نگرانی‌های پیرامون حضور ژن‌های نشانگر مقاوم به آنتی‌بیوتیک در گیاهان ترنسژنیک

Concerns about the presence of antibiotic resistance marker genes in transgenic plants

مقدمه

اولین نسل از گیاهان تغییر یافته ژنتیکی که در کشاورزی معرفی شدند از طریق به‌کارگیری ژن‌های نشانگر مقاوم به آنتی بیوتیک تولید شده‌اند. این ژن‌ها جهت تهیه وکتورهای انتقال ژن و/یا انتخاب گیاهان تغییر یافته ژنتیکی به‌کار می‌روند. در سال ۲۰۲۲، بیش از ۱۳۰ لاین از محصولات ترنسژنیک تجاری در دسترس، حاوی یک یا چند ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک از جمله *npt*II و *bla* بوده‌اند (ISAAA, 2022). ژن *npt*II از طریق سنتز پروئین‌های مهارکننده منجر به مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین می‌شود. از آنجاییکه در برخی از پروژه‌های انتقال ژن، این ژن‌ها در گیاه تجاری نهایی باقی می‌مانند، نظراتی مبنی بر نگرانی در مورد خطر احتمالی حضور آنها در محصولات تغییر یافته ژنتیکی وجود دارد. این نگرانی‌ها منجر به انجام بررسی‌های متعدد جهت مطالعه آثار زیان‌بار احتمالی مصرف این محصولات شده‌است. اگرچه امروزه روش‌های نوینی در تولید گیاهان تغییر یافته ژنتیکی عاری از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک ارائه شده است ولیکن ارائه نتایج این تحقیقات منجر به برطرف شدن شبهات موجود خواهد شد.

در سال ۲۰۰۹ سازمان ایمنی مواد غذایی اروپا (EFSA[1]) از انجمن‌های GMO[2] و BIOHAZ[3] درخواست کرد نظرات مشورتی خود را در مورد اثرات ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک در محصولات تغییر یافته ژنتیکی ارائه دهند (EFSA, 2009). مطالبی که در ادامه آمده است نتایج تحقیق و برخی گزارشات علمی موجود در پاسخ به برخی سوالات رایج در حوزه گیاهان تراریخت می‌باشد. به طور کلی چهار سوال اصلی پیرامون اثرات زیانبار ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک موجود در گیاهان ترنسژنیک بر سلامت انسان مطرح شده‌است:

۱- آیا ژن های مقاومت به خودی خود برای سلامتی انسان مضر هستند؟

ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هیچ تفاوتی با سایر ژن‌های موجود در گیاهان یا حیوانات ندارند و مانند DNA موجود در هر منبعی در مسیر روده هضم می‌شوند. همچنین مقدار ترنسژن بلع شده در مقایسه با DNA دریافت شده از سایر منابع گیاهی و حیوانی بسیار کم است. برای مثال گاوهای شیرده که با ذرت ترنسژنیک مقاوم به آفات، تغذیه می‌شوند مقدار ۵۷ میکروگرم DNA ترنسژن دریافت می‌کنند که در برابر میزان DNA دریافتی از سایر منابع که برابر با ۵۴ گرم در روز است بسیار ناچیز و برابر با $۱ * ۱۰^{-۶}$ می‌باشد (Aumaitre e al, 2002). در ذرت ترنسژنیک، ترنسژن ۰/۰۰۰۱ % از کل DNA را شامل می‌شود. در سال ۲۰۰۲ FDA[4] با در نظر گرفتن تمامی ترنسژن‌ها یا محصولات ترنسژنیک، آن‌ها را به طور کلی برای مصارف غذایی یا دارویی امن اعلام کرده‌است و برخی محققین نیز اثرات مخرب آن‌را حداقل و بسیار کم اعلام کرده‌اند (Jonas et al, 2001). بنابراین به نظر می‌رسد مصرف محصولات ترنسژنیک به خودی خود برای سلامتی انسان یا حیونات خطری نداشته باشد (Goldstein et al, 2005).

۲- آیا پروتئین‌های تولید شده بواسطه این ژن‌ها برای سلامتی انسان مضر هستند؟

ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها زمانی که در سلول‌های گیاهی بیان می‌شوند پروتیئن‌هایی را تولید می‌کنند که به همراه چند ده هزار پروتئین موجود در گیاهان که بخش بزرگی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند، تجزیه می‌شوند. پروتئین‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیکی که در پروژه‌های مهندسی ژنتیک گیاهان به کار می‌رود تفاوت بنیادی با سایر پروتئین‌های رژیم غذایی انسان ندارند و سمیتی برای انسان و حیوانات آزمایشگاهی نداشته و از نظر FDA برای استفاده در غذا و دارو و خوراک دام بدون مشکل هستند. این پروتئین‌ها توسط پپسین به سرعت قابل هضم بوده و همچنین حساس به حرارت هستند. پروتئین-های حاصل از ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از لحاظ بیوانفورماتیکی جهت وجود تشابه توالی با آلرژن‌ها نیز بررسی شده‌اند و بر اساس نتایج موجود، احتمال ایجاد حساسیت توسط ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک بسیار بعید است. برای مثال

[1] European Food Safety Authority
[2] Genetically Modified Organisms
[3] Biological Hazards
[4] Food and Drug Administration

ژن *npt*IIبرای استفاده در غذای انسان و دام و همینطور محصولات زیست فناور دارویی غیر سمی اعلام شده و تاثیرات حساسیت زا ندارد (Fuches et al, 1993). از سوی دیگر باید درنظر داشت که ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک که توسط سیستم‌های باکتریایی بیان می‌شود در سلول‌های گیاهی غیر فعال می‌شوند. همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک توسط باکتری‌های فلور روده نیز تولید می‌شوند بطوریکه در اثر استفاده انسان از آنتی‌بیوتیک، باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در روده زنده می‌مانند و تکثیر می‌شوند. بنابراین بشر در طی تاریخ با این ژن‌ها روبرو شده است ولیکن تابه حال اثر مخربی از چنین ژن‌هایی گزارش نشده است. به طور کلی از نتایج فوق می توان نتیجه گرفت که پروتئین‌های تولید شده از ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هیچ خطر گزارش شده ایی در برابر سایر پروتئین‌های مصرفی رژیم غذایی انسان ندارند (Goldstein et al, 2005).

۳- آیا ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک می‌توانند به باکتری‌ها منتقل شوند و تاثیر نامطلوب در روند درمان‌های ضد میکروبی بگذارند؟

باکتری‌های مستعد هنگامی که در تماس با ژن‌های خارج سلولی قرار می‌گیرند، می‌توانند از طریق فرآیندی به نام انتقال افقی ژن (HGT[5]) در معرض تبادل مواد ژنتیکی قرار گیرند. HGT روشی است که در آن باکتری‌ها قادر به جذب مواد ژنتیکی از محیط اطراف به عنوان مثال، خاک، یا موجودات غیر مرتبط به درون خود هستند. ترنسفورماسیون فرایند خاصی از HGT است که در آن یک سلول باکتری می‌تواند DNA یا RNA خارج سلولی را از محیط بگیرد که امکان تغییر بالقوه در ژنوتیپ را فراهم می‌کند، این امر ممکن است تکامل را تسریع کند (Bertolla & Simonet, 1999). بنابراین، مواد ترنسژن محصولات تغییر یافته ژنتیکی که در خاک آزاد شده‌اند، ممکن است از طریق ترنسفورماسیون جذب باکتری‌های خاک شوند.

انتقال ژن به صورت طبیعی شامل چهار مرحله است: DNA خارج سلولی به سطح سلول متصل می‌شود، سلول DNA را از طریق دیواره سلولی یا غشای سلولی جذب می‌کند، DNAدر ژنوم باکتری وارد و در نهایت، DNA خارجی بیان می‌شود. برای اینکه ترنسفورماسیون‌های ژنتیکی رخ دهد، باید شرایط مساعدی فراهم باشد. این شرایط شامل وجود DNAهای زیستی قابل دسترس برای جذب در خاک و حضور سلول‌های مستعد باکتری برای انجام ترنسفورماسیون می‌باشد. میکروب‌ها در شرایط تنش محیطی مانند کمبود مواد مغذی، که آن‌ها را وادار به جذب املاح خارج سلولی از محیط اطراف خود می‌کند، برای جذب DNA خارجی مناسب هستند. علاوه بر این، مستعد بودن جهت ترنسفورماسیون به تشابه بالا بین توالیDNA خارجی و ژنوم میکروبی بستگی دارد (EFSA 2009)، بطوریکه مطالعات نشان می‌دهد کاهش تشابه بین دو توالی ترنسژن و ژنوم میزبان (از ۲۰۰ الی ۵۰۰ جفت باز به ۵۰ جفت باز) می‌تواند منجر به کاهش انتقال به میزان ۱۰٪ شود (Bertola and Simonet 1999). علاوه بر جذب ترنسژن توسط میکروب‌ها از طریقHGT ، ترنسژنی که پس از لیز سلولی آزاد می‌شوند ممکن است به عنوان یک منبع مغذی (به عنوان مثال، کربن، نیتروژن و فسفر) برای میکروب‌های مجاور عمل کنند. مطالعات نشان داده‌اند که وقتی DNA جذب می‌شود، علاوه بر اینکه به‌عنوان منبع مغذی عمل می‌کند، می‌تواند برای ترنسفورماسیون طبیعی و ترمیم DNA ژنومی به کار روند. انتقال توسط موبینگی مکانیسم دیگری است که به ماندگاری DNA یا RNA در خاک کمک می کند. اسیدهای نوکلئیک که تجزیه یا جذب نمی شوند به فضاهای منافذ پر از آب رفته و تا زمانی که به سلول های مستعد برسند از نظر بیولوژیکی فعال باقی می مانند. چندین مطالعه نشان داده‌اند که با آزاد شدن DNA از محصولات، در دسترس بودن آن در خاک طی ۱۰ تا ۲۰ روز ابتدا به طور تصاعدی کاهش می یابد و سپس ثابت می شود. کاهش سریع در دسترس بودن DNA در خاک به دلیل جذب DNA به محل‌های اتصال خاک است که می‌تواند DNA را از تخریب سریع محافظت کند. این امر نشان دهنده شانس کمتر برای انتقال ژنتیکی DNA آزاد شده قدیمی است که در خاک وجود دارد ولی تجزیه نشده است. تا کنون مطالعات آزمایشگاهی متعددی در مورد انتقال مواد ژنتیکی تراریخته به جوامع باکتریایی انجام شده است. استفنسن و همکارانش در سال ۲۰۱۵ حضور *npt*II در باکتری‌ها را در طول زمان، در ماتریس‌های خاکی متعدد (به عنوان مثال، خاک متراکم که سالانه با فضولات حیوانی غنی می‌شود، خاک غنی نشده با محتوای رس بالا و خاک غنی نشده با محتوای ماسه بالا) ردیابی کردند. نتایج نشان داد که چندین جدایه یاکتری در خاک نسبت به کانامایسین بسیار مقاوم بودند، هیچ جدایه‌ای حاوی ژن *npt*II تراریخته نبود (Steffensen 2015). این نتایج همچنین با یافته های مطالعه Smallaو همکارانش مطابقت داشت (1993)، که نتوانستند از میان جدایه‌های جمع آوری شده از مزارع ترنسژنیک، سویه

[5] Horizontal Gene Transfer

مقاوم به کانامایسین حاوی ژن *npt*II را شناسایی کنند. داده ها نشان داد که ژن‌های دیگری هستند که بخش عمده‌ای از مقاومت به کانامایسین را در جدایه‌های محیطی ایجاد می‌کنند و یا اینکه رویدادهای انتقال ژن بین محصول ترنسژنیک و باکتری‌ها با احتمال پایین رخ می‌دهند. از آنجاییکه تنها کمتر از ۱۰ ٪ از باکتری‌های موجود در خاک را می‌توان در یک محیط آزمایشگاهی رشد داد، توانایی تعیین شیوع واقعی انتقال ژن بین محصولات تراریخته و میکروب‌های خاک با محدودیت مواجه می شود (Goldstein et al, 2005).

از سوی دیگر، انتقال DNA از گیاهان ترنسژنیک به باکتری‌ها، در صورت وقوع، در مقایسه با انتقال ژن بین باکتری ها، با نرخ پایینی رخ می دهد. تجزیه و تحلیل‌های متاژنومی اخیر در کل جمعیت‌های باکتریایی (از جمله باکتری‌های غیرقابل کشت) نشان داده‌اند که عوامل ایجاد کننده مقاومت کانامایسین، نئومایسین و استرپتومایسین در همه محیط‌های مورد بررسی وجود دارد. چنین ژن‌های مقاومتی ممکن است از این مخزن محیطی انتخاب شده و در بین باکتری‌ها منتشر شوند. بسیاری از ژن‌های نشانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گیاهان ترنسژنیک مانند *npt*II منشأ باکتریایی دارند. این ژن‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک به میزان مختلف در گونه‌های مختلف، جدایه‌ها و محیط‌های مختلف، در باکتری‌های طبیعی وجود دارند. باید توجه داشت که وجود آنتی بیوتیک‌ها و استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در محیط‌های مختلف از عوامل کلیدی در انتخاب و انتشار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. کانامایسین و نئومایسین هر دو توسط WHO به عنوان یک "ضد میکروب بسیار مهم" برای سلامت انسان طبقه بندی می‌شوند. همچنین کانامایسین به عنوان یک داروی مهم برای درمان عفونت-های سل مقاوم به دارو توصیه می‌شود. افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم به دارو با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مهم مانند کانامایسین در سراسر جهان، دلیلی برای نگرانی جهانی است و میبایست اقدامات موثری در کنترل هرچه بهتر میزان استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و جلوگیری از آزادسازی این ترکیبات در طبیعت مانند کنترل رهاسازی پساب کارخانه‌ها صورت گیرد. از مطالب فوق چنین نتیجه گیری می‌شود که عوامل مهم‌تر و بیشتری در ایجاد مقاومت دارویی وجود دارد که میبایست کنترل شونددر واقع ژنi های مقاوم به آنتی بیوتیکموجود در گیاهان ترنسژنیک در ایجاد چنین مقاومتی دخیل نیست و یا سهم بسیار ناچیزی دارد (EFSA 2009).

۴- آیا ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک می توانند در نتیجه ورود به سلول های انسانی آسیب وارد کنند؟

طبق گزارشات، برخی قطعات ژن‌های گیاهی در سلول‌های پوششی دستگاه گوارش و سلول‌های سیستم ایمنی حیوانات (گلبول های سفید) مشاهده شده‌اند، ولیکن تاکنون گزارشی در مورد ادغام این قطعات در DNA حیوانات و یا بیان آنها در سلول‌های حیوانی یا انسانی ارائه نشده‌است. چرا که تمامی مواد غذایی دریافتی و همینطور باکتری‌های روده حاوی DNA بوده و سلول‌های انسانی همواره با آنها در تماس هستند با این وجود هیچ مدرکی مبنی بر ورود همیشگی و منظم ژن‌های دست نخورده گیاهی یا باکتریایی به درون سلول‌های انسانی وجود ندارد. باید توجه داشت که ژن‌های مقاومت هیچ کاربردی در بدن انسان ندارند بنابراین توجیهی برای ورود این ژن‌ها به ژنوم وجود ندارد، اگرچه در طی تکامل بشر هیچگونه ژنی حتی ژن‌هایی که قابلیت تولید مواد ضروری برای انسان دارند نیز از منابع گیاهی توسط سلول‌های انسانی دریافت نشده اند. Schubbert در بررسی آزمایشگاهی خود در سال های ۱۹۹۴ و ۱۹۹۷ نشان داد که زمانی که مقادیر بالایی از DNA باکتری یا باکتریوفاژ به موش‌های آزمایشگاهی خورانده می‌شود، بسیاری از سلول‌های این حیوان حاوی قطعاتی از DNA دریافتی می‌شوند. این سلول‌ها در واقع با انجام عمل فاگوسیتوز این قطعات را دریافت می‌کنند. در طی عمل فاگوسیتوز، سلول بسیاری از مواد اطراف خود از جمله DNA را می‌بلعد ولیکن این قطعات وارد ژنوم سلول نمی شوند. از سوی دیگر الگوهای متیلاسیون در DNA گیاهی و حیوانی متفاوت است. قطعات DNA باکتریایی که به سلول گیاهی وارد می شود نیاز به الگوهای اصلاحی دارند که این امر در نهایت منجر به تحریک فاگوسیتوز می شود (Schubbert et al,1664; 1997). به طور خلاصه اگرمقادیر بالایی از DNAگیاهان ترنسژنیک وارد بدن انسان شود احتمال دارد وارد سلول‌ها شود ولی تا کنون شواهدی مبنی بر ورود این ژن‌ها به ژنوم انسان و تکثیر آن مشاهده نشده‌است. بنابراین ورود ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از منابع گیاهی به سلول‌های انسانی و آسیب آنها به سیستم ایمنی بسیار بعید است.

منابع

1. Aumaitre, A., Aulrich, K., Chesson, A., Flachowsky, G., Piva, G. 2002. New feeds from genetically modified plants: substantial equivalence, nutritional equivalence, digestibility, and safety for animals and the food chain. Livest Prod Sci 74, 223– 238. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301622602000167?via%3Dihub
2. Bertolla, F., Simonet, P. 1999. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. Res Microbiol 150, 375– 384. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10466405/.
3. EFSA. 2009. Consolidated presentation of the joint scientific opinion of the GMO and BIOHAZ panels on the "Use of antibiotic resistance genes asmarker genes in genetically modified plants" and the scientific opinion of the GMO panel on "consequences of the opinion on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants on previous EFSA assessments of individual GM plants", EFSA J. 1108. 1–8.
4. Fuchs, R.L., Ream, J.E., Hammond, B.G., Naylor, M.W., Leimgruber, R.M., Berberich, S.A. 1993. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (npt-II) protein. Bio/Technology 11, 1543– 1547. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7764244/
5. Goldstein, D.A., Tinland, B., Gilbertson, L.A., Staub, J.M., Bannon, G.A., Goodman, R.E., McCoy, R.L., Silvanovich, A. 2005. Human safety and genetically modified plants: a review of antibiotic resistance markers and future transformation selection technologies. Journal of Applied Microbiology, 99: 7-23. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15960661/
6. ISAAA. 2022. Genes list. https://www.isaaa.org/gmapp roval datab ase/genes list/defau lt.asp. Accessed 18 March 2022.
7. Jonas, D.A., Elmadfa, I., Engle, K.H., Heller, K.J., Kozianowski, G., Konig, A., Muller, D., Narbonne, J.F. W, Wackernagel., J. Kleiner. 2001. Safety considerations of DNA in food. Ann Nutr Metab 45, 235– 254. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11786646/
8. Schubbert, R., Lettmann, C., Doerfler, W. 1994. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. Mol Gen Genet 242, 495– 504. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8121408/
9. Schubbert, R., Renz, B., Schmitz, B.,Doerfler, W. 1997. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. Proc Natl Acad Sci USA 94, 961– 966. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9819049/
10. Smalla, K., Van Overbeek, L.S., Pukall, R.,Van Elsas, J.D. 1993. Prevalence of npt II and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. FEMS Microbiology Ecology, 13, 47– 58. https://academic.oup.com/femsec/article/13/1/47/559731
11. Steffensen, A.E. 2015. Prevalence of nptII genes in three differ-ent soil fields in Tromsø. Master's thesis, UiT Norges arktiske universitet.
12. Un Jan Contreras, S., Gardner, C.M. 2022. Environmental fate and behaviour of antibiotic resistance genes and small interference RNAs released from genetically modified crops. J Appl Microbiol. Nov;133(5):2877-2892. doi: 10.1111/jam.15741. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35892194/