

DOI: 10.14720/aas.2015.105.2.18

Agrovoc descriptors: genetically modified organisms, risk assessment, environmental impact assessment, environment, risk, legislation, Slovenia**Agris category code:** d50, f30

Namerno sproščanje gensko spremenjenih rastlin v okolje v Sloveniji

Zlata LUTHAR¹

Received September 18, 2015; accepted October 15, 2015.

Delo je prispelo 18. septembra 2015, sprejeto 15. septembra 2015.

IZVLEČEK

Namerno sproščanje gensko spremenjenih višjih rastlin (GSVR) v okolje je v Sloveniji regulirano z Zakonom o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO) Ur. l. RS 23/2005 in 21/2010, III. poglavje. Za vsako namerno sproščanje GSR v okolje je potrebno pridobiti dovoljenje, ki ga izda Ministrstvo za okolje in prostor (MOP). Vloga oz. prijava mora vsebovati zelo natančen in kompleksen opis GSR, njivo, kjer bo sproščena GSR in širšo okolico oz. okolje. Prijavo sestavlja Priloga 2 z dodatki: 1. Del A (tehnični podatki za izdajo dovoljenja za namerno sproščanje GSR v okolje); 2. Del B (ocena okoljskega tveganja); 3. Povzetek prijave za sproščanje GSR v slovenskem in angleškem jeziku, ki ga MOP posreduje v Bruselj in 4. Izpis za njivo iz zemljiškega katastra, na katero se bo sproščalo GSR. Postopek sproščanja do tu teče po omenjenem zakonu, ki velja že nekaj let in v katerem je jasno opredeljeno, da je sproščanje v Sloveniji mogoče. V konkretnem primeru GS riža iz leta 2011 je zakon veljal do izbire lokacije poskusa. Tu zakon ni bil upoštevan. Obveljal je pravilnik Sklada kmetijskih zemljišč in gozdov ter občinski sklep, ki sta bila močnejša od nacionalnega zakona in sta onemogočila gojenje GS riža na površini, ki je po zakonu primerna za sproščanje v okolje. Riž se v Sloveniji ne goji in nima divjih prednikov oz. bližnjih sorodnikov, s katerimi bi se lahko križal. Najbližje območje pridelovanja je v sosednji Italiji, ki je od potencialno izbrane lokacije v Sloveniji oddaljeno več kot 70 km.

Ključne besede: gensko spremenjene rastline, namerno sproščanje, okolje, tveganje, zakonodaja

ABSTRACT

DELIBERATE RELEASE OF GENETICALLY MODIFIED PLANTS INTO THE ENVIRONMENT IN SLOVENIA

Deliberate release of genetically modified higher plants (GMHPs) into the environment in Slovenia is regulated by the Law on the Management of Genetically Modified Organisms (ZRGSO) Ur. l. RS 23/2005 and 21/2010, III chapter. For each deliberate release of GMPs into the environment a license issued by the Ministry of Environment and Spatial Planning (MESP) must be acquired. The application or notification should contain a very accurate and complex description of the GMP, of the field where it will be released and of wider surroundings or environment. The application consists of Annex 2 with accessories: 1. Part A (technical data for the authorization of deliberate GMP release into the environment); 2. Part B (environmental risk assessment); 3. Application summary in Slovenian and English language) for the release of GMP into environment, which is transmitted to Brussels by MESP; 4. Extract from the Land Cadastre of the field to which the GMP will be released. The release procedure runs (till here) under the above mentioned Law, which has been in place for several years and which clearly defines that it is possible to release GMP in Slovenia. In the case of GM rice in 2011, the law applied till the site selection of the experiment. Here, the law was not sufficiently taken into account. It was prevailed by the regulation of Farmland and Forest Fund of the Republic of Slovenia and municipal decision, which was stronger than the national law and prevented the cultivation of GM rice in an area that is legally suitable for release of GMO into the environment. Rice is not grown in Slovenia and does not have wild ancestors or close relatives with whom it might mate. Nearest area of cultivation is in neighboring Italy, which is from potentially selected location in Slovenia more than 70 km away.

Key words: genetically modified plants, deliberate release, environment, risk, legislation

¹ Department of Agronomy, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-mail: zlata.luthar@bf.uni-lj.si

1 UVOD

Gensko spremenjeni organizmi (GSO) so rezultat sodobne biotehnologije, katere tehnike in metodologije so omogočile proučevati in uporabljati biološke sisteme v koristne namene človeštva. Moderna biotehnologija ima svoje korenine v bazičnih raziskavah osnovnih bioloških mehanizmov, ki so vplivali na razvoj orodij za manipulacijo z DNA ter prenos genetskega materiala med različnimi vrstami organizmov. GSO so pridobljeni z izolacijo molekul nukleinske kisline enega organizma in vnosom teh molekul v drugi organizem tako, da postanejo sestavni del njegove dedne informacije, ki je sposobna dedovanja. GSO so odprli nove možnosti v bioloških raziskavah, vplivali so na proučevanje funkcije določenih genov, mehanizme kontrole izražanja genov in ponudili veliko aplikativno vrednost. Njihovi produkti se že desetletja uporabljajo v medicini za proizvodnjo biofarmaceutikov, kjer so vključeni GS mikroorganizmi, evkariontske celične linije in višji organizmi. Genska terapija se ukvarja in poskuša nadomestiti manjkajoče ali okvarjene gene. GSO se uporabljajo tudi v drugih vejah gospodarstva, predvsem v kmetijstvu in prehrabeni industriji (Seidman in Moore, 1999).

Uporaba GSO, tako kot kakršnihkoli, lahko pomeni tudi potencialne nevarnosti za okolje ter zdravje ljudi in živali. Te nevarnosti izhajajo iz dejstva, da GSO pomenijo novost v naravi in niso bili podvrženi naravni selekciji in evoluciji ter iz

tega izhaja negotovost glede njihovih kratkoročnih in dolgoročnih vplivov na okolje ter zdravje ljudi in živali. Zaradi kompleksnosti ni mogoče predvideti in utemeljiti vseh negotovosti, ki so povezane z obnašanjem organizmov in bioloških sistemov, katerih del so (Wheelis in sod., 1998).

V Evropi je uveljavljeno načelo previdnosti pri ravnanju in uporabi proizvodov moderne biotehnologije. Previdnostni pristop izhaja iz predpostavke, da GSO predstavljajo morebitno nevarnost za okolje ter zdravje ljudi in živali. Zato sta uporaba in delo z GSO regulirana z evropskim zakonom in direktivami, ki jih imajo v svojo zakonodajo vključene tudi ostale članice na nacionalni ravni. Zakonodaja, kot bistveni del, zahteva oceno tveganja, ki ga novonastali GSO predstavlja za okolje, zdravje ljudi in živali ter upravljanje s tveganjem, to je izvajanje ukrepov, ki zmanjšujejo tveganje na najnižjo možno raven (Directive 2001/18/EC, 2001).

V Sloveniji je v veljavi Zakon o ravnanju z GSO (ZRGSO, Ur. l. RS 23/2005 in 21/2010), ki ureja delo z GSO in določa ukrepe za preprečevanje in zmanjševanje možnih škodljivih vplivov na okolje in zdravje ljudi ter živali. Zakon regulira delo z GSO v zaprtih sistemih, namerno sproščanje GSO v okolje in dajanje GSO oz. njihovih izdelkov na trg.

2 DELO Z GSO JE ZAKONSKO REGULIRANO

Delo z GSO se odvija na prej omenjenih treh ravneh. Njihovo ravnanje mora biti prijavljeno, za katero poskrbi prijavitelj, ki je fizična ali pravna oseba. Ta v okviru svoje dejavnosti izvaja delo z GSO v zaprtem sistemu, namerava namerno sproščati GSO v okolje ali dati izdelek na trg. Pred pričetkom dela mora oddati vlogo s predpisanimi podatki na Ministrstvo za okolje in prostor (MOP), na podlagi katere pridobi potrdilo oz. dovoljenje za delo z GSO.

Delo z GSO v zaprtih sistemih, tudi prostor, kjer se to delo izvaja, je opredeljeno z ZRGSO. Zaprti sistem je fizično omejen prostor, lahko je

laboratorij, proizvodni oddelek, rastlinjak ali drug zaprti prostor, kjer se opravlja delo z GSO. Delo z GSO v zaprtem sistemu zajema gojenje GSO, razmnoževanje, shranjevanje, prevažanje, premeščanje, odstranjevanje in uničevanje, pri katerem se izvajajo zadrževalni ukrepi. Zadrževalni ukrep je fizična zapora ali kombinacija fizične zapore s kemično ali biološko omejitvijo, ki upošteva načela dobre laboratorijske in proizvodne prakse, za omejitev stika GSO z okoljem in prebivalstvom ter izključuje ali zmanjšuje sposobnost razmnoževanja GSO ali prenosa spremenjenega genskega materiala izven zaprtega sistema.

Delo z GSO v zaprtem sistemu je uvrščeno v štiri varnostne razrede, ki izhajajo iz ravni tveganja, ki ga GSO in delo z njimi predstavljajo za zdravje ljudi, živali in okolje. Merila, po katerih se delo z določenim GSO uvrsti v posamezni varnostni razred, so določena z Uredbo o merilih za uvrstitev dela z GSO v zaprtem sistemu v varnostni razred in o zadrževalnih ter drugih varnostnih ukrepih za posamezen varnostni razred (Ur. l. RS, št. 71/2011).

2.1 Namerno sproščanje GSO – rastlin v okolje

Po zakonu (ZRGSO 23/2005, 21/2010) in direktivi (Directive 2001/18/EC) je namerno sproščanje GSO v okolje vsak nameren vnos, ki zagotavlja veliko stopnjo varnosti, razen dajanja izdelkov na trg, pri katerem se ne izvajajo zadrževalni ukrepi za omejitev stika GSO z okoljem in prebivalstvom. Izdelek je GS ali kombinacija GS, ki je sestavljen ali vsebuje GSO ali kombinacijo GSO in je dan na trg. Dajanje na trg je posredovanje oz. dajanje izdelkov osebam proti plačilu ali brez njega. Za dajanje na trg se šteje tudi uvoz izdelkov na carinsko območje Evropske skupnosti. Za dajanje na trg se ne šteje dajanje GSO osebam za delo z GSO v zaprtih sistemih ali za namerno sproščanje GSO v okolje skladno z zakonom.

V primeru namernega sproščanja GSR v okolje, vlogo sestavlja obrazec t.i. Priloga 2 in dodatki. Obrazec Priloga 2 je razdeljen na poglavja oz. dele, ki v strnjeni obliki zajemajo tehnične podatke o GSR ter priloge. Obvezne priloge so: 1. Ocena tveganja namernega sproščanja GSR v okolje (krajše: ocena okoljskega tveganja); 2. Izpis za njivo iz zemljiškega katastra, na katero se bo sproščalo GSR; 3. Povzetek tehnične dokumentacije; 4. in druge priloge, ki so vezane na specifičnosti sproščanja (zaupni podatki itd.).

Dodatki so napisani obširno in temeljito ter so podkrepjeni z literaturnimi navedbami. Sestavlja jih: 1. Del A - tehnični podatki za izdajo dovoljenja za namerno sproščanje GSR v okolje; 2. Del B - ocena okoljskega tveganja, ki je istočasno tudi obvezna priloga obrazca Priloga 2; 3. Povzetek prijave za sproščanje GSVR v slovenskem in angleškem jeziku.

1. Tehnični podatki so zbrani v delu A, strnjena verzija se vpiše v obrazec Priloga 2, razširjena in podkrepjena z literaturnimi

navedbami se pripravi posebej kot dodatek in je v grobem sestavljena iz 7 informacijskih poglavij:

A. Splošne informacije o prijavitelju: ime, strokovna izobrazba, poklicne izkušnje odgovornih in naslov projekta;

B. Informacije o prejemnem organizmu: vrsti, sorti, ki je bila predmet GS; dejavniki, ki vplivajo na razmnoževanje; obdobje oz. trajanje ciklusa razmnoževanja, ki je povezano z okoljskimi in genetskimi dejavniki; spolna kompatibilnost z drugimi gojenimi in divjimi vrstami ter razširjenost kompatibilnih vrst; sposobnost preživetja; razširjenost prejemne ali starševske rastline; morebitni toksični učinki za človeka, živali in druge organizme;

C. Informacije o genski spremembi: opis uporabljenih metod za GS; narava in izvor uporabljenega vektorja; velikost in ime donorjev in funkcija fragmentov (insertov oz. vključkov) predvidenih za vključitev;

D. Informacije o GSR: opis uvedenih ali spremenjenih lastnosti in značilnosti ter namen uvedbe; informacije o vsakem vključenem ali odstranjenem nukleotidnem zaporedju; velikost in struktura ter število kopij vključenega zaporedja; metode vnosa; izražanje vključka, čas in način ter mesto izražanja; metode spremljanja; informacije o razlikah med GSR in prejemno rastlino glede razmnoževanja, sposobnosti preživetja, genske in fenotipske stabilnosti vključka, morebitne spremembe sposobnosti GSR za prenos genskega materiala na druge rastline in bakterije, možna toksičnost, alergenost ali drugi škodljivi učinki za zdravje ljudi in živali, interakcije z abiotskim okoljem;

E. Informacije o kraju namernega sproščanja GSR: lega in velikost kraja sproščanja; opis lokalnega ekosistema, vključno s podnebjem, floro, favno in analizo tal ter vode v primeru zalivanja posevka; prisotnost naravnih ali gojenih kompatibilnih vrst in sort; navede se tudi bližnje uradno priznane biotope;

F. Informacije o namernem sproščanju: namen, metoda, začetek in trajanje sproščanja; metoda priprave in upravljanja z mestom sproščanja pred, med in po sproščanju vključno s prisotnimi

kulturami in načini pobiranja oz. žetve; ocenjeno število sproščenih GSR;

G. Informacije o načrtih monitoringa, kontrole kraja in odpadkov po sproščanju: morebitni varnostni ukrepi; potrebna razdalja od drugih divjih in gojenih kompatibilnih vrst; ukrepi za zmanjšanje širjenja reproduktivnih organov, pelod, semena, gomolji itd., metode in ukrepi čiščenja ter požig ostankov takoj po žetvi, obdelava tal; opis načrtov monitoringa in pripadajočih tehnik; opis načrtov ob izrednih stanjih; metode in zaščitni postopki za zavarovanje kraja sproščanja;

H. Uporabljena literatura in priloge: biografija in bibliografija prijavitelja; nukleotidna zaporedja vključkov; restriksijska analiza vektorja itd.

Povzetek tehničnih podatkov prijave sproščanja, ki ga sestavljajo prej omenjena ključna poglavja v strnjeni obliki.

2. Ocena okoljskega tveganja je priloga oz. dodatek obrazca Priloga 2 in je predstavljena v t.i. delu B, ki ga sestavljajo štiri poglavja:

1. Karakteristike GSR in sproščanje v okolje: informacije o prejemnem organizmu (sistematika, izvor, sorta); opis genske spremembe in GSR (tkivna lokacija in raven izražanja GS lastnosti); predvideno sproščanje (kraj, namen, specifični pogoji); pridelovalne tehnike; aktivnosti monitoringa med in po sproščanju; opis prejemnega okolja, interakcije med GSR in okoljem;

2. Ocena okoljskega tveganja: uvod, kratka predstavitev genske spremembe in prejemne rastline (običajno je to že uveljavljena sorta); možnosti in ocena širitve GSR v okolje s cvetnim prahom, semeni in ostalimi deli rastline, širitev oz. premiki, ki jih povzročajo živali, ptice in človeške napake – nesreče; preživetje v okolju; potencialni drugi negativni učinki; ocena tveganja širitve za človeško in živalsko zdravje ter okolje; izvajanje strategij za obvladovanje tveganj zaradi sproščanja v okolje; možnosti in ocena prenosa genskega materiala med spolno kompatibilnimi in nekompatibilnimi organizmi tudi tistimi, ki pripadajo različnim taksonomskim skupinam in potencialni negativni učinki; ocena potencialnih posledic prenosa genskega materiala; ocena tveganja vezanega na genski prenos za človeka, živali in okolje; izvajanje strategij za obvladovanje

tveganj pri sproščanju v okolje; potencialni negativni učinki izpostavljenosti GSR na kraju sproščanja z drugimi prisotnimi organizmi: s človekom, drugimi vretenčarji (ptice, glodalci), nevretenčarji (žuželke, mikroorganizmi); izvajanje strategij za obvladovanje tveganj je vezano na velikost in naravo sproščanja, na tehnologijo pridelave ter na genetsko in fenotipsko stabilnost lastnosti, na mesto izražanja lastnosti ali je po celi rastlini, ali samo v posameznem organu oz. tkivu;

3. Zaključke o potencialnem okoljskem učinku sproščene GSR: posebej se izpostavi morebitne možnosti, da GSR postane invazivnejša od gostiteljske ali sorodnih rastlin na območju sproščanja ali v naravnih habitatih; morebitne selektivne prednosti ali slabosti GSR; potencialne možnosti genskega prenosa GSR v razmerah pridelave na spolno kompatibilne rastlinske vrste ter morebitne selektivne prednosti ali slabosti, ki jih pridobijo omenjene rastline z genskim prenosom; potencialne takojšnje ali poznejše okoljske učinke, ki so rezultat posrednih in neposrednih interakcij med GSR in ciljnim organizmi (roparice, paraziti, patogeni) ter neciljnimi organizmi, tudi tistimi, ki medsebojno delujejo s ciljnim organizmi na ravni populacij tekmecev, rastlinojedov, simbiotov, ki so parazitoidni in patogeni; možni vplivi na človekovo zdravje izhajajoč iz posrednih in neposrednih interakcij GSR z osebami, ki jih uporabljajo, pridejo v stik z njimi ali se nahajajo v bližini krajev sproščanja; možni vplivi na živali in posledice za prehransko verigo, če je GSR in iz nje pridobljen produkt namenjen za živalsko prehrano; možni vplivi na biokemične procese, ki izhajajo iz interakcij GSR in ciljnih in ne-ciljnih organizmov na kraju in v bližini izpusta;

4. Uporabljena literatura: za pripravo ocene okoljskega tveganja;

Povzetek ocene okoljskega tveganja, ki ga sestavljajo ključna prej omenjena poglavja v strnjeni obliki.

3. Povzetek prijave za sproščanje GSR tudi v angleškem jeziku (Summary notification information format for the release of genetically modified higher plants - SNIF), ki ga MOP posreduje v Bruselj.

2.2 Ocena tveganja pri delu z GSO - rastlinami

Ocena tveganja, ki ga novonastali GSO predstavlja za okolje, zdravje ljudi in živali ter izvajanje ukrepov, ki zmanjšujejo tveganje na najnižjo možno raven, je osrednjega pomena pri delu z GSO. Tveganje pri delu z GSO je verjetnost, da bo ravnanje z GSO posredno ali neposredno, takoj ali kasneje ali dolgoročno kumulativno škodljivo vplivalo na zdravje ljudi, živali in okolje. Predvsem glede ohranjanja biotske raznovrstnosti, ohranjanja avtohtonih rastlinskih populacij, sort in živalskih pasem, rodovitnosti plodne zemlje, prehranjevalne verige ali zdravja človeka in živali. Lastnosti nevarnih dejavnikov, ki so lahko kemični, fizični ali biološki, so določene glede na naravo in glede na škodljivost posledic, ki jih lahko povzročijo ljudem, živalim ali okolju. Nevarne dejavnike se poskuša omejiti z različnimi zadrževalnimi ukrepi, tako da vsaka potencialna nevarnost ne pomeni avtomatično tudi tveganja. Nevarnost in tveganje sta različna, vendar soodvisna pojma, ki opredeljujeta stopnjo tveganja (Kinderlerer, 1997; Levin, 1997; McColl in sod., 2000; Jardine in sod., 2003).

Tveganje je torej določeno z verjetnostjo uresničitve nevarnosti in z resnostjo potencialnih škodljivih posledic. Tveganje pri delu z biološkimi dejavniki pomeni, kakšna je verjetnost, da pridemo v stik z mikroorganizmom (kontaminacija), rastlino (kontaktne spremembe zaradi izločanja rastlinskih snovi) in kakšne so lahko posledice stika. Te so lahko zanemarljive, lahko pa v primeru patogenega biološkega organizma ta povzroči infekcijo, obolenje človeka in v najhujši obliki tudi smrt.

Tveganje zaradi uporabe GSR je običajno predstavljeno z nekim splošnim vzorcem in je opredeljeno z nevarnostjo in izpostavljenostjo GSR. Nevarnost je potencialni pojav škodljivih vplivov zaradi dejanskih lastnosti organizma, medtem ko je izpostavljenost potencial, da bo prejemnik (osebek, populacija, sistem) v stiku s tem organizmom. Določitev nevarnosti (ang. hazard identification) je povezana z lastnostjo GSR, ki lahko v okolju povzroči škodo (npr. toksičnost, invazivnost). Ocena izpostavljenosti (ang. exposure assessment) je mera verjetnosti, da bo prišlo do izpostavljenosti okolja in ekosistema z morebitnimi nevarnimi lastnostimi GSR. Presoja vpliva (ang. effects assessment) je verjetnost, da bo

zaradi izpostavljenosti prišlo do nezaželenih vplivov in je predstavljena s funkcijo nevarnosti in izpostavljenosti, ki predstavlja merilo vpliva. Določitev stopnje tveganja (ang. risk characterization) je povezano z oceno tveganja na osnovi presoje vpliva in doda se kriterij, ki določi različne stopnje tveganja, npr. nizka, srednja, visoka stopnja tveganja (Pravilnik o oceni tveganja za delo z GSO v zaprtem sistemu, Ur. l. RS 45/2004; Pravilnik o oceni tveganja za namerno sproščanje GSO v okolje, Ur. l. RS 4/2006; Pravilnik o oceni tveganja za dajanje izdelka, ki vsebuje GSO, na trg, Ur. l. RS 13/2006).

Velikost tveganja se lahko določi na dva načina. Prvi način je izkustveni, kjer stopnjo tveganja določimo na osnovi znanih primerov, ki so se že zgodili v preteklosti. Drugi način ocene tveganja je posreden, kjer se oceni teoretične možnosti za uresničitev morebitne izpostavljenosti nevarnim dejavnikom. Potencialne posledice pa se določi s pomočjo opravljenih eksperimentalnih študij in povzame literaturne navedbe.

Ocena tveganja vključuje ugotavljanje in ovrednotenje tveganja, ki bi lahko nastalo zaradi dela z GSR v zaprtem sistemu, namernem sproščanju GSR v okolje ali dajanja izdelka na trg, za vsak primer posebej. Ocena tveganja zelo temeljito ožje in širše ter z interakcijami neživega in živega okolja predstavlja in umešča GSR v okolje in opozarja na morebitne škodljive učinke na ljudi in živali.

Pri tveganju se išče ravnotežje med sprejemljivim tveganjem in koristjo, ki ga prinaša določen nevaren dejavnik. GSO prinašajo določene koristi za človeško družbo, po drugi strani pa tako kot vse ostalo, predstavljajo določene potencialne nevarnosti za ljudi in okolje. Zato poskuša družba najti ustrezno ravnovesje pri uporabi GSO, med tveganjem in koristmi ter uporabo GSO regulira z zakoni (ZRGSO, 2005 in 2010).

2.3 Nesreča in monitoring pri delu z GSO – rastlinami

Zakon opredeljuje tudi nesrečo oz. nenamerno sproščanje GSO v okolje. To je vsak izreden dogodek ali vrsta dogodkov, kadar pri delu z GSO v zaprtem sistemu in tudi pri namernem sproščanju pride do nepredvidenega sproščanja GSO v okolje, ki lahko pomeni takojšnjo ali kasnejšo nevarnost

za okolje ali zdravje ljudi in živali. Vsako delo z GSO, predvsem namerno sproščanje, zahteva monitoring oz. spremljanje in nadzorovanje GSO in prejemnega okolja, procesov in postopkov ter možnih škodljivih vplivov skladno s predpisi.

Posebno težo ima monitoring pri namernem sproščanju GSR v okolje, ki naj bi se izvajal vsaj dve do tri leta po končanem sproščanju v okolje (Gebhard in Smalla, 1999).

3 POSKUSNO NAMERNO SPROŠČANJE GS RIŽA V OKOLJE

Italijanska industrijska sorta riža CR W3 je bila požlahtnjena z biotehnoškimi postopki v zaprtem sistemu, v namene pridobivanja farmakološke učinkovine, encima β -glukozidaze za zdravljenje dedne presnovne bolezni. V laboratoriju in rastlinjaku so bile opravljene potrebne študije. Za nadaljnja proučevanja, ki se zaključijo z registracijo zdravila, bi bilo potrebno vsaj dveletno poskusno gojenje na polju (Patti in sod., 2012).

3.1 Genska sprememba riža sorte CR W3 in uporabnost rekombinantnega encima

CR W3 je italijanska potrjena, a ne gojena industrijska sorta riža za pridobivanje škroba z okroglimi semeni, razmerje dolžina/širina je pod 1,75. Je zelo rana in na bolezni odporna sorta, predvsem na rjo. Zaradi majhne vsebnosti amiloze, slabe konsistentnosti in velikega indeksa lepljivosti, ki jo določa vošččen - waxy tip endosperma, je popolnoma neprimerna za prehrano. Semena se pri 10 do 15 minutnem kuhanju popolnoma razkuhajo, postanejo lepljiva in neuporabna. Zaradi navedenih lastnosti je bila predmet genske spremembe. Na Univerzi v Vidmu (Udine) so, s posredno metodo z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*, uspeli v omenjeno sorto vnesti gen, katerega produkt, encim β -glukozidaza se izraža v osrednjem endospermu. Transgeni riž sorte CR W3 se od netransgene sorte loči samo po sintezi encima β -glukozidaze. V vseh ostalih lastnostih je popolnoma enak sorti CR W3. Transgeni riž je izključno namenjen farmakološki pridelavi učinkovine za medicinske potrebe oz. zdravljenje in ne za prehrano, saj že osnovne lastnosti sorte to ne dopuščajo (Patti in sod., 2012).

Rekombinantni encim β -glukozidaza se uporablja za nadomestno zdravljenje genske avtosomno-recesivne Gaucherjeve bolezni. Ta način dedovanja se pojavlja pretežno pri presnovnih boleznih, med katerimi je tudi Gaucherjeva bolezen. To je redka genska okvara, ki prizadene približno 40.000

prebivalcev na svetu, 3.000 v Evropi in v Sloveniji je trenutno registriranih 19 bolnikov tipa 1 od treh poznanih. Pri tipu 1 je zmanjšana encimska aktivnost, znaki so anemija, trombocitopenija, levkopenija, povečana jetra in vranica, zmanjšanje kostne mase se lahko pokažejo šele v odrasli dobi. Pri tipu 2 se poleg povečanja jeter in vranice pojavijo še okvare centralnega živčnega sistema, zaradi česar bolniki redko živijo več kot dve leti. Pri tipu 3 so znaki podobni kot pri tipu 1, prisotne so tudi nevrološke motnje, ki se z leti večajo. Močno prevladuje tip 1, nevropatološki simptomi se pojavljajo le pri 5-10 % bolnikov. Pri vseh treh oblikah je prisotno pomanjkanje encima glukocerebrozidaze (β -glukozidaze), kar se odraža v nepravilni razgradnji maščobe glukocerebrozida, ki je produkt odmrlih rdečih in belih krvnih celic. Zaradi odsotnosti oz. nefunkcionalnosti encima glukocerebrozidaze se glukocerebrozid ne razgrajuje, ampak se kopiči v celicah - v tkivnih makrofagih. Ko je nerazgrajene maščobe v celicah zelo veliko, se te povečajo, postanejo okrogle in niso več sposobne opravljati svojih nalog - imenujejo se Gaucherjeve celice. Največ jih je v kostnem mozgu, vranici in jetrih, kjer onemogočajo normalno delovanje teh organov. To ima za posledico povečanje in odpoved jeter, vranice, slinavke in težave z okostjem. Zelo pomembno je, da se zdravljenje začne čim prej v otroštvu (Grabowski in sod., 1998). Bolezen se ne da ozdraviti, možni so trije načini zdravljenja, presaditev kostnega mozga, genska terapija in encimska terapija, ki se izvaja tudi v Sloveniji (Grabowski in sod., 1995; Benedik-Dolničar in Kitanovski, 2003). Terapija z injekcijami, ki nadomeščajo pomanjkanje encima je za pacienta nujna in doživljenjska ter draga. Zaradi visokih stroškov je terapija nedosegljiva pacientom iz številnih afriških, azijskih, južnoameriških, srednjevzhodnih in evropskih držav. Zato se iščejo načini za nadomestno zdravljenje.

3.2 Pridobivanje encima β -glukozidaze in nadomestna encimska terapija

Prvi klinični poskusi nadomestne encimske terapije so se pojavili sredi 70. let, v splošni uporabi pa je od leta 1991. Encim β -glukozidaza se je do leta 1994 pridobival iz človeških placent, sedaj se v Evropi pridobiva z rekombinantno celično linijo ovarijev kitajskih hrčkov, v katere je bil vnešen človeški gen za glukocerebrosidazo. Povprečni strošek zdravljenja je 200.000 evrov letno z minimalno dozo, ki pa vsem pacientom ne zadostuje (Pentchev in sod., 1973; Reddy in sod., 1985). Večkrat se zgodi, da je zaradi okvar bioreaktorjev ali mutacij celičnih linij, na trgu pomanjkanje encima, kar ima za posledico zmanjšanje minimalno potrebnih doz. Zdravljenje oz. potreben nivo encima v organizmu se vzdržuje z intravenoznim dodatkom vsak drugi teden. Leta 2012 je ameriška administracija za hrano in zdravila (FDA) odobrila pridobivanje encima, prav tako v bioreaktorju, s celično linijo gensko spremenjenega korenja (Morrow, 2012). Da bi se zadostilo potrebnim letnim količinam encima za vse paciente, se s ponujeno gensko spremembo riža poskuša dvigniti proizvodnjo β -glukozidaze.

3.3 Opravljene raziskave z GS rižem v zaprtem sistemu in poskusi namernega sproščanja v okolje

V Italiji je bilo že opravljeno gojenje v rastlinjaku in pridobivanje oz. ekstrakcija encima β -glukozidaze na manjšem vzorcu semen ter čiščenje in priprava zdravila. Te preliminarne študije in raziskave so pokazale, da je sintetizirana in naložena β -glukozidaza zelo čista in zato enakovredna oz. primernejša za zdravljenje kot pridobljena z do sedaj uveljavljenim postopkom. Za klinično testiranje na večjem vzorcu in za pridobitev registracije zdravila ter potrditev stabilnosti izražanja lastnosti v okoljskih razmerah, bi bilo potrebno opraviti vsaj dveletno poskusno gojenje GS riža na prostem.

Zaradi negativnega javnega mnenja v Evropi, ki je proti sproščanju GSO v okolje, in dolgih postopkov pridobitve dovoljenja za gojenje na prostem, tega niso opravili v prvotno izbrani Italiji in ne v Španiji. Eden od razlogov, ki je preprečil namerno sproščanje GS riža je bil tudi ta, da se v obeh državah goji riž in da bi lahko prišlo do križanja. Drugi razlog pa je bil v dolgotrajnih

postopkih za pridobitev dovoljenja. V Italiji postopek traja 2 do 3 leta, v Španiji je krajši in traja 6 do 8 mesecev, v Sloveniji je najkrajši in traja 1,5 do 2 meseca. Zaradi tega se je poskušalo pridobiti dovoljenje pri nas. Riž se v Sloveniji ne prideluje in nima generativno kompatibilnih divjih sorodnikov ter vrst, s katerimi bi se lahko križal. Najbližja pridelava riža je v sosednji Italiji, ki je od izbrane lokacije oz. polja oddaljena približno 70 km. Na območjih, kjer se riž prideluje, se pojavljajo divji tipi s katerimi se kultiviran riž lahko križa. Slovenija ni pridelovalno območje riža, zato pri nas niso prisotne kompatibilne endemične, spontane ali divje vrste, niti ne naravne ali gojene sorte, s katerimi bi se lahko GS riž križal.

Običajno so poskusna polja z GSR nižje rasti obdana z naravni fizičnimi pregradami, s pasom koruze ali industrijske konoplje, ki zraste tudi do 3 m in s tem zadrževalnim ukrepom se preprečuje genski prenos s cvetnim prahom. Riževa pelodna zrna se v običajnih okoljskih razmerah ne dvignejo višje od 1,5 m in prej omenjene fizične pregrade lahko delno varujejo pred širitvijo transgenega peloda (Jackson in Lyford, 1999; Song in sod., 2001; Song in sod., 2004).

3.4 Možnosti namernega sproščanja GSR v Sloveniji in obstoječe ovire

Vloga za namerno sproščanje GS riža je bila temeljito pripravljena po členih III. poglavja ZRGSO, Ur. l. RS 23/2005 in 21/2010. Manjkal ji je samo katastrski izpis za izbrano njivo. Pred uradno oddajo na MOP je bila vloga na MOP pregledana in pozitivno ocenjena. Izbrana 0,2 ha njiva je del 16 ha polja oz. kompleksa, ki je obdano z ograjo in urejeno je tudi namakanje, ki je potrebno v obdobju cvetenja riža in formiranja semen. Dostop na polje je možen samo zaposlenim in pooblaščenim osebam. To je fizični zadrževalni ukrep in razlog, razen urejenega namakanja, zakaj smo izbrali to njivo. Poskusno naj bi bilo posajenih 20 rastlin/m² oz. približno 40.000 rastlin/0,2 ha, kar bi zadoščalo za klinične študije in razvoj industrijskega načrta pridobivanja encima.

Preden smo zaprosili za katastrski izpis, smo o nameri seznanili občino v kateri se nahaja njiva. Večina slovenskih občin je podpisala peticijo Inštituta za trajnostni razvoj proti gojenju GSR na njihovem ozemlju. Izbrana lokacija je v eni od teh

občin in v lasti Sklada kmetijskih zemljišč in gozdov RS, katerega smo tudi obvestili, da nameravamo gojiti GS riž na njihovi njivi. Z obeh strani smo dobili odklonilni odgovor. S pogovori

na MOP in prisotnimi iz MKGP ter veljavnem nacionalnem Zakonu o ravnanju z GSO nismo uspeli, saj je bil močnejši občinski sklep in pravilnik Sklada kmetijskih zemljišč in gozdov RS.

4 ZAKLJUČEK

Ponesrečena izbira njive za katero sta bila lokalni, občinski sklep o razglasitvi območja brez GSO in pravilnik Sklada kmetijskih zemljišč in gozdov RS, ki zavezuje zakupnika, da ne bo sejal GSR, močnejša od nacionalnega zakona in verjetno edina ovira, zakaj gojenje GS riža pri nas ni uspelo. Čeprav so bile s predhodnim gojenjem v rastlinjaku simulirane naravne razmere pridelovanja v manjšem obsegu, je potrebno vsaj dve letno poskusno gojenje na prostem za potrditev

stabilnosti izražanja lastnosti v okoljskih razmerah in za pripravo programa širitve površin ter tehnološkega procesa pridobivanja zdravila. Približno 7 kg GS riža sintetizira in naloži v endospermu semen zadostno količino encima β -glukozidaze za celoletno intravenozno zdravljenje enega bolnika, kar bi bistveno pocenilo trenutne stroške zdravljenja in dostopnost zdravila v optimalni koncentraciji večjemu številu pacientov z Gaucherjevo boleznijo tipa 1.

5 LITERATURA

- Benedik-Dolničar M., Kitanovski L. 2003. Obravnava bolnikov z Gaucherjevo boleznijo tip 1. *Zdravstveni vestnik* 72: 701-704
- Directive 2001/18/EC of the European Parliament & of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms & repealing Council Directive 90/220/EEC
- Gebhard F., Smalla K. 1999. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 261-272, doi: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00581.x
- Grabowski G.A., Barton N.W., Pastores G., Dambrosia J.M., Banerjee T.K., McKee M.A., Parker C., Schiffmann R., Hill S.C., Brady R.O. 1995. Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann Intern Med* 122: 33-39, doi: 10.7326/0003-4819-122-1-199501010-00005
- Grabowski G.A., Leslie N., Wenstrup R. 1998. Enzyme therapy for Gaucher disease: the first 5 years. *Blood Rev* 9, 12: 115-133, doi: 10.1016/S0268-960X(98)90023-6
- Jackson S.T., Lyford M.E. 1999. Pollen dispersal models in quarternary plant ecology: assumptions, parameters, and prescriptions. *Botany Review* 65: 39-75, doi: 10.1007/BF02856557
- Jardine C.G., Hrudehy S.R., Shortreed J.H., Craig L., Krewski D., Furgal C., McColl R.S. 2003. Risk Management Frameworks for Human Health and Environmental Risks. *J. Toxicol Environ Health Part B* 6: 569-641, doi: 10.1080/10937400390208608
- Kinderlerer J. 1997. Tools of Regulation. Risk Assessment. Guide to Risk Assessment and Biosafety in Biotechnology. An Initiative of the United Nations Environment Programme: 78 p.
- Levin M. 1997. A Primer on Risk Assessment. Concepts and Theory of Risk Assessment. Guide to Risk Assessment and Biosafety in Biotechnology. An Initiative of the United Nations Environment Programme: 94 p.
- McColl S., Hicks J., Craig L., Shortreed J. 2000. Environmental Health Risk Management; A Primer for Canadians. NERAM, Institute for Risk Research: 210 p.
- Morrow T. 2012. Gaucher's disease treatment option rides on carrot cells' biologic power. *Manag Care* 21, 6: 45-46
- Patti T., Bembi B., Cristin P., Mazzarol F., Secco E., Pappalardo C., Musetti R., Martinuzzi M., Versolato S., Cariati R., Dardis A., Marchetti S. 2012. Endosperm-specific expression of human acid beta-glucosidase in a waxy rice. *Rice* 5, 34: 1-15, doi: 10.1186/1939-8433-5-34
- Pentchev P.G., Brady R.O., Hibbert S.R., Gal A.E., Shapiro D. 1973. Isolation and characterization of

- glucocerebrosidase from human placental tissue. *J Biol Chem* 248, 15: 5256-5261
- Pravilnik o oceni tveganja za delo z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu. Uradni list RS, št. 45/2004
- Pravilnik o oceni tveganja za namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje. Uradni list RS, št. 4/2006
- Pravilnik o oceni tveganja za dajanje izdelka, ki vsebuje gensko spremenjene organizme, na trg. Uradni list RS, št. 13/2006
- Reddy P.U., Murray G.J., Barranger J.A. 1985. Purification and characterization of bovine brain glucocerebrosidase. *Biochem Med.* 33, 2: 200-210, doi: 10.1016/0006-2944(85)90028-6
- Seidman L.A., Moore C.J. 1999. Basic laboratory methods for biotechnology: Textbook and laboratory reference. New Jersey, Prentice – Hall, Inc., 751 p.
- Song Z.P., Lu B.R., Chen J.K. 2001. A study of pollen viability and longevity in *Oryza rufipogon*, *O. sativa* and their hybrid. *International Rice Research Notes* 26: 31-32
- Song Z, Lu B.R., Chen J. 2004. Pollen flow of cultivated rice measure under experimental conditions. *Biodiversity and Conservation* 13: 579-590, doi: 10.1023/B:BIOC.0000009491.24573.1d
- Uredba o merilih za uvrstitev dela z gensko spremenjeni organizmi v zaprtem sistemu v varnostni razred in zadrževalnih ter drugih varnostnih ukrepov za posamezen varnostni razred (Uradni list RS, št. 71/2011).
- Wheelis M., Kapuscinski A.R., Spielman A., Istock C., Regal P.J., Ingham E., Ellstrand N., Letourneau D., Bhargava P.M., Klinger T., Akabas S. 1998. Manual for assessing ecological and human health effects of genetically engineered organisms. Edmunds Institute, Edmunds, Washington: 245 p.
- Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (Uradni list RS, št. 23/2005 – uradno prečiščeno besedilo, 21/2010)