни подходи и методи от математическата и системна биология, биоинформатика, биомолекулярно инженерство, генетика, геномика, и клетъчна биология

Синтетичната биология има две основни цели. Някои учени се надяват да изградят нови форми на живот от самото начало от основните им химически компоненти. Други се надяват да произвеждат вещества, които трудно се получават естествено. Изследователите разграждат ДНК на по-малки и по-малки сегменти, за да научат какво прави всеки сегмент. След това се стремят да обединяват нови сегменти от ДНК, за да програмират клетките да се държат по нови начини. Например, през 70-те и 80-те години на XX век учените са разработили бактерия, която може да смила петролни компоненти. Всъщност първият биотехнологичен патент в крайна сметка бе присъден на микроорганизми, които биха могли да помогнат за изчистването на петролните разливи. Оттогава та чак до днес тези разработки продължават да се развиват. През 2010 г. учени от института „J. Craig Venter“ създадоха първата синтетична форма на живот в света. На базата на съществуваща бактерия, едноклетъчният организъм със синтетичен геном е изграден от три химикала в лаборатория.

С такива примери синтетичната биология доказва, че може да създаде важни неща, макар че има доста хора, които са против това хората да се месят толкова много в природата. Въпреки това привържениците на синтетичната биология твърдят, че благодарение на нея могат да бъдат създавани лекарства. Така например учени от Франция твърдят, че с „разместването“ на няколко вещества и смесването на бактерии с вид популярен наркотик могат да го превърнат в лекарство за малария до 3 години!⁴

Нови разработки в областта на биотехнологиите, включително синтетични биотехнологии и НГТ

Новите биотехнологии, прилагани за породи животни, представляват по-широка област от използването само на геномни техники (напр. изкуствено осеменяване, клетъчни култури, трансфер на ембриони, оплождане *in vitro*, трансфер на ядра от соматични клетки); като се има предвид обаче интересът на Европейската комисия да идентифицира евентуални нови генетично модифицирани животни, които биха могли да навлязат на пазара на ЕС в близко бъдеще, както и липсата на разработки върху животни, получени чрез SynBio, и нарастващият интерес към НГТ, прилагани за животни, вниманието на работната група беше съсредоточено главно върху тези най-

⁴ Разяснението е добавено от ЦОРХВ

нови технологии, разработени след публикуването на Директива 2001/18/ЕО⁵. Заслужава да се отбележи, че понастоящем няма данни за прилагане на подходи на SynBio по отношение на животни за храна, фураж и други селскостопански цели на търговски или предтърговски етапи, нито се очаква такова развитие в близко бъдеще, което затруднява прогнозирането на това дали животните, разработени чрез SynBio, или техните продукти, ще достигнат до пазара на ЕС през следващите години. Това се подкрепя от доклади за събиране на знания (Parisi & Rodríguez-Cerezo, 2021 г.; Van Eenennaam, 2023 г.), в които не са посочени примери за животни, разработени чрез SynBio на етапите на търговия, предтърговска дейност или научноизследователска и развойна дейност, и проверени чрез експертни становища от работната група.

Клониране

Клонирането е усъвършенствана техника за развъждане, която може да се използва при традиционното развъждане, както и при производството на животни, получени чрез НГТ и УГТ. Към момента на изготвяне на настоящото становище не е прието законодателство на ЕС, което да се отнася конкретно до клонираните животни и/или храните и фуражите, получени от тях. Не са подадени заявления за такова разрешение и в ЕС не са разрешени за продажба клонирани животински продукти. Следователно тази техника не е включена, когато се отнася до конвенционалното развъждане.

Химеризъм и мозаицизъм

Химерните и мозаечните животни са организми, които имат два или повече типа клетки с различни хромозомни конституции. Химеризмът включва клетки от генетично различни зиготи. Често срещана форма на химеризъм възниква, когато две оплодени яйцеклетки (зиготи) се слепят рано в развитието си в един организъм, който има два набора клетки с различен генетичен материал.

Мозаицизмът включва генетично различни клетки, но от една и съща зигота. Тези клетки възникват от една зигота, поради мутации или грешки по време на клетъчното делене в началото на развитието.

Традиционно (или класическо) развъждане

Преминаване на животни чрез естествено чифтосване или чрез техники за асистирана репродукция (напр. изкуствено осеменяване, свръховулация на женски животни, ембриокултура *in vitro* и трансфер на ембриони/сурогатно майчинство) с желаните характеристики за естествено рекомбиниране на геномите и подбор на потомство с подобрени комбинации от признаци, наследени от двамата родители, което потенциално води до животни с нови фенотипни характеристики. За да се прецизира този процес, може да се приложи геномна селекция, при която еднонуклеотидните полиморфизми в неравновесието на връзката с количествените локуси на чертите се използват за присвояване на развъдни стойности на индивидите въз основа на прогнозираните честоти както на желаните, така и на нежеланите черти.

При някои видове могат да се използват техники за генетична модификация, като например прилагане на физични или химични мутагени или полиплоидна индукция, които са изключени от изискванията на Директива 2001/18/ЕО и по подобен начин могат да се произвеждат животни с нови фенотипни характеристики. За целите на настоящия мандат се използва терминът „традиционно развъждане“.

⁵ Директива 2001/18/ЕО на Европейския парламент и на Съвета от 12 март 2001 година относно съзнателното освобождаване на генетично модифицирани организми в околната среда и за отмяна на Директива 90/220/ЕИО на Съвета (ОВ L 106, 17.4.2001, pp. 1–39); <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/BG/TXT/?uri=celex:32001L0018>

Установени геномни техники (УГТ)

Техники, разработени преди публикуването на Директива 2001/18/ЕО, използвани за преднамерена промяна на генетичния материал на животно по начин, който не може да възникне естествено чрез чифтосване (напр. добавяне на нов екзогенен ген към генома). Използването на УГТ може да доведе до производството на животни с нови фенотипни характеристики. УГТ се състоят в случайно интегриране (чрез ретровируси, транспозони или микроинжектиране на зигота/снесено яйце с ДНК) на ДНК касета(и), кодираща трансген, интраген или цисген, представляващ интерес.

Генетична промяна

Всяка модификация, направена на специфични ДНК последователности в генома на животното, за да се въведат, заличат или променят специфични черти. Това може да включва:

- i) въвеждане на допълнителна генетична секвенция или
- ii) промяна на ендогенна генетична секвенция.

Редактирането на бази и първичното редактиране (Base editing and prime editing) са усъвършенствани технологии за генно редактиране, които предлагат по-прецизни промени в ДНК от стандартния CRISPR-Cas9, като избягват двойноверижни разкъсвания на ДНК (DSBs), често срещан проблем в традиционните CRISPR методи, който може да доведе до нежелани мутации. Редакторите на бази директно преобразуват една ДНК база в друга (напр. А в G), докато първичните редактори са по-гъвкави, позволявайки всички видове промени на единични бази, както и малки вмъквания или делеции, като директно записва нова генетична информация в определен ДНК локус, без да е необходимо да се въвеждат двойни прекъсвания или да се използва ДНК шаблон на донора.⁶

SDN (Site-Directed Nuclease) – класификация на генетичните изменения, произведени от насочени към мястото нуклеази

Насочени към мястото нуклеази са инженерни ензими, проектирани да разпознават специфична последователност и разцепват ДНК, обикновено създавайки двойноверижно разкъсване (double-strand break (DSB)). Определени са три вида подходи за SDN:

- **SDN-1 (целенасочена мутагенеза):** не се предоставя шаблон за последователности, ремонтът на DSB се извършва на случаен принцип, като се въвеждат случайни мутации (замествания, вмъквания, заличавания или инверсии) на целевия(те) обект(и).
- **SDN-2 (целенасочена мутагенеза):** предоставен е шаблон за ремонт, насочен към хомоложност, който води до малки, прецизни промени в целевия(те) обект(и) на SDN.
- **SDN-3 (целово въвеждане на цисгенна, интрагенна или трансгенна последователност):** предоставен е шаблон за въвеждане на големи последователности в целевата(ите) места на SDN.

Разработени са нови подходи, които не произвеждат DSB. В това научно становище експертната група по ГМО счита, че генетичната промяна, получена чрез базово редактиране, и промените, предизвикани от първоначалното редактиране, са сравними с тези, създадени от технологията на SDN.

Различните дефиниции на SDN-2 и SDN-3 се използват от различни източници. Определенията, предоставени по-горе, са в съответствие с тези, предоставени в

⁶ Разяснение, добавено от ЦОРХВ

предишни документи на ЕОБХ относно НГТ в растенията, както и с доклада на Съвместния изследователски център (Broothaerts et al., 2021 г.), с допълнително адаптиране, за да се вземе предвид нововъзникващият характер на областта.

SDN (Site-Directed Nuclease)⁷.

Тези ензими, като цинково-пръстови нуклеази (ZFN), TALEN и CRISPR-Cas9 системи, се насочват към целта си от система за свързване с ДНК. След като се направи двойноверижното разкъсване (DSB), се активират естествените механизми за възстановяване на клетката (NHEJ или HDR), които след това могат да въведат желани промени, като малки делеции, добавяния или вмъквания на нов генетичен материал на мястото на разрязване.

NHEJ – Нехомоложно съединяване на краищата: Това е процес, склонен към грешки, който често води до малки вмъквания или делеции (индели) на мястото на сръзване, което води до инактивиране или модификация на гена. Това се нарича SDN-1.

HDR – Хомоложно насочено възстановяване: Малък ДНК шаблон може да бъде снабден с желаната последователност, за да насочва процеса на възстановяване, позволявайки прецизното вмъкване на нови нуклеотиди или гени на мястото на скъсване. Това е известно като SDN-2, ако се използва къс шаблон, и SDN-3, ако е интегрирана по-дълга ДНК последователност.

SDN са крайъгълен камък на генното редактиране, техника, използвана за въвеждане на целенасочени промени в генетичния код на организма. За разлика от случайната мутагенеза, SDN позволяват по-предсказуема и прецизна модификация на геномите.

Приложения в селското стопанство и медицината: SDN се използват в селекцията на растения за създаване на култури с желани характеристики и в медицината за разработване на нови терапии и лечения чрез модифициране на геноми в растения и животни.

Видове генетични изменения на животно реципиент:

- **Редактиране на генома:** генетична модификация, която предизвиква мутация(и) чрез НГТ в едно или повече избрани целеви местоположения на генома. Мутациите могат да бъдат замествания, вмъквания, заличавания или инверсии (преустройства).
- **Цисгенеза:** е генетична модификация, която включва прехвърлянето на гостоприемника на точно копие на ДНК секвенция, която вече присъства в сперматозоидите или в полово съвместим вид, като се използват различни стратегии за доставяне, например УГТ или SDN-3. Прехвърленият генетичен материал може да замени ендогенна ДНК последователност на гостоприемника в същия геномен контекст, което води до модификация, която може да бъде получена чрез НГТ или чрез традиционна селекция. От друга страна, прехвърленият генетичен материал може да бъде въведен в различен геномен контекст на гостоприемника, което води до модификация, която може да бъде получена от НГТ и УГТ, но която е малко вероятно да възникне при традиционната селекция.

⁷ Разяснението е добавено от ЦОРХВ

- **Интрагенеза:** генетична модификация, състояща се от въвеждането на две или повече ендогенни ДНК последователности (напр. промотор, интрон, терминатор, кодиращи региони), всяка от които може да бъде намерена в член на същия вид или в полово съвместим вид, но в комбинация, която не съществува в природата. По този начин може да се създаде нова комбинация от организатори, регулаторни елементи и последователност на кодиране. Местоположението на въвеждането може да бъде произволно чрез УГТ или целенасочено чрез НГТ.
- **Трансгенеза:** генетична модификация, състояща се от въвеждането на един или повече елементи на ДНК (напр. промотор, интрон, терминатор, кодиращи региони), които не могат да бъдат открити в същия вид, или съвместим по полов път вид. Елементите на ДНК може да са от друг вид или да са синтетични. По този начин може да се създаде нова комбинация от организатори, регулаторни елементи и кодираща последователност. Местоположението на въвеждането може да бъде произволно чрез УГТ или целенасочено чрез НГТ.

Интеграция на генетични елементи

- **Случайна интеграция:** въвежда ДНК елемент [ген или един или повече елементи на ген (напр. промотор, интрон, терминатор, кодиращи региони)] в неуточнено местоположение на генома на гостоприемника чрез УГТ или като непредвидена последица от НГТ.
- **Целенасочена интеграция:** въвежда ДНК елемент [ген или един или повече елементи на ген (напр. промотор, интрон, терминатор, кодиращи региони)] в целево местоположение на генома на гостоприемника чрез НГТ.
- **Безопасни места в генома – на англ. Genomic Safe Harbors (GSH) – Геномно „безопасно пристанище“:** Безопасно място в генома е неутрално геномно място, в което може да се интегрира нов генетичен материал и което гарантира, че вмъкнатите елементи функционират по предвидим начин. Понастоящем няма известен пример за използване на безопасно място при животни, предназначени за храна или фураж. Въпреки това, примери за целенасочена интеграция на ДНК в такива места (напр. locusът Rosa26, широко използван за целенасочена трансгенна експресия) са докладвани предимно при мишки, което показва, че целенасочената интеграция е технически възможна.

Безопасно място в генома (GSH) е специфично място в генома, където може да се вмъкне нов генетичен материал, без да се нарушават нормалните функции на клетката гостоприемник или да се причиняват вредни ефекти, като рак или непредсказуема генна експресия. Тези места гарантират, че вмъкнатият ген или трансген работи по предназначение и че геномът на гостоприемника остава здрав, което ги прави ключови за разработването на по-безопасни и по-ефективни генни терапии и биотехнологични приложения.⁸

- **Множествен брой копия:** брой копия на определен ген или сегменти от ДНК, които присъстват в генома на животно, поради процеси като генна дупликация (повече от едно копие на ген в едно животно) или вариация в броя на копията (различен брой копия на определен ген или сегмент от ДНК между животни от един и същи вид). При животни, отглеждани за храна, фураж и други селскостопански цели, понастоящем няма примери за приложения на NGT, при които броят на копията на ендогенните гени е бил увеличен. Възможно е обаче интегрирането на

⁸ Разяснение, добавено от ЦОРХВ

допълнителни копия на същия ген (същият промотор, ген, терминатор) да представлява интерес.

Нови геномни техники (НГТ)

Техники, разработени след публикуването на Директива 2001/18/ЕО, използвани за целенасочено изменение на генетичния материал на животно. Те включват:

- i) целенасочена мутагенеза (напр. SDN-1 или SDN-2 за индуциране на нуклеотидна модификация, въвеждане, делеция или инверсия) и
- ii) целево въвеждане на ДНК касета, кодираща трансген, интраген или цисген, който представлява интерес. (напр.: SDN-3).

Сексуална съвместимост между животинските видове

- *Полово съвместими животински видове*: Полово съвместимите видове са тези, които могат да се чифтосват по естествен път или чрез асистирана репродукция, като например трансфер на ембриони или оплождане *in vitro*, давайки плодородно потомство.
- *Полово несъвместими животински видове*: сексуално несъвместими видове са тези, които могат да се чифтосват по естествен път или чрез асистирана репродукция, като например трансфер на ембриони или оплождане *in vitro*, като често създават неплодородно потомство. Сексуалната несъвместимост между тясно свързани животински видове обикновено се дължи на различна хромозомна организация и/или брой. Когато размножаването между два такива вида произвежда жизнеспособно потомство, те често са безплодни. Съществуват обаче изключения за животните, използвани в селското стопанство и аквакултурата. Следният неизчерпателен списък е пример за такива кръстосвания:
 - Beefalo – кръстоска между мъжки говеда (*Bos taurus*) и женски американски бизон (*Bison bison*). Женското говедо, получено от такова развъждане, обикновено е плодовито, докато мъжките обикновено не са.
 - Dzomo и Dzo — кръстоска между говеда (*Bos taurus*) и як (*Bos grunniens*), потомството демонстрира хибридна сила. Дзомо (женските) са плодовити, но Дзо (мъжките) са стерилни. Дзомо може да бъде допълнително кръстосан с як или говедо.
 - Муле – кръстоска между женски кон (*Equus caballus*) и мъжко магаре (*Equus asinus*). Тъй като конят има 64 хромозоми, а магарето 62, мулетата обикновено (но не винаги) са безплодни.
 - Риби – някои често използвани семейства риби, отглеждани в рибовъдни стопанства, включително пъстървови риби (*Salmonidae*), тилапия (*Oreochromis*) и шаран (*Cyprinidae*), могат да хибридизират и да произвеждат плодородно потомство (напр. пъстърва, която е хибрид между пъстърва брук (*Salvelinus namaycush*) × езерна пъстърва (*Salvelinus fontinalis*)).
 - Домашните пилета (*Gallus domesticus*) могат да бъдат кръстосвани и да дават плодородно потомство със сребърни фазани (*Lophura nycthemera*), Банкивска кокошка (*Gallus gallus*) и зелена кокошка (*Gallus varius*). Те също така са произвеждали хибриди с обикновен паун (*Pavo cristatus*), Равнинна чачалака (*Ortalis vetula*, *Ortalis ruficauda*), глухар (*Tetrao urogallus*), тетрев (*Tetrao tetrix*, *Lagopus lagopus*, *Canachites canadensis*), пъдпъдък (*Coturnix coturnix*), Голям крак (*Crax rubra*), фазани (*Phasianus colchicus*, *Chrysolophus amherstiae*) и Качулат пурпурноврат гуан (*Penelope purpurascens*).

☐ Amber ☐ Green ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

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

тел. 02/4273056

- Патица мюлар – кръстоска между мускусна патица (*Cairina moschata domestica*) и домашна патица (*Anas platyrhynchos domesticus*). Потомството е стерилно.

Непреднамерени/нежелани генетични промени

Прилагането на НГТ може да предизвика нежелани генетични промени. Те могат да включват непредвидени промени в прицелното място (непредвидени мутации в прицелното място) или промени в генома на място, различно от предвиденото прицелно място (неприцелни мутации).

- *Непреднамерени прицелни мутации (в целта, т.е. в същото място на генома, където се цели желаната промяна):* непредвидена/неочаквана мутация (напр. въвеждания, заличавания, замествания или инверсии), която възниква проксимално спрямо целевата последователност, за която е проектирана НГТ.
- *Мутации извън целта:* Непредвидена мутация, която може да възникне, когато целевата последователност споделя сходство на секвенцията с други региони в генома. Тези мутации се случват на места в генома, отдалечени от планираната цел. Понякога активността извън целта може да доведе до хромозомни промени поради големи вмъквания или заличавания. Тези хромозомни промени също се появяват спонтанно, например по време на мейоза на зародишните клетки, често в резултат на лошо качество на гаметата; независимо дали възникват спонтанно или се въвеждат чрез НГТ, такива вредни отклонения рядко оцеляват до следващото поколение.

3. Редактиране на генома в програмите за животновъдство

Генетичните промени настъпват при индивидите в резултат на естествени процеси, които водят до вариации при селскостопанските животни. Традиционното развъждане разчита на тази генетична вариация в популацията от развъждани животни, което позволява селекция за желани черти.

Скоростта на генетичната печалба зависи от четирите компонента на уравнението на селекционерите – **интензитет, точност, генетично разнообразие и дължина на поколението** – прилагани в систематичен подход, основан на обективно фенотипизиране, геномна информация, статистически методологии и усъвършенствани репродуктивни техники (Bishop & Van Eenennaam, 2020г.).

- *Интензитет (i):* Степента, до която отделните животни в размножителното ядро на върха на пирамидалната структура на размножаване могат да бъдат използвани като родители на следващото поколение.
- *Точност (r):* Колко сигурни сме в истинската генетична стойност на кандидатите за селекция.
- *Генетично разнообразие (σA):* Адитивното генетично стандартно отклонение на популацията.
- *Дължина на поколението (L):* Интервалът, изчислен като средната възраст на родителите при раждане на потомство.

Благодарение на развитието на нови знания и технологии в тази област досега е постигнато значително повишаване на производителността с помощта на традиционното развъждане, но остава фактът, че геномната селекция се ограничава главно до вариациите в рамките на дадена животинска популация или, в някои случаи, до вариации, въведени от тясно свързани видове. В действителност, въпреки че

честотата на спонтанните мутации представлява теоретично безкраен ресурс от генетични вариации в рамките на дадена популация, все пак е важно да се приеме, че появата на желана мутация се основава на случайност и ще се случи без определен времеви мащаб (Whitelaw, 2019г.).

Редактирането на генома е най-важната нова геномна техника (НГТ), разработена от 2001 г. насам. Тази технология улеснява въвеждането на определени генетични варианти в подбрана популация. Това могат да бъдат варианти, достъпът до които е труден, като се използват традиционни схеми за развъждане, напр. от различна порода или сроден вид, или генетичен вариант, който не е бил наблюдаван преди това.

Използването на редактиране на генома има няколко потенциални приложения в традиционните програми за отглеждане на животни, като например:

- i) функционална геномика за изясняване на генната функция и идентифициране на причинните варианти, които са в основата на моногенните⁹ черти;
- ii) въвеждане на целеви генетични вариации, считани за полезни в структурираните програми за животновъдство (напр. възстановяване на генетични дефекти, инактивиране на нежелани гени, движение на алели и хаплотипове между породите при липса на съпротивление на връзката);
- iii) ускоряване на скоростта на генетичната промяна чрез по-широко разпространение на родословието на зародишните клетки на генетично променените родови линии чрез развъждане с търговска цел.

а) НГТ при отглеждани в стопанства бозайници

При отглежданите в стопанства бозайници целта на генетичната модификация чрез НГТ е генетично да се променят единични клетки, които впоследствие ще допринесат за зародишната линия. Понастоящем има три алтернативни начина, по които това може да бъде постигнато, но с напредването на технологията могат да бъдат разработени още. Използваните реагенти обикновено са иРНК (ZFN, TALEN или CRISPR) или протеин + насочваща РНК (CRISPR) +/- ДНК шаблон за ремонт.

- 1) **Пряка манипулация на едноклетъчната зигота.** Достъпът до тази клетка може да се постигне чрез събиране на овоцити, последвано от оплождане *in vitro*, или чрез чифтосване (естествено чифтосване или изкуствено осеменяване) и възстановяване на зиготата от яйцеклетката. Веднъж събрани, геномните редактори обикновено се доставят чрез микроинжектиране или електропорация. Начинът на доставка може да се промени с развитието на технологията. Манипулираните зиготи или се прехвърлят директно в синхронизиран сурогат (при свинете 30-40 зиготи обикновено се прехвърлят в един реципиент), или се култивират *in vitro* в продължение на няколко дни до стадия на бластоциста, в който момент се прехвърлят в синхронизиран сурогат (при овцете обикновено се прехвърлят два до четири бластоциста, докато при говедата това обикновено е един до два). При раждането се събира малка тъканна проба и се оценява генотипът. Докато целта на директната манипулация на зиготите е да се промени генома на единичната клетка (а оттам и на целия организъм, развит от нея), обичайно е да се наблюдават редактиращи събития, които са настъпили по-късно в развитието. Поради това е обичайно животните „основатели“ (F0) да бъдат с мозаицизъм, т.е. те могат да съдържат клетки, които съдържат различни събития от

⁹ вариации в един ген

редактиране. Това се решава чрез размножаване до поколение F1, въпреки че интервалите между поколенията за някои видове правят този подход проблематичен.

- 2) **Манипулиране на първична соматична клетка**, нейното размножаване и характеризиране на манипулираните клетки в култура, след което трансфер на ядрото на соматична клетка в ооцит с отстранено ядро за възстановяване до зигота. Манипулацията обикновено се извършва чрез трансфекция (напр. липофекция или електропорация). Както при подход (1), реконституираните зиготи могат да се прехвърлят директно на реципиентите (при свинете това обикновено включва 100–300 предполагаеми зиготи) или да се култивират *in vitro* до стадия на бластоциста, в който момент те се прехвърлят на синхронизиран реципиент. Поради проблеми, свързани с непълното препрограмиране, обикновено има по-нисък процент на бременност, отколкото при подход (1), с последващи загуби през цялата продължителност на бременността и случайни неонатални здравословни проблеми. Потомството на „основателите“ (F0) може да има и неочаквани фенотипни характеристики. Ползата от този подход обаче е, че потомството на F0 има същата генетика като манипулираната соматична клетка, от която са получени, и не проявява мозаицизъм.
- 3) **Манипулиране на сперматогониална стволова клетка** с последващо присаждане в тестисите на стерил сурогат. Както и при подход (2), това се възползва от способността за размножаване и впоследствие характеризиране на резултата от манипулацията преди присаждането. Това е сравнително нов подход и ще изисква по-нататъшна оптимизация на условията за отглеждане, преди да стане широко използван. Понастоящем е ограничен и до мъжката зародишна линия.

Примери за генно редактирани бозайници на търговски етап са¹⁰:

- **Прасета (*Sus scrofa*)** с отстраняване на екзон на гена CD163, което ги прави резистентни към вируса на репродуктивния и респираторен синдром при свинете (Burkard et al., 2017)
- **Говеда (*Bos taurus*)** с въвеждане на кодон за преждевременно спиране в гена на пролактиновия рецептор, което ги прави по-способни да се справят с горещи/влажни условия (Rodriguez-Villamil et al., 2021)
- **Говеда (*Bos taurus*)** с дублиране на кратък регион на некодираща последователност, въвеждащ добре характеризирания келтски анкетиран (безрог) алел (Carlson et al., 2016)
- **Зебу (*Bos indicus*)** с нокаут на гена¹¹ MSTN¹², увеличаващ мускулната маса – двойно замускулени животни (Proudfoot et al., 2015)

MSTN е генът, който предоставя инструкции за производството на миостатин, протеин, който ограничава мускулния растеж, като инхибира развитието и растежа на мускулите. Той принадлежи към суперсемејството на трансформиращия растежен фактор бета (TGFβ) и е активен предимно в скелетните мускули. Мутациите в гена MSTN могат да доведат до значително увеличаване на мускулната маса и сила, а

¹⁰ (вж. също Van Eenennaam, 2023)

¹¹ Генното изключване („нокаутиране“) е метод от молекулярната биология, използван за изследване на функцията на гените чрез премахване на ген и наблюдение на ефектите от това отстраняване върху клетката или организма.

¹² Миостатиновият ген (MSTN) влияе върху мускулната маса. Активността на този ген (MSTN), която е генетично определена, влияе върху количеството миостатин, произведен в мускулните клетки. Това е регулаторен протеин, който предотвратява „прекомерния“ мускулен растеж чрез намаляване на производството на мускулни протеини в мускулите.

изследванията върху функцията на миостатина крият потенциал за лечение на състояния, водещи до мускулна атрофия, като мускулна дистрофия.¹³

б) НГТ при отглеждани в стопанства птици

Новите геномни техники, прилагани върху птиците, засягат главно определени видове като кокошеви, патици и пъдпъдъци (Van Eenennaam, 2023 г.).

При отглежданите в стопанства птици целта с НГТ е генетично да се модифицират зародишните клетки, които ще образуват сперматозоидите и яйцеклетките на възрастното животно. Потомството наследява генетичната редакция като хетерозиготен алел. Развъждането ще произведе потомство с генетично редактиране на двата хромозомни алела. Генетичната модификация почти винаги се извършва на ембрионални етапи в снесено яйце, тъй като на птичето яйце може да се изреже дупка в черупката, после тя да се запечати и яйцето да се излюпи, и отгледа до полова зрялост. Любимостта се намалява след изрязването на прозорче в черупката.

Използваните реагенти обикновено са плазмиди, аденовирусни вектори, лентивирусни вектори или mRNAs, кодиращи ZFNs, TALENs или CRISPR/Cas геномни редактори +/- ДНК шаблон за ремонт. Използваната векторна система обикновено зависи от етапа и клетките, към които е насочена.

1) Генетично редактиране на *ин витро* култивирани пилешки ембрионални зародишни клетки

Ембрионалните зародишни клетки се отстраняват от оплодената яйцеклетка и се култивират *in vitro* за период от няколко седмици до няколко месеца. През това време геномните редактори се въвеждат в зародишните клетки. Най-често се използват ДНК или РНК вектори, обикновено експресиращи CRISPR/Cas9 модули.

Редактираните зародишни клетки могат да бъдат анализирани и клонално намножени¹⁴ и отглеждани. Редактираните зародишни клетки се инжектират в яйцеклетка гостоприемник, която се излюпва и отглежда до полова зрялост. Сурогатното пиле-гостоприемник се чифтосва по естествен път или с помощта на изкуствена инсеминация и редактирането на генома се наследява от някои от потомството. Сурогатното пиле гостоприемник може да бъде генетично или химически модифицирано, за да стане стерилно, например чрез въведен трансген.

2) Генетично редактиране на ембрионални зародишни клетки, култивирани *in vitro*, с последващо присаждане в тестисите на стерилен сурогат.

Този подход се възползва от способността за клонално намножаване и впоследствие характеризиране на резултата от редактирането на генома преди присаждането. В този случай редактираните зародишни клетки се инжектират в тестисите на възрастен стерилен сурогатен гостоприемник. Сурогатните петли може да са били третирани чрез облъчване с химиотерапевтични средства, за да се убие местната популация от дялящи се клетки в гонадите преди присаждането. Някои от потомството ще наследят генетичната промяна.

¹³ Пояснение, добавено от ЦОРХВ

¹⁴ Клетки, „отгледани клонално“ означава популация от клетки, които произхождат от една родителска клетка и следователно са генетично идентични. Този клонален растеж се осъществява чрез безполово размножаване, обикновено чрез митотично клетъчно делене, което води до образуване на дъщерни клетки, които са точни генетични копия една на друга и на оригиналната клетка.

3) Директна модификация на ембрионалните зародишни клетки в пилешкия ембрион.

Инструментите за редактиране на генома, базирани на ДНК, се инжектират директно в съдовата система на ембриона в оплодената яйцеклетка. Инжектираното яйце се излюпва и отглежда до полова зрялост. Пилето се чифтосва, като се използват стандартни животновъдни практики, а редактирането на генома се наследява от някои от потомството. Някои от потомството, обикновено ~1% от пилетата, ще наследят генетична промяна (обикновено вмъкване (insertion) или изтриване (deletion) на малък регион с генетична информация – indel) в целевия генетичен локус на зародишната клетка. Малко соматични клетки на инжектираното пиле ще бъдат модифицирани.

4) Директно инжектиране на аденовирус в снесено яйце.

В снесеното пилешко яйце се инжектират аденовирус-съдържащи експресивни касети за инструментите за редактиране на генома. Един процент от соматичните клетки и зародишните клетки на инжектирания ембрион ще съдържат генетични промени в целевия генетичен локус. ДНК векторите могат да се използват и за трансфектиране на соматичните и зародишните клетки в ембрионалните стадии. Инжектираното яйце се излюпва, отглежда се до полова зрялост и се развъжда. Някои от потомството, обикновено ~1% от пилетата, ще наследят индел в целевия генетичен локус на зародишната клетка. Соматичните клетки на това пиле също ще бъдат модифицирани с различен брой индели.

Примери за генетично модифицирани домашни птици на етапа преди пускането на пазара са (вж. също Van Eenennaam, 2023):

- **Пилета** (*Gallus gallus*) с единична аминокиселинна промяна в транспортния ген на NEPN, което ги прави резистентни към инфекция с вируса на левкозата-J по птиците (Koslova et al., 2020)
- **Пъдпъдъци** (*Coturnix japonica*) с малка делеция, въведена в миостатиновия ген, което води до увеличаване на скелетната мускулатура с 10% (Lee et al., 2020)
- **Пилета** (*Gallus gallus*) с резистентност към грип, получена чрез CAS9/насочващ плазмид и къс олигонуклеотид, трансфектиран в култура от пилешки първични зародишни клетки (Idoko-Akoh et al., 2023)

в) НГТ в риба, отглеждана в рибовъдни стопанства

Рибите имат различна репродуктивна стратегия от птиците и бозайниците. Отличителното, при повечето видове риби е, че както оплождането, така и ембрионалното развитие се случват извън тялото на майката (*oviparous*). Освен това рибите обикновено притежават висок капацитет за репродукция, което им позволява значително да увеличават размера на популацията от поколение на поколение. Рибите също имат геномни характеристики, които се различават от птиците и бозайниците, тъй като в еволюционната история на рибите е имало дублиране на целия геном¹⁵. Поради това някои видове риби могат да имат до няколко паралога (т.е. генни копия в генома) на всеки ген, докато други гени идват в едно копие поради редиплоидизация¹⁶. Това е от

¹⁵ Този процес включва пълно дублиране на ДНК на организма, което води до четири комплекта хромозоми вместо обичайните два. Дублирането на целия геном предлага съществено еволюционно предимство, позволявайки на гените да поемат нови роли, което потенциално води до появата на уникални черти и адаптации.

¹⁶ Редиплоидизацията е процесът при полиплоидните растения/организми, при който геномът преминава от тетраплоидно (четири комплекта хромозоми) или полиплоидно състояние в диплоидно състояние,

значение при редактиране при видове риби, тъй като при оценката на генната функция трябва да се вземат предвид и другите генни копия, различни от целевите. Дублираните гени могат да се различават, за да изпълняват различни функции, да проявяват адитивна функция¹⁷, когато и двете копия допринасят за една функция, или да претърпят загуба на функция, когато един от дублираните гени стане нефункционален.

Използваните реагенти обикновено са mRNAs, кодиращи CRISPR/Cas геномни редактори, ZFNs, TALENs. Вместо това могат да се инжектират Cas протеини или съответната иРНК. За някои приложения може да се използва ДНК шаблон, който да насочва промяната към желаното.

1) Редактиране на гени в рибни ембриони

При повечето видове риби яйцата се оплождат и развиват извън майката, което значително опростява процеса на редактиране на гени в сравнение с бозайниците. Манипулацията включва директно инжектиране на реактиви, като CRISPR-Cas9 компоненти (gRNA и иРНК, кодиращи Cas9 протеин или Cas9 протеин), в цитоплазмата или ядрото на ембриона на етапа от една до четири клетки. Това обикновено води до създаването на мозаицизъм при първо поколение генно редактирана риба (F0) с различни мутации на прицелното място, включително потенциални неприцелни мутации и хромозомни делеции. Тъй като рибите могат да имат няколко подобни генни копия в своя геном, множество гени с потенциално сходни функции често трябва да бъдат насочени и оценени при рибите. Разплодникът F0 може да се кръстосва с дива риба (wt) или друга F0, за да се получи второ поколение (F1). В поколението F1 индивидите ще носят само два алела, един от майката и един от бащата.

2) Генетично редактиране на ембрионални зародишни клетки, култивирани *in vitro*, с последващо инжектиране в стерилни рибни ембриони (surrogates) или в стерилни гонади на възрастни риби

Сурогатното майчинство при отглеждана в рибовъдни стопанства риба е техника, при която зародишните клетки се трансплантират в стерилен гостоприемник (напр. в гонади, перитонеална кухина, кръвоносна система, интрамускулно) от друга риба (в рамките на видовете или между видовете), включително редактираните зародишни клетки. В рамките на гостоприемника тези зародишни клетки ще узреят и в крайна сметка ще произвеждат сперматозоиди или овоцити. Този метод се използва при отглеждана в рибовъдни стопанства риба за различни цели, включително производството на еднородни популации за научноизследователска или търговска употреба. Приложенията на сурогатното майчинство при отглеждана в рибовъдни стопанства риба са многобройни: Сурогатното майчинство позволява прилагането на редактиране, за да се въведат черти, считани за желателни в ембрионите, като се гарантира преминаването на тези черти към следващото поколение, като по този начин се спомага за поддържането на специфични генетични линии. Това също така може да помогне за заобикаляне на мозаицизма, което води до потомство с по-последователни

възстановявайки модел на диплоидно мейотично удвояване след дубликация на целия геном (WGD). Този процес намалява генетичната излишък, като позволява на дублираните гени (онологите) да се разминават и потенциално да придобият нови функции. Това е ключова стъпка за дългосрочната еволюция на полиплоидните организми, създавайки диплоидни потомци с намален генетичен товар и по-висок потенциал за адаптация.

¹⁷ Адитивно действие на гените – Общо действие на всички гени, което е равно на сумата от ефектите на всеки ген. Адитивното действие на гените обуславя корелацията между родствениите животни и ефективността на племенния отбор при масовата селекция. При случай на адитивно действие на гените се изключват фактите на вътре- и междудокусни взаимодействия на гените (ефекти на доминиране и епистаза). Адитивното действие на гените се използва при чистопородното развъждане на животните. При междупородните и междудулиейните кръстоски, то не дава голям ефект. (д-р Деница Русева)

☐ Amber ☐ Green ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

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

тел. 02/4273056

генетични модификации. Сурогатното майчинство ускорява селективните развъдни програми, като позволява ембриони с високи генетични качества (включително тези, променени от НГТ), които се пренасят от сурогатни риби с по-добри репродуктивни способности или процент на оцеляване. Освен това тази техника може да се използва за целите на съхранението, като позволява съхранението и размножаването на ценен генетичен материал при поискване в стерилен гостоприемник. Освен това технологията за сурогатно майчинство често води до различни генетични различия между гостоприемника и имплантираните зародишни клетки, което може да улесни широкомащабното производство на стерилно потомство. Този подход се оказва ефективен при моделния вид Японска оризова риба (Japanese rice fish).

Примери за генно редактирана риба на (пред)търговски етап са¹⁸:

- **Тилапия** (*Oreochromis niloticus*) с нокаут на гена MSTN, генерираща риба с двойна мускулна маса, по-дебели филета и по-бърз растеж (Wu et al., 2023)
- **Фагри** (червена ципура) (*Pagrus major*) с нокаут на гена MSTN, генерираща риба с двойна мускулна маса, по-дебели филета и по-бърз растеж (Kishimoto et al., 2018)
- **Лъчеперка** (*Takifugu rubripes*) с нокаут на четири лептин рецепторни гена, генерираща риба с повишен апетит, който води до по-бърз растеж (Kishimoto et al., 2019)
- **Японска писия** (*Paralichthys olivaceus*) с нарушаване на гена MSTN, генерираща риба с повишен апетит, което води до по-бърз растеж (Kim et al., 2024)

г) НГТ при безгръбначни

Редактирането на гени при безгръбначни за храна, фураж и други селскостопански цели (с изключение на генното задвижване) има ограничено приложение до момента и до момента не са установени случаи на етапа преди пускането на пазара (напр. Van Eenennaam, 2023). Този подход обаче може да се превърне в значима област в бъдеще.

Насекоми

Съществуващите методи за редактиране на гени на насекоми обикновено включват микроинжектиране на РНК или РНК и протеин в ранните ембриони. Този подход обаче значително ограничава потенциала за редактиране на гени при много видове насекоми, особено тези с репродуктивни системи, които възпрепятстват достъпа до ранни ембриони за инжектиране. Наскоро беше показано, че инжектирането на CRISPR/Cas9 рибонуклеопротеини (RNPs) в хемоколите на възрастни женски от германската хлебарка (*Blattella germanica*) ефективно въвежда наследствени мутации в развитието на овоцити (Shirai et al., 2022). Тази техника, известна като „директен родителски“ CRISPR (DIPA-CRISPR), може да използва леснодостъпен стандартен Cas9 протеин, така че този метод може да се окаже много практичен и постижим за много видове (Van Eenennaam, 2023).

Според научната литература научните изследвания в областта на редактирането на гени за различни видове насекоми напредват, включително модификацията на видове от значение за селското стопанство:

- 3) Медоносна пчела, (*Apis mellifera*)
- 4) Копринена пеперуда (*Bombyx mori*)
- 5) Зелев молец (*Plutella xylostella*)

¹⁸ (вж. също Van Eenennaam, 2023)

- 6) Ръждиво-червен брашнен бръмбар (*Tribolium castaneum*)

и видове, които могат да се използват за храна и фураж:

- 7) Двупетнист щурец (наричан и „африкански“ или „средиземноморски полев щурец“, (*Gryllus bimaculatus*),
8) Черната муха войник (*Hermetia illucens*) (прегледано в Sun et al., 2017; Nie et al., 2021; Kou et al., 2024; Sui et al., 2024).

Други безгръбначни

Съществуват изследователски групи, работещи по редактиране на гени при скариди (Gui et al., 2016; Song et al., 2024; Sun et al., 2017; Zhang et al., 2018) и стриди (Yu et al., 2019). Редактирането на гени в тези групи животни все още е в ранните етапи на научните изследвания и в тези групи безгръбначни не са идентифицирани приложения на етапа преди търговската реализация.

4. ОЦЕНКА

4.1. Оценка на риска от генно редактирани животни през различните етапи на търговско развитие

Както е описано в раздел 1.3.2, процесът на развъждане на НГТ животни, носещи предвидените генетични модификации, включва няколко етапа и поколения животни, за да се получи крайното НГТ животно, което е предназначено за пускане на пазара за храна, фураж или за пускане в околната среда. Тези стъпки са подобни на необходимите за производството на крайните УГТ животни и обхващат както *ex vivo*, така и *in vivo* фази. *Ex vivo* фазата включва избор и използване на първични материали (напр. ооцити, яйцеклетки, соматични клетки) за генно редактиране. Фазата *in vivo* включва различен брой стъпки (в зависимост от специфичния белег, вида на животните и използваната технология), както е опростено показано на Фигура 1.

Мандатът на EFSA за това становище се фокусира върху проучване на нови потенциални опасности и рискове, които НГТ, прилагани върху животни, биха могли да представляват за хората, животните и околната среда в сравнение с конвенционалното развъждане или установените техники за генетична модификация (УГТ), и върху оценката на приложимостта и достатъчността на съществуващите насоки на ЕОБХ за оценка на риска, обхващащи аспекти като молекулярна характеристика, безопасност на храните и фуражите, благосъстояние на животните и въздействие върху околната среда.

Признава се, че някои елементи, като например данни за молекулярна и фенотипна характеристика, получени по време на етапите на предтърговско разработване, са от значение за информиране на оценката на риска на животните с ГМО и НГТ и производните им продукти, предназначени за пускане на пазара. Някои фенотипни аспекти включват и здравето и благосъстоянието на животните.

Съображенията, свързани с благосъстоянието на животните, се признават за ключови за оценката на риска от ГМО, включващи животни. Необходим е обаче понататъшен диалог с мениджърите по риска, за да се определи как тези аспекти трябва да бъдат интегрирани в общата рамка за анализ на риска.



Фигура 1. Опростено описание на предтърговското и търговското развитие на генно редактирани животни.

Разработването на НГТ животни включва *ex vivo* модификация на соматични клетки, зародишни клетки или ембриони в ранен стадий от генетично елитни животни донори чрез въвеждане на NGT реагенти, използващи различни методологии. Производството на потомство-основатели в предтърговските етапи използва видовете специфични методи. Например, при бозайниците, редактираните ембриони се имплантират в матка, докато при рибите се инкубират във вода.

Разширеното предтърговско развитие ще включва размножаване и характеризирание на характеристиките. След като оптимизираният NGT характеристики са успешно установени в елитни разплодни животни (т.е. ядрото или популацията-основател), процесът преминава от предтърговско развитие към търговско развитие. Търговското разработване ще включва разширяване и разпространение чрез тръбопровод, подходящ за този вид, често включващ фенотипна характеристика на всяко поколение както за признака, свързан с интервенцията на NGT, така и за други съответни производствени характеристики.

4.2. Идентифициране на потенциални опасности и рискове от нови продукти

Панелът по ГМО сравни потенциалните опасности и рискове, свързани с прилагането на НГТ при животни за храна, фураж и други селскостопански цели, с тези, получени от УГТ и традиционното развъждане.

Сравнението се фокусира върху две основни области:

- опасности и рискове (преднамерени и непреднамерени), свързани с процеса на модификация, и тези
- свързани с естеството на получения нов белег.

Опасностите и рисковете, свързани с процеса на модификация, разглеждат произхода на всеки нов генетичен материал и потенциалните рискове, свързани с

промени в генома на гостоприемника както на целевото място, така и на други места в генома (т.е. промени в генома на гостоприемника), включително евентуалното включване на нежелани последователности.

Опасностите и рисковете, свързани с естеството на получения нов белег, разглеждат генните продукти (т.е. източник на ДНК и безопасността на генните продукти), с по-широки последици, свързани с консумацията на храни и фуражи от животински произход, управлението на животните и тяхното съзнателно освобождаване в околната среда, взети предвид в сравнение с тези, свързани с УГТ и традиционното развъждане.

Тези сравнения имат за цел да определят как опасностите и рисковете, свързани с НГТ, съответстват на тези от УГТ и традиционното развъждане на търговски етап, предоставяйки цялостна рамка за оценка на риска за тяхното използване в храни, фуражи и други селскостопански производства.

(i) SDN-1, SDN-2 и сравними техники (напр. редактиране на бази или първичното редактиране) могат да се използват за модифициране на ендегенна ДНК последователност без предвиденото въвеждане на допълнителен генетичен материал (SDN-3 или УГТ). Освен това, индуцираните промени са подобни на спонтанните мутации, които могат да бъдат въведени чрез традиционното развъждане.

В резултат на това не са идентифицирани нови опасности, свързани с процеса на модификация или нововъведения белег, в сравнение с УГТ или конвенционалното размножаване.

(ii) SDN-3 представлява значително усъвършенстване на УГТ, позволяващо вмъкване на трансген, интраген или цисген в специфично целево място в животинския геном, вместо произволно въвеждане.

- Въпреки че опасностите, породени от SDN-3, са от същото естество като тези, породени от УГТ, целенасоченото вмъкване може да намали потенциалните опасности, свързани с нарушаването на ендегенни гени и/или регулаторни елементи в реципиентния геном.
- Опасностите, породени от новия белег, произтичащ от въведената трансгенна или инtragenна ДНК последователност, са от същото естество като тези, породени от УГТ.
- Опасностите, породени от новия белег, произтичащ от въведената цисгенна ДНК последователност, са от същото естество като тези, породени от конвенционалното размножаване.

(iii) Прилагането на НГТ може да доведе до нецелев промени в генома.

- Когато се открият нецелев мутации, те са от същото естество като тези, които възникват при конвенционалното развъждане и следователно не представляват нова опасност¹⁹.

Въпреки че новоприетите гени (НГТ) могат да въвеждат черти със скорост, надвишаваща тази при традиционното развъждане, като се има предвид литературата и анализирания казуси, Панелът по ГМО не е идентифицирал нови черти, които са различни от тези, които могат да бъдат въведени чрез УГТ или традиционно развъждане.

¹⁹ (Atkins et al., 2021; Burger et al., 2024; Dong et al., 2019; Hennig et al., 2020; Hruscha et al., 2013; Peterson et al., 2023; Seruggia et al., 2015; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2015)

Оценката на риска винаги взема предвид опасността и експозицията. Като се има предвид, че на търговския етап не са идентифицирани нови потенциални опасности, свързани с животни, получени чрез НГТ, не се очакват нови потенциални рискове за хората, животните и околната среда, дори когато има експозиция.

Струва си да се отбележи, че пред търговското разработване на УГТ и НГТ животни може да включва процедурни стъпки, които не се използват често в настоящите традиционни процеси на развъждане. Най-ранните процедурни стъпки могат да доведат до нежелани фенотипове (напр. мъртво раждане, деформация), които понякога са свързани с напреднали технологии за развъждане (напр. клониране, ембриотрансфер), което **води до опасности, засягащи здравето и благосъстоянието на животните**. Тези опасности са специфични за всеки отделен случай.

В обобщение оценката:

Експертната група по ГМО не установява нови опасности, свързани нито с процеса на модификация, нито с нововъведения признак, когато SDN-1, SDN-2 и сравними техники (напр. базово редактиране или основно редактиране) са сравнени с установените геномни техники (УГТ) или традиционната селекция.

Опасностите, породени от SDN-3, са от същото естество като тези, породени от УГТ, и целенасоченото въвеждане може да намали потенциалните опасности, свързани с нарушаването на ендогенните гени и/или регулаторните елементи в реципиентния геном. Опасностите, породени от новия признак, произтичащ от въведената трансгенна или интрагенна ДНК секвенция, са от същото естество като тези, породени от УГТ. Опасностите, породени от новия признак, произтичащ от въведената цисгенна ДНК секвенция, са от същото естество като тези, породени от традиционното развъждане. Нецелевите мутации от редактирането на генома са сходни по естество с тези от традиционното развъждане и не представляват нови опасности. Следователно, въз основа на наличните понастоящем данни, не са установени нови потенциални опасности и следователно нови рискове за хората, животните или околната среда.

Опасностите за здравето и благосъстоянието на животните, получени чрез УГТ и НГТ, свързани с етапите преди пускането им на пазара, следва да се разглеждат чрез оценки на всеки отделен случай, когато са информативни за оценката на риска, тъй като най-ранните процедурни стъпки могат да доведат до появата на нежелани фенотипове, които понякога са свързани с усъвършенствани технологии за развъждане.

4.3. Оценка на риска от ЕОБХ за здравето и благосъстоянието на животните

Рисковете за здравето и благосъстоянието на животните се разглеждат в научните становища на ЕОБХ от 2004 г. насам, предоставяйки научно обоснована, прозрачна и възпроизводима рамка за справяне със специфични проблеми, свързани с благосъстоянието на животните, в рамките на ограничен период от време и с налични научни данни. Понятието „благосъстояние на животните“ включва и здравето на животните.

Наскоро Панелът АНАВ²⁰ на ЕОБХ извърши преразглеждане на методологиите за оценка на риска за здравето и благосъстоянието на животните в отговор на мандати, получени от Европейската комисия (EFSA АНАВ Panel, 2022a). От 2020 г. ЕК започна цялостна оценка на законодателството за хуманно отношение към животните и възложи на ЕОБХ да разработи научни становища относно аспектите на благосъстоянието на

²⁰ АНАВ – Animal Health and Welfare – Здраве и благосъстояние на животните

различни видове и категории селскостопански животни. В тази рамка, ЕОБХ е предоставила научни становища относно благосъстоянието на животните по време на транспортиране (EFSA ANAW Panel, 2022c, 2022d, 2022e, 2022f) и във фермата (EFSA ANAW Panel, 2022b, 2023a, 2023b, 2023c, 2023d). *(препратките можете да намерите в оригиналното становище)*

Една от целите на законодателството на ЕС за защита на животните е да гарантира, че животните не са изложени на предотвратими негативни афективни състояния като болка и дистрес, като по този начин се фокусира върху предотвратяването на отрицателните последици за благосъстоянието им.

Освен това, насоките на ЕОБХ относно здравето на животните и благосъстоянието на генетично модифицираните животни (EFSA GMO and ANAW Panel, 2012) са предимно фокусирани върху гарантирането, че животните са способни да функционират, което днес не покрива пълния обхват на благосъстоянието на животните (напр. Fraser, 2009; Mellor & Beausoleil, 2015). След публикуването на това ръководство, знанията за благосъстоянието на животните и способността им да изпитват както негативни, така и положителни афективни състояния нараснаха значително, което доведе до по-нови инструменти за оценка на благосъстоянието на животните, фокусирани върху комбинация от нужди и мотивации на животните, афективни състояния, когнитивни състояния и способност за функциониране в дадена среда (напр. Mellor, 2017). Тези знания позволяват по-цялостна оценка на благосъстоянието на животните и са отразени в по-скорошния документ с насоки на ЕОБХ ANAW относно благосъстоянието на животните.

4.3.1. Здраве и благосъстояние на животните

Общите принципи на експертната група на ЕОБХ по ГМО и ANAW (2012 г.) са частично приложими, но недостатъчни за оценката на конвенционални и генетично модифицирани животни, включително УГТ и животни, получени чрез НГТ, и се препоръчва актуализация в съответствие с подхода, описан в насоките на ANAW от 2022 г.

Методиката за оценка на здравето и благосъстоянието на животните трябва да бъде преразгледана и значително разширена, за да се включат най-новите знания относно благосъстоянието на животните, последиците за благосъстоянието на тях и използването на основани на животните показатели за благосъстоянието им (ABM)²¹, както е посочено в последните становища на ЕОБХ относно ANAW (напр. Експертна група на ЕОБХ по ANAW, 2022b при прасета и Експертна група на ЕОБХ по ANAW, 2023a при телета) и научни изследвания.

Настоящата методология на ЕОБХ относно здравето и благосъстоянието на животните беше разработена, като бяха взети предвид мандатите, получени по отношение на бозайниците и видовете птици, поради което методологията относно рибите и безгръбначните животни трябва да бъде разгледана допълнително.

Насоките са съсредоточени главно върху функцията на животните и не споменават например афективните състояния (валентността на начина, по който животните възприемат света), които понастоящем са в основата на определението на ЕОБХ за последиците за благосъстоянието на животните (Експертна група на ЕОБХ по ANAW, 2022a), и трябва да бъдат взети предвид за генетично модифицирани животни, включително УГТ и животни, получени чрез НГТ.

²¹ ABM – Animal based measures

Оценката следва да обхваща селскостопанските практики, при които се отглеждат животните, включително световната търговия с живи животни.

Оценките на риска за здравето на животните и благосъстоянието на тях следва да обхващат всички фази *in vivo*, попадащи в сферата на компетентност на ЕОБХ, и трябва да се съсредоточат върху насоки за заявителите и оценителите, които са специфични за всеки конкретен случай, основани на хипотези и пропорционалност.

Следва да се дадат насоки по отношение на статистическите анализи, моделирането и проектирането на експерименти и те да бъдат преразгледани в светлината на принципите на 3R²² и потенциалните приложения на изкуствения интелект и т.н.

Методологията на ЕОБХ относно здравето и благосъстоянието на рибите и безгръбначните следва да бъде допълнително разработена, за да бъде подходяща за целта. Това следва да включва, за всички животински видове, преместване на фокуса на ръководството от „животинска функция“ към афективни състояния (валентността на начина, по който животните възприемат света). Част от тази работа включва включването на най-новите познания относно благосъстоянието на животните, последиците за благосъстоянието и използването на показателите, основани на животните (ABM).

Освен това оценката следва да обхваща селскостопанските практики, при които се отглеждат животните, включително световната търговия с живи животни. Счита се, че са необходими определяне на мерки и крайни точки за оценка на здравето на животните и благосъстоянието им, както и хармонизиране в оценката на ЕС.

В рамките на този мандат разглеждането на оценката на благосъстоянието на животните беше поставено в контекста на животни, получени чрез НГТ, които са потенциално готови за пазара, но **етапите преди пускането на пазара трябва да бъдат взети предвид, когато предоставят важна информация за оценката на риска. Етичните и социално-икономическите аспекти, свързани с благосъстоянието на животните, свързани с технологията за редактиране на гени, са извън обхвата на ЕОБХ и следователно не се вземат предвид.**

Различните раздели на насоките относно специфичните области на риск следва да бъдат актуализирани:

– В насоките следва ясно да се посочи, че в случаите, когато въведеният признак води до стерилност, ефикасността на признака следва да бъде потвърдена, тъй като това ще бъде от голямо значение за оценката на риска от повишена устойчивост и инвазивност.

– Експертната група/работната група по ГМО освен това препоръчва актуализиране на насоките, за да се посочи ясно, че само в случаите, когато въведеният признак води до модифицирана чувствителност към патогени, тази проблемна област следва да бъде оценена в оценката на риска преди пускането на пазара.

– В актуализираните насоки следва да се поясни, че оценката на потенциалната НГТ е от значение само в случаите, в които генетичното модифициране включва въвеждането на пораждащ безпокойство ген/последователност (напр. ген на АМР), който може да бъде селективно задържан и да доведе до вреда.

²² 3R принципът може да се отнася за два различни подхода: за етиката в експерименталната дейност с животни (Replace, Reduce, Refine - замяна, намаляване, усъвършенстване) и за опазване на околната среда (Reduce, Reuse, Recycle - намаляване, повторно използване, рециклиране).

– В актуализираните насоки относно потенциалните взаимодействия с целевите организми следва да се уточни, че развитието на резистентност при целевите вредители се разглежда както като вреда за околната среда, така и като икономическа вреда. Освен това опасностите за животни, които не са генетично модифицирани, в резултат на развитието на резистентност на целевия патоген при резистентни към болести животни, получени чрез НГТ, следва да бъдат обозначени като проблемни области, свързани с патогени, инфекции и заболявания.

– Актуализираните насоки относно потенциалните взаимодействия с НГТ следва да се съсредоточат върху събирането на данни, за да се тестват хипотезите за риска, свързани с целите за защита, и да се подчертае, че в случаите, когато данните на място се считат за необходими за оценката на риска, те следва да идват с предимство от проучвания, извършени в среда на ЕС.

– В актуализираните насоки следва да се уточни, че оценка на потенциалните въздействия върху околната среда, свързани с остаряването на човека на животни, получени чрез НГТ, следва да се извършва само в случаите, в които по отношение на животните, получени чрез НГТ, се прилага изменен режим, който би могъл да бъде свързан с потенциал за по-големи вреди за околната среда, в сравнение с настоящите практики при конвенционално отглежданите животни.

– Актуализираните насоки следва да предоставят конкретни примери за илюстриране на потенциалните вреди за абиотичната среда, които биха могли да възникнат от животни, получени чрез НГТ, в сравнение с конвенционално отглежданите животни.

4.4. Оценка на съществуващите документи с насоки на ЕОБХ

Задълбочена оценка на съществуващите документи с насоки на ЕОБХ²³ за оценката на риска от ГМ животни разкри, че техните принципи и препоръки предоставят основата за оценка на рисковете от животни, получени чрез НГТ, за храни, фуражи и други селскостопански цели; настоящият текст обаче разглежда само частично темите в няколко области (напр. здравето и благосъстоянието на животните) и може да изисква допълнителни актуализации, адаптации или подобрения на *ad hoc* основа, за да се разгледа оценката на риска на животните, получени чрез НГТ, както е посочено в настоящото становище.

Специфични области и аспекти на насоките на ЕОБХ (на различните Експертни групи на ЕОБХ по ГМО и АНАВ, през годините), които следва да бъдат актуализирани, адаптирани или допълнени:

- Оценка на риска за храните и фуражите
- Токсикология и оценка на алергенността
- Мониторинг след пускането на пазара
- Оценка на риска за околната среда
- Оценка на храненето

5. ВСИЧКИ ЗАКЛЮЧЕНИЯ

Когато съществуващите документи с насоки на ЕОБХ (Експертна група на ЕОБХ по ГМО и АНАВ, 2012 г.; Експертна група на ЕОБХ по ГМО, 2013 г.) за оценка на риска

²³ (Експертна група на ЕОБХ по ГМО и АНАВ, 2012 г.; Експертна група на ЕОБХ по ГМО, 2013 г.)

от ГМ животни са разработени за първи път, като генетичната модификация включва предимно случайно въвеждане на екзогенни генни касети²⁴ в геномите на животните реципиенти. По това време ограничените познания за цели геномни секвенции и генни функции при животни, използвани за храна, фураж и други селскостопански цели, внесоха значителна несигурност относно потенциалните ефекти от тези модификации. Тези неясноти формираха основата за разработването на съществуващите насоки.

Оттогава областта е напреднала значително. НГТ, като CRISPR/Cas и други инструменти за прецизно редактиране, са довели до целенасочени генетични промени, често без да се изисква въвеждането на екзогенни генни касети. Тези технологии, които сами по себе си не породят допълнителни рискове, дават възможност за по-предвидими резултати, като свеждат до минимум опасностите, свързани с по-ранните методи.

Тъй като потенциалните рискове, свързани с процеса на генетична модификация, са все по-добре разбрани, бъдещите насоки биха могли да поставят по-голям акцент върху оценката на въведения(те) признак(ци) или продукт, както и върху тяхното взаимодействие с приемната среда, вместо да се съсредоточават върху метода, използван за създаване на генетичната модификация.

При проучване на хоризонта бяха установени различни животни, получени чрез НГТ, с потенциал да достигнат до пазара на ЕС в краткосрочен, средносрочен и дългосрочен план въз основа на настоящия етап от развитието на пазара (търговски, предтърговски, научноизследователски и развойни дейности).

Не са установени нови опасности, свързани нито с процеса на модификация, нито с нововъведения признак, когато SDN-1, SDN-2 и сравними техники (напр. базово редактиране или основно редактиране) са сравнени с установените геномни техники (УГТ) или конвенционалната селекция. Опасностите, породени от SDN-3, са от същото естество като тези, породени от УГТ, и целенасоченото въвеждане може да намали потенциалните опасности, свързани с нарушаването на ендогенните гени и/или регулаторните елементи в реципиентния геном. Опасностите, породени от новия признак, произтичащ от въведената трансгенна или интрагенна ДНК секвенция, са от същото естество като тези, породени от УГТ. Опасностите, породени от новия признак, произтичащ от въведената цисгенна ДНК секвенция, са от същото естество като тези, породени от конвенционалното развъждане. Нецелевите мутации от редактирането на генома са сходни по естество с тези от конвенционалното развъждане и не представляват нови опасности. Следователно, въз основа на наличните понастоящем данни, не са установени нови потенциални опасности и следователно нови рискове за хората, животните или околната среда.

Опасностите за здравето и благосъстоянието на животните при животните, получени чрез УГТ и НГТ, свързани с етапите преди пускането им на пазара, следва да се разглеждат чрез оценки на всеки отделен случай, когато са информативни за оценката на риска, тъй като най-ранните процедурни стъпки могат да доведат до появата на неупотребявани фенотипове, които понякога са свързани с усъвършенствани технологии за развъждане.

Задълбочената оценка на съществуващите документи с насоки на ЕОБХ за оценка на риска от генетично модифицирани животни показва, че техните принципи и препоръки предоставят основата за оценка на рисковете от животни, получени чрез НГТ, за употреба в храни, фуражи и други селскостопански цели; настоящият текст обаче

²⁴ Генните касети са къси мобилни ДНК сегменти, обикновено съдържащи един ген и специфично място за рекомбинация, които се мобилизират от интегрони. Тези касети често са включени в по-голям подвижен елемент, наречен интегрон, където множество касети могат да образуват тандемна решетка.

обхваща само частично темите в няколко области (напр. здравето на животните и благосъстоянието на тях) и може да изисква допълнителни актуализации, адаптации или подобрения на *ad hoc* основа, за да се разгледа оценката на риска на животните, получени чрез НГТ, както е посочено в настоящото становище.

6. Източник:

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), Casacuberta, J., Barro, F., Braeuning, A., de Maagd, R., Epstein, M. M., Frenzel, T., Gallois, J.-L., Koning, F., Messéan, A., Moreno, F. J., Nogué, F., Schulman, A. H., Tebbe, C., Veromann, E., Firbank, L., Glandorf, D., Herskin, M. S., Lillico, S. G., Savoini, G. (2025). New developments in biotechnology applied to animals: An assessment of the adequacy and sufficiency of current EFSA guidance for animal risk assessment. *EFSA Journal*, 23(8), e9566. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2025.9566>

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2025.9566>

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms). (2012). Scientific Opinion addressing the safety assessment of plants developed using zinc finger nuclease 3 and other site-directed nucleases with similar function. *EFSA Journal*, 10(10), 2943. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2943>

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms). (2013). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals. *EFSA Journal*, 11(5), 3200. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3200>

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms). (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 Journal*, 18(11), 6299. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6299>

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms). (2020b). Scientific Opinion on the adequacy and sufficiency evaluation of existing EFSA guidelines for the molecular characterisation, environmental risk assessment and post-market environmental monitoring of genetically modified insects containing engineered gene drives. *EFSA Journal*, 18(11), 6297. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6297>

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms). (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 Journal*, 19(2), 6301. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6301>

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms). (2022a). 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 Journal*, 20(7), 7410. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7410>

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms). (2022b). Updated scientific opinion on plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal*, 20(10), 7621. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7621>

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms). (2022c). Statement on criteria for risk assessment of plants produced by targeted mutagenesis, cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal*, 20(10), 7618. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7618>

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms). (2022d). Scientific Opinion on development needs for the allergenicity and protein safety assessment of food and feed products derived from biotechnology. *EFSA Journal*, 20(1), 7044. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7044>

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms). (2024). New developments in biotechnology applied to microorganisms. *EFSA Journal*, 22(7), 8895. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8895>

EFSA Scientific Committee. (2018). Guidance on uncertainty analysis in scientific assessments. *EFSA Journal*, 16(1), 5123. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5123>

☐ Amber ☐ Green ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

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

тел. 02/4273056

EFSA Scientific Committee. (2020). 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 Journal*, 18(10), 6263. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6263>

EFSA Scientific Committee. (2022). 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 Journal*, 20(8), 7479. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7479>



Други научни становища и актуална информация от областта на здравето, хуманното отношение и благосъстоянието на животните, антимикробната резистентност, африканка чума по свинете, както и оценка на риска по цялата хранителна верига може да намерите на сайта на Центъра за оценка на риска по хранителната верига:

<http://corhv.government.bg/>
<http://corhv.government.bg/?cat=27>
<http://corhv.government.bg/?cat=71>

Може да се запознаете с допълнителна информация, в която ЦОРХВ проследява във времето развитието и навлизането на пазара на новите геномни техники:

Генетично модифицирани животни Информация и работа на Европейския орган за безопасност на храните (ЕОБХ, EFSA)

<https://corhv.government.bg/%D0%94-%D0%A0-%D0%9C%D0%90%D0%94%D0%9B%D0%95%D0%9D-%D0%92%D0%90%D0%A1%D0%98%D0%9B%D0%95%D0%92%D0%90-%D0%93%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%BD%D0%BE-%D0%BC%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D1%84%D0%B8%D1%86%D0%B8%D1%80%D0%B0%D0%BD%D0%B8-%D0%B6%D0%B8%D0%B2%D0%BE%D1%82%D0%BD%D0%B8-%D0%98%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F-%D0%B8-%D1%80%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%82%D0%B0-n-30-2358>

Нови разработки в областта на геномните технологии и тяхното значение за опазването на биоразнообразието – за и против мнения на страните членки на ЕС

<https://corhv.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%BE%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>

Защо новите геномни техники няма да решат проблемите, свързани с интензивното животновъдство

<https://corhv.government.bg/%D0%94-%D0%A0-%D0%9C%D0%90%D0%94%D0%9B%D0%95%D0%9D-%D0%92%D0%90%D0%A1%D0%98%D0%9B%D0%95%D0%92%D0%90-%D0%97%D0%B0%D1%89%D0%BE-%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%82%D0%B5-%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D0%BD%D0%B8-%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%B8-%D0%BD%D1%8F%D0%BC%D0%B0-%D0%B4%D0%B0-%D1%80%D0%B5%D1%88%D0%B0%D1%82-%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%BB%D0%B5%D0%BC%D0%B8%D1%82%D0%B5-n-30-2435>

☐ Amber ☐ Green ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

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

тел. 02/4273056

Настоящи и бъдещи пазарни приложения на нови геномни техники (NGT)

<https://corhv.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>

Спиране на рутинната кастрация на мъжките прасета: Къде се намира Европа в намирането на алтернативи? – от страница 8 Нови разработки на генното инженерство – вълнуващи за учените и крайно притеснителни за обществото

<https://corhv.government.bg/%D0%B4-%D1%80-%D0%9C%D0%B0%D0%B4%D0%BB%D0%B5%D0%BD-%D0%92%D0%B0%D1%81%D0%B8%D0%BB%D0%B5%D0%B2%D0%B0:-%D0%A1%D0%BF%D0%B8%D1%80%D0%B0%D0%BD%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D1%80%D1%83%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B0%D1%82%D0%B0-%D0%BA%D0%B0%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F-%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D1%8A%D0%B6%D0%BA%D0%B8%D1%82%D0%B5-%D0%BF%D1%80%D0%B0%D1%81%D0%B5%D1%82%D0%B0:-n-27-1354>

Патентите върху ГМ лабораторни животни увеличават страданието им

<https://corhv.government.bg/%D0%94-%D0%A0-%D0%9C%D0%90%D0%94%D0%9B%D0%95%D0%9D-%D0%92%D0%90%D0%A1%D0%98%D0%9B%D0%95%D0%92%D0%90:-%D0%9F%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%D1%82%D0%B5-%D0%B2%D1%8A%D1%80%D1%85%D1%83-%D0%93%D0%9C-%D0%BB%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%B8-%D0%B6%D0%B8%D0%B2%D0%BE%D1%82%D0%BD%D0%B8-%D1%83%D0%B2%D0%B5%D0%BB%D0%B8%D1%87%D0%B0%D0%B2%D0%B0%D1%82-n-30-2595>

Геномни редакции при свине, цели за постигане в селското стопанство. Ксенотрансплантация на органи и свързаните с това рискове и етични опасения

<https://corhv.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%93%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D0%BD%D0%B8-%D1%80%D0%B5%D0%B4%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%B8-%D0%BF%D1%80%D0%B8-%D1%81%D0%B2%D0%B8%D0%BD%D0%B5-%D1%86%D0%B5%D0%BB%D0%B8-%D0%B7%D0%B0-%D0%BF%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%B5-%D0%B2-%D1%81%D0%B5%D0%BB%D1%81%D0%BA%D0%BE%D1%82%D0%BE-n-30-2585>

Становище на ЦОРХВ относно растенията, получени чрез някои нови геномни техники (NGT) и производените от тях храни и фуражи, и изменящ Регламент (ЕС) 2017/625

<https://corhv.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>

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

<https://corhv.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%9D%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%82%D0%B5-%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D0%BD%D0%B8-%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%B8-%E2%80%93%D0%B1%D0%B5%D0%B7%D0%BE%D0%BF%D0%B0%D1%81%D0%BD%D0%B8-%D0%BB%D0%B8-%D1%81%D0%B0-%D1%82%D0%B5-%D0%B8-%D0%B4%D0%B0%D0%BB%D0%B8-n-30-2466>

☐ Amber ☐ Green ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

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

тел. 02/4273056

Оценка на риска и критерии за оценка на риска от растения, произведени чрез целеви мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза

<https://corrhv.government.bg/%D0%9A%D0%A0%D0%90%D0%A1%D0%98%D0%9C%D0%98%D0%A0%D0%90-%D0%69%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>

ИЗГОТВИЛ:

Д-р Мадлен Василева

Дирекция „Оценка на риска по хранителната верига“, ЦОРХВ

3.09.2025 г.

☐ Amber ☐ Green ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
 тел. 02/4273056