

*Aktuelne teme/
Current topics*

**Correspondence to:
Ivana Kavečan**

Univerzitet u Novom Sadu,
Medicinski fakultet
University of Novi Sad, Faculty of
Medicine
Hajduk Veljkova 3
21000 Novi Sad, Srbija
tel. 021 4880444
email: ivana.kavecan@mf.uns.ac.rs

**MOLEKULARNO GENETSKA ISPITIVANJA
U KLINIČKOJ PRAKSI DANAS
MOLECULAR GENETIC ANALYSES IN
CLINICAL PRACTICE NOWADAYS**

Milan Obrenović¹, Ivana Kavečan^{1,2}, Boris Privrodski¹,
Biljana Bojadžijeva Stojanoska³

¹ Institute for Children and Youth Health Care of Vojvodina, Novi
Sad, Serbia

² University of Novi Sad, Faculty of Medicine, Novi Sad, Serbia

³ Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, University St. Cyril
and Methodius, Skopje, Republic of Macedonia

Ključne reči

genetske analize; dijagnostičko testiranje;
preimplantaciona genetska dijagnostika;
skrining

Key words

genetic analysis; diagnostic testing;
preimplantation genetic diagnosis;
screening

Sažetak

Razvoj genetskih metoda iz osnova menja pristup pacijentu i uvodi novo poglavlje u razvoju medicine. Genetska ispitivanja danas više nisu ograničena samo na retke bolesti, već se mogu sprovesti i za kompleksne bolesti, čime je omogućen individualizovan pristup pacijentu. Primena kliničkih genetskih ispitivanja obuhvata: novorođenački skrining, dijagnostičko ispitivanje, ispitivanje nosilaca mutacija, prediktivna ispitivanja, presimptomatsko ispitivanje, farmakogenetska ispitivanja. Povećana je i dostupnost različitih metoda molekularne dijagnostike kao i njihova klinička primena. Precizna molekularna dijagnostika ima jasnu prednost i omogućava bolji pristup i donošenje preciznijih odluka u dijagnostici i lečenju. Neophodno je usvajanje novih saznanja kako bi se izbegle nejasnoće pri davanju informacija oboelim osobama i članovima njihovih porodica.

UVOD

Razvoj genetskih metoda danas doseže tačku na kojoj je moguće odrediti genetske varijante pacijenata sa visokom preciznošću i smanjenim troškovima što iz osnova menja pristup pacijentu i uvodi novo poglavlje u razvoju medicine. Sekvenciranje naredne generacije je otvorilo mogućnost istovremene analize velikog broja sekvenci genoma ali je i donelo neizvesnost pri interpretaciji obilja podataka. Starije, u dijagnostičkoj praksi potvrđene molekularno genetske metode još uvek zauzimaju svoje mesto u dijagnostici naročito u delovima sveta gde sekvenciranje naredne generacije nije široko dostupno. Srbija se trenutno nalazi na pola puta prema razvijenom svetu u pogledu genetskih tehnologija 21. veka, sekvenceri naredne generacije se polako nabavljaju ali još uvek nije došlo do njihove pune primene u dijagnostici (1,2).

SVRHA I OBIM GENETSKOG ISPITIVANJA

Genetska ispitivanja danas više nisu ograničena samo na retke bolesti. Razvoj tehnologije je omogućio primenu genetskih ispitivanja ne samo kod retkih bolesti već i za kompleksne bolesti i individualizovan pristup pacijentu.

Primena kliničkih genetskih ispitivanja obuhvata:

Novorođenački skrining. Ciljana ispitivanja visoko penetrantnih recesivnih oboljenja poput fenilketonurije i cistične fibroze.

Dijagnostičko ispitivanje. Ispitivanje radi potvrde sumnje na bolest ili diferencijalne dijagnostike kod već izražene simptomatologije npr. kod talasemija.

Ispitivanje nosilaca mutacije. Ciljano ispitivanje asimptomatskih potencijalnih nosilaca mutacija koje uzrokuju recesivna oboljenja. Primeri su Tej Saksosa bolest, i cistična fibroza.

Prediktivna ispitivanja. Ispitivanje genetskih varijanti koje uzrokuju ili su udružene sa bolestima koje se ispoljavaju najčešće u odraslom životnom dobu. Kardiovaskularna oboljenja, karcinomi, dijabetes.

Presimptomatsko ispitivanje. Ispitivanje genetskih varijanti koje uzrokuju bolesti sa učestalom pojavom u porodici i ispoljavaju se obično u odraslom životnom dobu. Alchajmerova bolest, Hantingtonova bolest.

Farmakogenetska ispitivanja. Ispitivanje genetskih varijanti kod pojedinaca kojima je potrebna određena medikamentna terapija u cilju pravilnog izbora leka i doziranja. Najčešće se vrše kod terapijske primene karbamazepina, varfarina i abacavira.

Izbor vrste i obima genetskog ispitivanja zavisi od individualnih okolnosti ispitanika, trenutnog zdravstvenog stanja, porodične istorije i dobi. Sekvenciranje kompletnog genoma može otkriti status nosioca za veliku većinu retkih bolesti ali je ovakav pristup nepraktičan za skrining. I pored dostupnosti naprednih tehnologija ispitivanje treba suziti, kad god je to moguće, na gene kandidate na osnovu fenotipa pacijenta, naročito u slučaju prethodno utvrđenih genetskih varijanti kod obolelih srodnika⁽³⁾.

TEHNOLOGIJE GENETSKIH ISPITIVANJA

Genetsko ispitivanje se može izvršiti direktnim putem, identifikujući genetsku varijantu koja uzrokuje bolest ili indirektnim putem kada se na osnovu podataka iz genoma koji se ne odnose na mutaciju donose zaključci. Danas preovlađuju direktna ispitivanja osim u nekim slučajevima kada se indirektnim ispitivanjem dolazi do zaključaka koji olakšavaju dalje ispitivanje direktnim putem (tabela 1). Indirektnim postupkom određivanja kratkih uzastopnih ponovaka (STR, *engl. Short Tandem Repeat*) se omogućuje razdvajanje fetalne i majčine slobodne dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) kod neinvazivne prenatalne dijagnostike (NIPT, *engl. Noninvasive prenatal testing*) i potvrđuje se

ranje genoma i egzoma. Različite tehnike imaju različitu analitičku validnost odnosno analitičku senzitivnost koja se odnosi na udeo lažno negativnih analiza i analitičku specifičnost koja se odnosi na udeo lažno pozitivnih analiza. Analitičku validnost pojedinih tehnika je neophodno razmotriti pri izboru testa i interpretaciji rezultata.

Ciljana detekcija specifičnih mutacija. Ciljana reakcija lančanog umnožavanja (PCR, *engl. Polymerase Chain Reaction*). Amplifikacija u kombinaciji sa restrikcionom digestijom, hibridizacijom ili drugim oblikom detekcije mutacije je jeftin i robustan metod dijagnostike. Koristi se danas npr. za farmakogenetska ispitivanja mutacija Lajdenovog faktora i kod određivanja ekspanzije tripleta kod sindroma fragilnog X.

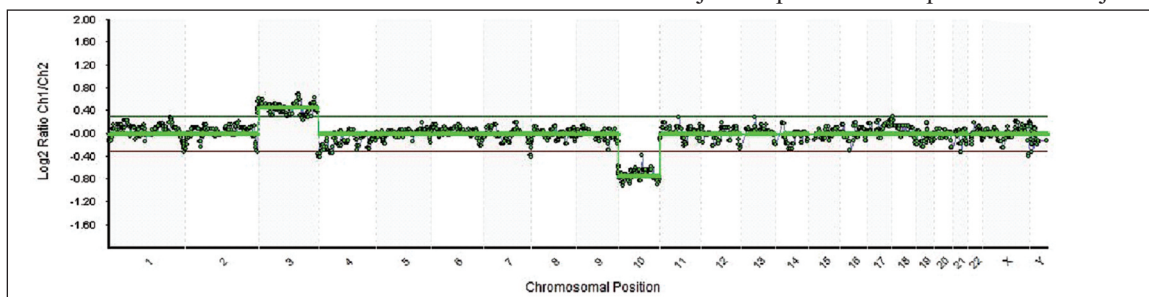
Sangerovo sekvenciranje. Ovaj vid sekvenciranja je „zlatni“ standard za detekciju tačkastih mutacija i malih genomskih promena, strukturne promene genoma nije moguće otkriti na ovaj način. Koristi se i kao potvrda rezultata sekvenciranja naredne generacije (NGS, *engl. Next-generation sequencing*). Tehnika ima visoku analitičku validnost koja opada sa povećanjem broja nukleotida analizirane sekvence⁽⁴⁾.

Tabela 1. Osnovne karakteristike najčešće korišćenih metoda u molekularno genetskoj dijagnostici

	Ciljani PCR	Sangerovo sekvenciranje	SNP mikronizovi	Komparativna Genomska hibridizacija	MLPA	Sekvenciranje naredne generacije
Uobičajene tačkaste mutacije	+	+	+			+
Retke tačkaste mutacije	+	+				+
Varijante broja kopija			+	+	+	+
Uniparentalna dizomija				+		
Ekspanzije ponovaka	+				+	
Analitička senzitivnost	>98%	>98%	<80%	80-98%	>98%	<80%
Analitička specifičnost	>98%	>98%	<80%	80-98%	>98%	<80%
Prosečno vreme izdavanja rezultata	Do nedelju dana	Nedelju do mesec dana	Do nedelju dana	Nedelju do mesec dana	Nedelju do mesec dana	Duže od mesec dana

adekvatna amplifikacija DNK iz jedne ćelije u procesu preimplantacione genetske dijagnostike poređenjem STR embriona i roditelja. Direktno metode koje se danas najčešće koriste su ciljana detekcija specifičnih mutacija, Sangerovo sekvenciranje, komparativna genomska hibridizacija, multipla ligaciono-zavisna amplifikacija proba i sekvenci-

Komparativna genomska hibridizacija. Ovom tehnikom se upoređuje DNK ispitanika sa komplementarnom DNK nanesenom na slajdu (genski čip), dizajnirane probe odgovaraju ili pojedinačnim poliformizmima nukleotida (SNP, *engl. Single-nucleotide polymorphism*) ili varijantama broja kopija. Prednost ove tehnologije je što se mogu dizajnirati paneli sa suspektim mutacijama za pojedine



Slika 1. Nebalansirana translokacija (3;10), trofoektoderma blastociste embriona. Microarray metodologija u postupku preimplantacionog skrininga urađenog na Institutu za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine, Novi Sad.

grupe bolesti (karcinomi, retinalne degeneracije, bolesti sa pojavom u ranom životnom dobu) ili na primer za sve hromozome što se koristi u preimplantacionom genetskom skriningu (5). Preimplantacioni genetski skrining je analiza jedne ili više ćelija embriona dobijenog postupkom in vitro fertilizacije, analiza predstavlja selekciju euploidnih embriona za dalji postupak vantelesne oplodnje (slika 1).

Multipla ligaciono-zavisna amplifikacija (MLPA, engl. Multiplex ligation-dependent probe amplification). Koristi se za određivanje varijanti broja kopija, metilacioni status gena i potvrdu strukturnih anomalija otkrivenih komparativnom genomskom hibridizacijom, u većini slučajeva MLPA ne može da utvrdi balansirane rearanžmane (inverzije i balansirane translokacije).

Sekvenciranje naredne generacije. Istovremeno i masivno paralelno sekvenciranje velikog broja gena je odlika sekvencera naredne generacije. Na ovaj način omogućeno je sekvenciranje celog genoma ili celog egzoma. Realno je za pretpostaviti da će ova tehnologija prevladati u budućnosti genetskih ispitivanja. Sekvenciranje naredne generacije pronalazi svakim danom sve veću kliničku primenu. Trenutni problemi vezani za ovu tehnologiju su pre svega teškoće u interpretiranju velikog broja podataka i potreba za relativno velikim brojem uzoraka da bi analiza bila ekonomski isplativa. Danas se ova metodologija koristi najčešće za genetski nejasne slučajeve. Očekuje se da se u bliskoj budućnosti i ovaj vid tehnologije suzi na panele sa genima kandidatima za određene grupe bolesti. Kada se uzmu u obzir analitički i ekonomski aspekti sekvenciranja naredne generacije kao i potreba da se rezultati eventualno potvrde drugim metodama jasno je da ovaj vid sekvenciranja nije prvi korak u diferencijalnoj dijagnostici genetskih stanja mada bi to u nekom momentu u budućnosti mogao postati (6,7).

KLINIČKI ASPEKTI MOLEKULARNO GENETSKIH ISPITIVANJA

Tokom proteklih godina, genetski determinisani uzroci oboljenja u kliničkoj praksi su progresivno u porastu što se najviše odnosi na pedijatrijsku praksu. Povećana je i dostupnost različitih metoda molekularne dijagnostike kao i njihova klinička primena. Precizna molekularna dijagnostika ima jasnu prednost i omogućava bolji pristup i donošenje preciznijih odluka u dijagnostici i lečenju.

Iako je u ovom momentu verovatno još rano da se razmatra uključivanje molekularnih testova u rutinsku procenu svakog bolesnika, to svakako u perspektivi postoji kao mogućnost, budući da bi svaki lekar trebao da bude sposoban da adekvatno razume značenje molekularno dijagnostičkih analiza.

Molekularno-genetska dijagnostika je ranije više bila zastupljena za dijagnostiku i rešavanje retkih stanja, kao npr. razvojni defekti i nasledni poremećaji. U novije vreme, shvaćen je genetski doprinos i za dijagnostiku, procenu i lečenje uobičajenih i relativno čestih oboljenja kao što su gojaznost, hipertenzija, osteoporozna i druga. U određenim slučajevima, molekularno-genetska dijagnostika ima jasnu prednost i omogućava bolje usmeravanje dijagnostike, lečenja i medicinskog praćenja budući da utiče na terapijske odluke, prevenciju komplikacija i tačno genetsko savetovanje obolelih pojedinaca i članova porodice. Ne treba

zanemariti da genetsko ispitivanje nije svemoguće, niti je nepogrešivo i da ima tehnička ograničenja, te bi se trebalo sprovoditi samo kada postoji visoka klinička sumnja i kada je korist genetskog testa jasna. Razvojem molekularno-genetskih testova, postalo je očigledno da većina alelnih varijanti na individualnom genomu nema neposredno jasan funkcijski značaj, te stoga, nalaz varijacija sekvenci na genima kandidatima za određene bolesti treba uvek razmatrati u sklopu biološke relevantnosti.

Bilo koji dijagnostički postupak koji se zasniva na analizi uzorka DNK, RNK, hromozoma ili proteina sa ciljem detekcije genotipova povezanih sa naslednim poremećajima, može se smatrati genetskim testom. Glavna korist genetskog testa je omogućavanje specifične i precizne (molekularne) dijagnostike. Važne dodatne koristi proizilaze iz dijagnostičke preciznosti, kao i poboljšanog individualnog praćenja, mogućnosti pružanja specifičnog individualnog tretmana, boljeg predviđanja odgovora na lečenje i sprečavanje komplikacija. Druge prednosti molekularne dijagnoze uključuju jasnije predviđanje transmisije naslednih karakteristika na potomstvo i odgovarajuću opreznost kod članova porodice koji su u riziku.

Npr. Identifikacijom RET mutacije kod bolesnika s medularnim karcinomom tireoideje omogućuje se rano prepoznavanje potencijalno zahvaćenih članova porodice i bolja kontrola bolesti.

S druge strane, genetska ispitivanja mogu imati i nekoliko potencijalnih rizika. Među njima, rizici se najviše odnose na potencijalno kršenje etičkih, moralnih i pravnih načela. Da bi se izbegli takvi rizici, bitno je pre i posle sprovođenja molekularno-genetskih analiza obezbediti odgovarajuće genetsko savetovanje, omogućavajući time da pacijent razume prirodu genetskog testiranja, prednosti i ograničenja, kao i moguće posledice molekularne dijagnoze u ličnim i porodičnim sferama, uzimajući u obzir društvene i kulturne kontekste pojedinca. Takođe, pre svakog testiranja, izuzetno je važno tražiti i dobiti potpisanu saglasnost od strane pacijenta ili zakonskog zastupnika kojom se potvrđuje da su jasno objašnjene i shvaćene sve date informacije tokom savetovanja. Ove mere predostrožnosti su naročito važne kada molekularno genetska dijagnoza nosi teško opterećenje u smislu prognoze. Npr. saznanje da je osoba nosilac mutacije tumor supresorskog gena TP53, lokalizovanog na hromozomu 17 (17p13.1) koji je povezan sa rizikom onkogenog potencijala, može kod te osobe i članova porodice dovesti do prekomerno povećane anksioznosti.

Kao i u svim aspektima odnosa lekar-pacijent, važna je i zaštita poverljivosti genetskog identiteta pojedinca. Ostali potencijalni rizici genetskog testiranja proizilaze iz prirode primenjenog laboratorijskog testa kao što su tehnička ograničenja, greške u tumačenju (npr. negativni rezultat u analizama mutacija usmerenih na hot spot mesta kandidata gena ne isključuju mogućnost oštećenja introna u ostalim delovima gena). Trenutno, genetska ispitivanja su primenljiva kada je klinička sumnja visoka i kada je prednost molekularne dijagnoze nedvosmislena. Svaka primena genetskog testa mora biti individualna odluka ispitivane osobe ili zakonskog zastupnika.

ZAKLJUČAK

Molekularno genetske analize su sve više dostupne u kliničkoj praksi obzirom na intenzivan razvoj genetskih istraživanja i brzu implementaciju tehnologija u kliničku praksu. Sekvenciranjem naredne generacije omogućuje se sveobuhvatno i relativno brzo genetsko ispitivanje koje je često veoma teško interpretirati zbog obilja podataka. Starije molekularno genetske metode zadržavaju svoje mesto u dijagnostici u delovima sveta gde sekvenciranje naredne

generacije nije široko dostupno. Neophodno je usvajanje novih saznanja kako bi se izbegle nejasnoće pri davanju informacija obolelim osobama i članovima njihovih porodica. Kako su tehnologije molekularno genetskog testiranja kompleksne, treba imati u vidu da genetsko ispitivanje ima osim svojih prednosti i svoje limite i nedostatke i da genetsko testiranje donosi složene etičke, pravne i socijalne probleme.

Abstract

The development of genetic methods basically changes access to the patient and introduces a new chapter in medicine. Genetic examinations are no longer limited to rare diseases, and also can be performed for complex diseases, enabling individualized access to the patient. The application of clinical genetic testing includes: newborn screening, diagnostic testing, mutation carrier testing, predictive examinations, presymptomatic examination and pharmacogenetic testing. The availability of various molecular diagnostic methods as well as their clinical application have increased. Precise molecular diagnostics have a clear advantage and enable better access and make more precise decisions in diagnosis and treatment. It is necessary to acquire new knowledge to avoid the ambiguity of providing information to affected persons and members of their families.

LITERATURA

1. Green ED, Guyer MS. Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature* 2011;470:204-13.
2. Pasche B, Absher D. Whole-genome sequencing: a step closer to personalized medicine. *JAMA* 2011;305(15):1596-7.
3. Katsanis SH, Katsanis N. Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nat Rev Genet* 2013;14(6):415-26.
4. Bakker E. Is the DNA sequence the gold standard in genetic testing? Quality of molecular genetic tests assessed. *Clin Chem* 2006;52(4):557-8.
5. Kearns WG, Pen R, Graham J, Han T, Carter J, Moyer M et al. Preimplantation genetic diagnosis and screening. *Semin Reprod Med* 2005;23(4):336-47.
6. Newman WG, Black GC. Delivery of a clinical genomics service. *Genes* 2014;5(4):1001-17.
7. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *EJGH* 2016;24(1):2-5.