

**VALSTYBINIO MOKSLINIŲ TYTIMŲ INSTITUTO INOVATYVIOS MEDICINOS
CENTRO**

**PRANEŠIMO APIE VEIKLĄ, SUSIJUSIĄ SU GENETIŠKAI MODIFIKUOTŲ
MIKROORGANIZMŲ RIBOTU NAUDOJIMU PAGAL 2-os KLASĖS RIBOTO
NAUDOJIMO REIKALAVIMUS (PRANEŠIMAS)**

2017 m. Kovo 22 d. Nr.

Priedas Nr. 1-2

RIZIKOS ŽMOGAUS SVEIKATAI BEI APLINKAI ĮVERTINIMAS

GMM aprašymas

**1. GMM sukurtų naudojant bakterikas, mieles ir retrovirusines ir lentivirusines daleles,
rizikos vertinimas**

1.1. GMM aprašymas

Rekombinantinių mikroorganizmų su atitinkamomis genetinėmis charakteristikomis aprašai pateikti Pranešimo skyrelio lentelėje Nr. 9.1.1, eukariotinių ląstelių linijos ir jų charakteristikos pateiktos 9.1.2 lentelėje, o vektoriai su įterptais genais, aprašyti Pranešimo skyrelyje Nr. 9.2.1 lentelėje.

1.2. GMM panaudojimo tikslai

GMM bus panaudojami genetinei medžiagai pagausinti ir vėliau ta pagausinta genetinė medžiaga bus įvedama į žinduolių ląsteles tiesiogiai transfekcijos būdu ar pagaminant virusines daleles ir jomis infekuojant eukariotines ląsteles. Tokiu būdu bus gaunamos stabilios eukariotinės ląstelių linijos ekspresuojančios perprogramavimo faktorius ar florescuojančius balymus. Taip pat panaudojant GMM, bus išgryninti ir charakterizuojami įvairūs eukariotiniai baltymai, kurie vėliau bus naudojami moksliniuose tyrimuose (baltymų fiziko-cheminių savybių ir funkcijų tyrimai, antikūnų gamyba ir kita).

VERTINIMO PROCEDŪRA I

1.3. GMM sukeliamų pavojų identifikavimas

1.3.1. Recipientai

Planuojami naudoti bakterijų ir mielių recipientiniai kamienai yra nepatogeniški, netoksiški, nevirulentiški, nepavojingi žmogui, gyvūnams ar augalams. Šie bakterijų recipientai nesidaugina savarankiškai gamtoje ir jiems reikalingos specifinės mitybinės terpės.

Retrovirusiniai ir lentivirusiniai vektoriai patys savaime nekelia pavojaus. Tik įvedus tuos DNR vektorius į 293T ląsteles kartu su dar 3 papildomais vektoriais, koduojančiais virusinius komponentus (gag, pol, env) gali pasigaminti virusinės dalelės. Virusinių dalelių stabilumas yra gana trumpas, nes jose esanti genetinė RNR informacija aplinkoje, kitoje nei ląstelė, greitai gali būti pažeista dėl toje aplinkoje esančių nukleazų. Virusinės dalelės bus naudojamos norint įvesti genus į žmogaus fibroblastus ar odos epitelio ląsteles.

1.3.2. Įterpiama genetinė medžiaga

Genetinė medžiaga, kuri būtų įterpiama, tai literatūroje aprašyti genai, kurie koduoja ląstelių struktūrinius bei reguliatorinius baltymus, skirtus ląstelių perprogramavimui (Sox2, Nanog, Myc, Oct4) bei florescuojančius baltymus EGFP, RFP, YFP. Šie genai ar jų produktai nepasižymi kokiomis nors žinomomis toksiškomis savybėmis.

1.3.3. Vektoriai

Naudojami vektoriai yra aprašyti literatūroje ir gana plačiai naudojami bei prieinami vektorių duomenų ir nekomercinio pasidalinimo duomenų bazėse (pvz., ATCC, Adgene, Pubmed). Informacija apie juos pateikta Pranešimo 9.2 skyrelio lentelėje Nr. 9.2.1. Pačių vektorių stabilumas kambario temperatūroje yra trumpalaikis. Jie gali gana greitai degraduoti ir prarasti savo savybes dėl fizikocheminių poveikių ar esančių aplinkoje nukleazų. Todėl ilgesniam jų išlaikymui jie talpinami į -20C ar -80C šaldiklius, tam skirtose patalpose. Visi vektoriai padauginami įterpiant juos į bakterijas E.coli. Vėliau vektoriai naudojami eukariotinių ląstelių transfekcijai ar transdukcijai.

1.3.4. Gauti GMM

Panaudojant vektorius ir recipientus, bus gaunami rekombinantiniai bakterijų ar, mielių kamienai. Taip pat bus pagaminamos stabilios žinduolinių ląstelių linijos.

Vektoriai suteikia GMM atsparumą tam tikriems antibiotikams. Todėl auginant terpėse su antibiotikais selektyviai išauginami tik norimi GMM. Esant tam tikram DNR vektorių nestabilumui, automatiškai žūva ir pats pagamintas GMM organizmas, nes jo funkcionavimui būtinas ir antibiotikus koduojančio geno stabilumas. Pagaminti GMM bus padauginami ir iš jų išskiriamas didelis kiekis vektorių DNR.

Esant poreikiui, E.coli ir S.cerevisiase bus naudojami ir tikslinei baltymų ekspresijai. Tokiu atveju sunaikinus GMM bus išskiriamas ir charakterizuojamas reikiamas baltymas, fermentas ar kitas komponentas, nebeturintis mikroorganizmui ar vektoriui būdingos genetinės informacijos.

Tiek išskirta DNR ar tiksliniai baltymai, naudojami tolimesniuose darbuose su žinduolių ląstelėmis ir yra netoksiški, nealergiški, nepatogeniniai.

Panaudojant retrovirusinius ir lentivirusinius vektorius bus pagaminamos virusinės dalelės, kuriomis infekuosime žinduolių ląsteles (293T ląstelės, žmogaus odos fibroblastus). Gautos stabilios ląstelių linijos turinčios perprogramavimo faktorius (Sox2, Nanog, Myc, Oct4) ar florescuojančius baltymus (GFP, RFP, YFP) bus naudojamos ląstelių diferenciacijos tyrimuose ir 3D kultūrų modeliuose.

1.3.4.1. Galimas poveikis žmogaus sveikatai

Pasaulio laboratorijose atlikti tyrimai rodo, kad tie patys mūsų planuojami naudoti vektoriai, recipientai ir GMM (bakterijos, mielės) neturi jokio žalingo poveikio žmogaus sveikatai ir priskiriami 1 klasei.

Planuojamos sukurti virusinės retrovirusų ir lentivirusų dalelės yra priskiriamos 2 klasei.

Virusinės dalelės potencialiai gali infekuoti žmogų ar gyvūnus, jei būtų tiesioginiame fiziniame kontakte (pakliūtų ant odos ar gleivinės, ar į kraują). Tačiau, net ir tokiu atveju, pakliuvę į ląstelę ar organizmą, virusai jau nebegali savarankiškai pasidauginti ir plisti nei tarp ląstelių, nei iš vieno infekuoto organizmo į kitą, nes virusai yra genetiškai modifikuoti (neturi pagrindinių reguliatorinių genų ir vieno 3' LTR promotoriaus, reikalingo tam, kad virusas pats savarankiškai dauginųsi). Tokie virusai gali įterpti tik savo genetinę informaciją į infekuotos ląstelės genomą.

Tai iššaukia papildomą riziką, kad virusas pažeis tam tikrus genus atsakingus už ląstelių dauginimąsi ir tą ląstelę transformuos. Tai yra grynai tikimybinis dalykas ir kadangi virusas

integruojasi atsitiktinai genome, negalima iš anksto numatyti ar bus kažkokios papildomos pasėkmės, nes didelė dalis genomo nekoduoja jokių baltymų. Dažniausiai viruso integracija būna be pasekmių, bet literatūroje yra aprašyti atvejai, kai naudojant virusus genų terapijai buvo sukelta leukemija. Tačiau reikia pažymėti, kad tais aprašytais leukemijos atvejais buvo pacientai su imunodeficitu bei iš jų išskirtos kaulų čiulpų CD34+ ląstelės, kurios pačios dauginasi greitai ir yra jautresnės įvairioms manipuliacijoms. Duotuoju atveju, laikantis visų saugumo reikalavimų, aprašytų standartinėse darbo procedūrose, virusinių dalelių išplitimas ir infekcijos rizika yra minimali. Todėl pateiktas rizikos įvertinimas yra daugiau hipotetinis (kas būtų, jei būtų) ir įmanomas tik tada, jei asmuo, dirbantis su virusinėmis dalelėmis, nesilaikytų ar grubiai pažeistų saugaus darbo reikalavimus.

1.3.4.2. Galimas poveikis gamtai

Visos manipuliacijos su vektoriais, recipientais ir GMM bus atliekami tik tam skirtose uždaroje patalpose, neturinčiose kontakto su aplinka ir patekimas į patalpas yra tik su asmeninėmis ID kortelėmis.

Po darbo tiek atliekos, tiek nereikalingi GMM bus sunaikinami ir jokio kontakto su aplinka nebus. Taip pat visos darbai su GMM skirtos priemonės bus prižiūrimos ir po kontakto su GMM tinkamai nukenksminamos. Bus vengiama astrių ar kitų fizinių kūno pažeidimų išaukiančių priemonių darbe su GMM, tam, kad užkirsti kelią dirbančiųjų infekcijoms, esant nelaimingam atsitikimui. Įvykus nenumatytai avarinei situacijai, yra paruoštas veiksmų planas, kaip sumažinti bet kokią GMM kontakto su aplinka galimybę.

1.3.5. Sukurtų GMM klasifikacija

Eksperimentuose planuojama naudoti genetinę medžiagą, kuri kilus tiek iš 1, 2 tiek iš 3 klasės organizmų (pavienės, atskiros retrovirusų genomo reguliatorinės dalys - LTR, bet ne visus baltymus koduojantis virusinis genomai). Kadangi darbai bus vykdomi 2 saugumo lygio laboratorijose, patekimas į kurias galimas tik su ID kortele, mokslinės laboratorijos darbai su GMM bus pažymėtos kaip 2 biosaugumo lygio laboratorijos bei kaip vieta, kur dirbama su GMO. Visi dirbantys tose laboratorijose bus susipažinę su pagrindinėmis SDP ir kitais darbą su GMO reglamentuojančiais saugumo ir teisės aktais, dirbančiųjų atsakomybe ir informavimu apie bet kokius nelaimingus atsitikimus būtinybe. Visa informacija apie naudojamus ar naujai sukurtus GMM bus registruojama tiek elektroninėse duomenų bazėse, tiek darbo žurnaluose. Taip pat dalis tos informacijos bus skelbiama mokslinėse publikacijose bei perduodama į Aplinkos ministeriją.

1.3.6. Galimų pavojų įvertinimas

1.3.6.1. Sąlygos, kurių privaloma laikytis

Dirbant su GMM bus laikomasi tiek bendrųjų darbo saugos reikalavimų, tiek specifinių standartinių darbo procedūrų, kurios apriboja tiek žmonių, tiek medžiagų patekimą į specializuotas laboratorijas bei reglamentuoja GMM saugojimą ir saugų atliekų utilizavimą.

1.3.6.2. GMM kiekiai ir auginimo tūriai

Numatomuose eksperimentuose planuojama auginti bakterijas ir mieles tūryje nuo kelių šimtų mikrolitrų iki 5 litrų, tiek mėgintuvėliuose, kolbos, tiek fermentatoriuose. Gaminant retrovirusines ar lentivirusines daleles planuojamas tūris iki 50ml uždaruose, neišsipilančiuose ir nedūžtančiuose plastikiniuose flakonuose. Vėliau tas virusų turintis supernatantas bus panaudojamas norimų žinduolinių ląstelių infekcijai, tokiuose pat saugiuose vienkartinuose flakonuose, kurie po

kontakto su virusinėmis dalelėmis bus išautoklavuojami. Visos procedūros atliekamos tik tam pritaikytuose laminaruose 2 saugumo lygio laboratorijose.

1.3.6.3. Auginimo sąlygos

Bakterijos, mielės bus auginamos 0.1 – 2.0 L kolbose 25-37°C temperatūroje 24-36 val. Eukariotinės somatinės ląstelės ar specifinės ląstelių linijos produkuojančos virusines daleles bus auginamos 1-10ml tūryje iki 72 val +37°C tam skirtose 2 saugumo lygio laboratorijose ir CO2 inkubatoriuose, o persėjamos ir apdorojamos laminaruose.

1.3.6.3.1. Poveikis į darbo aplinką

Visos procedūros dirbant su GMM yra reglamentuotos esamų SDP ir GMM kontaktas galimas tik su laboratorine aplinka. Esant kažkokiam fiziniam GMM kontaktui su paviršiais, numatytos atitinkamos dezinfekcinės procedūros. Visos kietos ir skystos biologinės atliekos surenkamos tam skirtuose plastikiniuose autoklavuojamuose maišuose ir inaktyvuojamos autoklavavimu. Kadangi tiek bakterijos, tiek mielės ar virusai aplinkoje neišgyvena, tai neigiamas poveikis darbo aplinkai yra minimalus ir nebent įmanomas esant nenumatytam nelaimingam atsitikimui. O poveikio išorinei aplinkai iš viso neturėtų būti.

1.3.6.3.2. Jautrių planuojamiems GMM rūšių būvimas aplinkoje

Eksperimentuose nenumatomas darbas nei su gyvūnais nei su augalais. Yra tik fizinio kontakto tarp naudojamų GMM ir žmogaus, tiesiogiai dirbančio su GMM, galimybė. Bet laikantis SDP ir naudojant apsaugines pirštines, akinius ir chalata, tiesioginio fizinio kontakto bus išvengta. Be to darbuotojams, ką tik persirgus rimtomis ligomis ar esant žinomiems imuninės sistemos sutrikimams, bus rekomenduojama nedirbti su GMM.

1.3.6.3.3. Ar aplinka gali padėti išgyventi sukurtiems GMM?

Aplinka, kuri yra ne laboratorinė, nepadedą GMM išgyventi, o greičiau priešingai, stabdo GMM, kurie yra jautrūs aplinkos pokyčiams, papilitimą. Planuojami naudoti vektoriai, recipientai ir GMM yra jautrūs aplinkos pokyčiams ir jų konkurencinės savybės natūralioje aplinkoje būtų minimalios.

1.3.6.3.4. Fizinis poveikis į aplinką

Nenumatomas joks fizinis poveikis aplinkai.

1.3.6.4. Atliekų nukenksminimas ir utilizacija

Kiekvienas dirbantis su GMM privalo dėvėti laboratorinį chalata, vienkartinę pirštines ir apsauginius akinius. Laboratorijose esantys darbiniai paviršiai yra atsparūs cheminėms medžiagoms ir vandeniui. Nuo jų nesunkiai turi nusivalyti visos matomos dėmės ar bet kokia patekusi biologinė medžiaga. Manipuliacijos su GMM atliekamos laminaruose, turinčiuose UV lempas. GMM saugomi +4°C šaldytuvuose (lėkštelės apvyniojamos parafilmu, o skysta GMM kultūra uždaruose vienkartinuose induose) ir -20°C ar -80°C šaldikliuose kriomėgintuvėliuose ir tam skirtose dėžutėse. Dezinfekcijai naudojami 70% etanolio ar izopropanolio tirpalas ir hipochloritiniai tirpalai (12.5% tirpalas skiedžiamas 1:10 su vandeniu ir gaunamas darbinis 1.25% tirpalas, kuris gali būti laikomas iki 30 dienų) ar kiti komerciškai prieinami ir validuoti dezinfektantai. Kultūrų skysčiai po darbo su GMM surenkami į tuos pačius kultūroms išauginti naudotus stiklinius indus, kurie autoklavuojami (121°C, 20 min, 1 baro atmosferoje). Visos kietos medžiagos (antgaliai, vienkartiniai plastmasiniai mėgintuvėliai) taip pat autoklavuojami. Visas biologines medžiagas išveža iš JIMC pagal biologinių medžiagų nukenksminimo sutartį UAB „Ecotopas“.

VERTINIMO PROCEDŪRA II

1.4. Galutinis apribojimo klasės nustatymas

Bakterijų, mielių ir eukariotinių žinduolinių ląstelių recipientai ir jų vektoriai priskiriami 1-ai klasei. Retrovirusinės ir lentivirusinės dalelės ir ląstelių linijos, skirtos virusinių dalelių gamybai priskiriamos 2 klasei. Genetinė medžiaga yra kilusi iš organizmų priskiriamų 1, 2 ir 3 klasėms (retrovirusinių ar eukariotinių vektorių atskiri DNR elementai tokie kaip promotoriai ar reguliatorinės sekos). Darbuose planuojama naudoti genetinė medžiaga priskiriama 2-apribojimo klasei.

1.5. Galutinės išvados patvirtinimas

Galutinė išvada patvirtinama remiantis:

LR Aplinkos ministro įsakymu „Dėl genetiškai modifikuotų mikroorganizmų riboto naudojimo Lietuvos Respublikoje tvarkos aprašo patvirtinimo“, 2003-08-04, Nr.413, suvestinė redakcija nuo 2016-05-04.

Nustatyta GMM riboto naudojimo klasė pagal GMM klasifikavimo kriterijus, patvirtintus Lietuvos Respublikos aplinkos ministro, Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro ir Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2004 m. gruodžio 28 d. įsakymu Nr. D1-693/V-954/B1-1107 „Dėl genetiškai modifikuotų mikroorganizmų klasifikavimo kriterijų“.

LR socialinės apsaugos ir sveikatos apsaugos ministrų įsakymu „Dėl darbuotojų apsaugos nuo biologinių medžiagų poveikio darbe nuostatų patvirtinimo“, 2001-06-21, Nr. 80/353.

Lietuvos Respublikos Aplinkos, Sveikatos apsaugos ministrų ir Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2004 m. gruodžio 28 d. įsakymas Nr. D1-693/V-954/B1-1107 „Dėl genetiškai modifikuotų mikroorganizmų klasifikavimo kriterijų“.