

Jakub PIĄTKOWSKI<sup>1</sup>  
 Anna SKALNIAK<sup>1</sup>  
 Marek BODZIOCH<sup>2</sup>  
 Dorota PACH<sup>1</sup>  
 Alicja HUBALEWSKA-DYDEJCZYK<sup>1</sup>

## Wprowadzenie do sekwencjonowania ludzkiego genomu w diagnostyce

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Endokrynologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie  
 Kierownik jednostki:  
 Prof. dr hab. Alicja Hubalewska-Dydejczyk

<sup>2</sup>Katedra i Klinika Neurologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie  
 Kierownik:  
 Prof. dr hab. Andrzej Szczudlik

**Dodatkowe słowa kluczowe:**  
 sekwencjonowanie nowej generacji  
 diagnostyka genetyczna  
 aspekty etyczne  
 ludzki genom

**Additional key words:**  
 next generation sequencing  
 genetic diagnostics  
 ethical issues  
 human genome

Zwiększająca się wydajność aparatów do sekwencjonowania DNA oraz towarzyszący temu spadek ceny w przeliczeniu za odczyt pojedynczego nukleotydu sprawiły, że metody umożliwiające poznanie ludzkiego genomu upowszechniły się w ciągu ostatnich lat. Obecnie wykorzystywane głównie w celach naukowych w niedługim okresie czasu zaczęły być stosowane w rutynowej diagnostyce pacjentów i pozwolą na znaczne spersonalizowanie procedur leczniczych. Ze względu na bardzo dużą objętość bezpośrednio uzyskiwanych z badania danych, ich skomplikowaną analizę, ale także dużą ilość informacji w nich zawartych powstaje pytanie, kto miałby takie badania wykonywać, interpretować ich wynik i ostatecznie zarządzać danymi pacjentów.

### Wprowadzenie

Rozpoczęty w 1990 roku projekt poznania ludzkiego genomu (Human Genome Project) niósł ze sobą obietnicę poznania odpowiedzi na nurtujące ludzkość pytania dotyczące przyczyn częstszej zachorowalności na pewne typy chorób, powstawania nowotworów, mechanizmów starzenia się, a nawet uwarunkowań genetycznych do uprawiania pewnych sportów, czy wykonywania określonych zawodów. Po 13 latach badań, których łączny koszt szacuje się na 3 mld dolarów (<http://www.genome.gov/11006943>) genom człowieka został odczytany, a wyniki pracy upublicznione, co umożliwiło naukowcom na częściowe spełnienie pokładanych w nim nadziei. Choć od momentu jego oficjalnego zakończenia minęło już 10 lat, rozpoczęty proces wciąż trwa, a dzięki niezwykle szybko rozwijającej się technologii aparatów do sekwencjonowania w przeciągu kilku nadchodzących lat nabierze tempa, które już dziś nazwać można rewolucją.

### Przegląd metod sekwencjonowania DNA

Wyścig producentów aparatów do sekwencjonowania DNA powoduje powstawanie kolejnych urządzeń różniących się metodą, czasem, rzetelnością i w końcu ceną sekwencjonowania. Aby możliwe było dobranie aplikacji odpowiedniej do potrzeb danego laboratorium, warto zastanowić się jakie realne możliwości daje nam oferowany sprzęt i które z pośród kilku generacji

The increasing efficiency of genetic analyzers together with the decreasing price of DNA sequencing per single nucleotide read, makes the method of individual genomes sequencing more available for diagnostic laboratories. Nowadays genome sequencing applications are predominantly used for research purposes but in nearest future we will be using them in routine patient evaluation as we are using analytic approaches based on Sanger method now. New generation sequencing is a tool which gives the researchers excellent possibilities for the realization of personalized medicine assumptions. However, before we will be able to make full use of it, there are still some questions to be answered as for example who should perform the analysis, interpret results and finally who should be responsible for data management.

urządzeń będzie najlepiej nadawało się do realizacji zaplanowanych zadań. Czy będzie to urządzenie pierwszej generacji, czy te sprzęt drugiej, trzeciej, lub kolejnej generacji określany wspólnym mianem urządzeń nowej generacji NGS (*ang.* Next-Generation Sequencing).

*Sekwencjonowanie pierwszej generacji – Sangerowskie*

Działanie najpopularniejszych obecnie w Polsce i zagranicą sekwenatorów, wykorzystywanych do badań naukowych i diagnostycznych, polega na modyfikacji metod opracowanej przez Sangera i Coulsona w 1975 r. [9]. Wyznakowane fluorescencyjnymi barwnikami produkty reakcji Sanger rozdzielane są w żelu poliakryloamidowym w trakcie elektroforezy kapilarnej. Odczyt sekwencji nukleotydowych o maksymalnej długości do ok. 1 000 zasad dokonywany jest przez wzbudzenie barwnika światłem lasera. Wygenerowana w ten sposób emisja fotonów, inna dla każdego z czterech barwników (przyporządkowanych czterem różnym nukleotydom), rejestrowana jest za pomocą matrycy CCD (*ang.* Charged Coupled Device). Końcowy zapis odczytywanej sekwencji jest wynikiem złożenia pojedynczych sygnałów w odpowiednim programie komputerowym. Przybliżony czas odczytu 1000 nukleotydów to 12 minut. W zależności od budowy urządzenia w szczególności ilości kapilar, w których

Adres do korespondencji:  
 Mgr Jakub Piątkowski  
 Pracownia Badań Genetycznych Kliniki Endokrynologii SU  
 ul. Kopernika 17, 31-501 Kraków, tel. (012) 424-76-46,  
 e mail: jakub.piatkowski@gmx.com

prowadzony jest rozdział, możliwe jest jednoczesne sekwencjonowanie od 1 do 96 produktów. Ze względów ekonomicznych jednak wielo-kapilarne urządzenia właściwie wyszły z użycia, na rzecz chętniej wykorzystywanych aparatów 8 kapilarnych ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).

Możliwość odczytu długich fragmentów w pojedynczej reakcji przy jednoczesnej bardzo dużej trafności i jednoznaczności uzyskiwanych wyników powoduje, że pomimo niewielkiej, jak na obecne czasy wydajności metody, wciąż jest ona uznawana za złoty standard w sekwencjonowaniu DNA i często służy do sprawdzania wiarygodności wyników uzyskiwanych w urządzeniach o większej przepustowości. Aparaty bazujące na reakcji Sangera wykorzystywane były do odczytania ludzkiego genomu w ramach projektu „Human Genome Project”.

#### *Sekwencjonowanie drugiej generacji*

Nowszym rozwiązaniem, wykorzystywanym do odczytywania dłuższych sekwencji, w tym małych genomów np. wirusowych lub bakteryjnych, jest aparatura bazująca na reakcjach ligacji, czy sekwencjonowania przez syntezę. Do grupy tej zaliczamy pirosekwencjonowanie i sekwencjonowanie przez odwracalną reakcję terminacji.

W trakcie pirosekwencjonowania jednoniciowe DNA jest hybrydyzowane ze starterami (krótkie oligonukleotydy komplementarne do określonego regionu DNA), które przyłączone są do stałego podłoża i znajdują się w studzience reakcyjnej wraz z mieszaniną enzymów, takich jak polimeraza DNA, sulfurylaza ATP i lucyferaza. W trakcie reakcji do mieszaniny pojedynczo, kolejno do siebie, przedzielone etapami płukania, dodawane są nukleotydy, których przyłączenie do końca powstającej sekwencji powoduje uwolnienie pirofosforanu (PPi). Jest on substratem dla sulfurylasy ATP, która w obecności adenozyno-5-fosfosiarczanu (APS) katalizuje przekształcenie PPi do ATP, będącego „paliwem” dla lucyferazy. Jmożliwia to utlenienie lucyferyny, czemu towarzyszy zjawisko chemiluminescencji rejestrowane, podobnie jak w przypadku sekwencjonowania metodą Sangera, przez kamerę CCD [7].

Przykładem technologii wykorzystującej ten rodzaj reakcji jest system Roche 454, gdzie w najbardziej zaawansowanym obecnie modelu GS FLX+ System maksymalna długość odczytywanej pojedynczej ciągłej sekwencji wynosi do ok. 1000 zasad, co przy możliwości jednoczesnego odczytu 1 miliona sekwencji pozwala na osiągnięcie maksymalnej teoretycznej wydajności sekwencjonowania sięgającej 1 miliarda zasad (1 Gb) w 23 godziny ([www.454.com](http://www.454.com)).

Innym ciekawym rozwiązaniem jest zastosowana w aparatach serii SOLiD (*ang.* Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection), produkowanych przez firmę Life Technologies, metoda sekwencjonowania przez ligację.

Pofragmentowane DNA hybrydyzowane jest do stałego podłoża (szklanej płytki), w taki sposób, że na końcu 5' każdego fragmentu dodana zostaje uniwersalna sekwencja adaptorowa. Proces odczytu sekwencji realizowany jest w 5 następujących kolejno

po sobie rundach. Pierwsza rozpoczyna się od przyłączenia startera do sekwencji adaptorowej. Sekwencjonowanie odbywa się przez dołączanie przez enzym ligazę kolejnych wyznakowanych fluorescencyjnie sond, z których każda zawiera sekwencję rozpoznawaną przez czynnik o właściwościach nukleazy, dwa różniące nukleotydy na końcu 3' oraz odpowiedni dla danej pary nukleotydów wspomniany znacznik fluorescencyjny na końcu 5'. Po dołączeniu do sekwencjonowanego fragmentu sondy z odpowiednią parą nukleotydów, następuje wzbudzenie fluoroforu światłem lasera i rejestracja wyemitowanego światła przez kamerę CCD. Następnie dodany do reakcji czynnik o właściwościach nukleazy powoduje hydrolizę wiązania fosfodiesterowego i odcięcie części przyłączonej sondy od końca 5', pozostawiając w sekwencji za znaną parą nukleotydów trzy nukleotydy nieróżniące (inozyny), przez co po zakończeniu pierwszej rundy, odczytana sekwencja jest niepełna (2 odczytane nukleotydy, 3 nieznanne, 2 odczytane, 3 nieznanne, itd.). Szczerby w sekwencji uzupełniane są w kolejnych analogicznych do opisanej rundach, z tą różnicą, że w każdej kolejnej rozpoczynającej reakcję starter przyłączany jest do sekwencji adaptorowej o jeden nukleotyd wcześniej. Powoduje to, że po zakończeniu wszystkich rund każdy z nukleotydów w sekwencji będzie odczytany dwukrotnie, co w rezultacie daje dużą dokładność reakcji. Uzyskane z odczytu dane są automatycznie przeliczane przez oprogramowanie sekwenatora, dając w rezultacie ciągłą sekwencję.

Wydajność The 5500 Series Genetic Analysis Systems wynosi ponad 20 Gb na dzień, przy czym urządzenie jest w stanie prowadzić odczyt nieprzerwanie przez 7 dni ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).

Bardziej wydajnym rozwiązaniem odczytywania DNA jest metoda sekwencjonowania przez odwracalną terminację zastosowana w aparatach firmy Illumina. Metoda zakłada hybrydyzację wcześniej pofragmentowanego genomowego DNA na stałym podłożu (szklanej płytce). Odczyt sekwencji odbywa się przez jednoczesne sekwencjonowanie wielu fragmentów. Znajdujące się w mieszaninie reakcyjnej wyznakowane barwnikami fluorescencyjnymi nukleotydy, posiadające cechę odwracalnego zatrzymywania reakcji, przyłączają się kolejno do wydłużającej się sekwencji. Po związaniu właściwego nukleotydu, reakcja zatrzymuje się. Pozostałe nukleotydy znajdujące się w mieszaninie zostają wypłukane. Światło lasera wzbudza barwnik, następuje odczyt, po którym blokująca reakcję grupa chemiczna zostaje usunięta i możliwe jest przyłączenie następnego nukleotydu.

Maksymalna uzyskiwana wydajność dla najbardziej zaawansowanego modelu Illumina HiSeq 2500 wynosi 120 Gb w ok. 27 godzin. Maksymalna długość odczytywanej pojedynczej ciągłej sekwencji wynosi od 100-150 zasad, przy możliwości jednoczesnego odczytu 600 milionów fragmentów.

#### *Sekwencjonowanie trzeciej generacji*

Trzeci rodzaj sekwenatorów to urządzenia o dużej przepustowości, stosowane do sekwencjonowania i resekwenconowania

całych genomów, w tym ludzkiego. Wśród liderów tego typu sekwencjonowania wymienia się:

- Pacific Bioscience z aparatem PacBio RS, gdzie w trakcie procesu sekwencjonowania dokonywana jest bezpośrednia (w czasie rzeczywistym) rejestracja przyłączenia przez polimerazę DNA fluorescencyjnie wyznakowanych nukleotydów do zhybrydyzowanej do światłowodu (*ang.* zero-mode waveguide) nici komplementarnej. Duża wydajność została osiągnięta dzięki zastosowaniu macierzy światłowodowych. Zaletą urządzenia Pacific Bioscience jest możliwość bezpośredniego sekwencjonowania DNA bez konieczności przeprowadzania czasochłonnej reakcji preamplifikacji, które ponadto wprowadzają dodatkowe błędy, takie jak nierównomierne namnożenie różnych odcinków genomu w zależności od składu nukleotydowego.

Wydajność urządzenia szacowana jest na 40 Mb w 40 minut. Średnia długość odczytywanych sekwencji mieści się w przedziale od 850 do 1500 zasad (<http://www.pacificbiosciences.com/>).

- Complete Genomics oferujący kompleksową usługę sekwencjonowania i analizy bez możliwości zakupu urządzenia. Technologia firmy bazuje na modyfikacji połączenia reakcji hybrydyzacji i sekwencjonowania przez ligację. Proces przygotowania próbki polega na pofragmentowaniu DNA przez sonikację, następnie wprowadzeniu szeregu reakcji obejmujących: wstawienie sekwencji adaptorowych, zapętlenie matrycy oraz jej fragmentację enzymami restrykcyjnymi. W końcowym efekcie powstają krótkie cząsteczki DNA nazywane z *ang.* DNA nanoball (DNB). Są one hybrydyzowane na opłaszczonym silikonową warstwą chipie tworząc nanomacierz, na której przy użyciu wyznakowanych fluorescencyjnie sond przeprowadzany jest odczyt sekwencji.

Firma nie podaje informacji o wydajności posiadanego urządzenia (<http://www.completegenomics.com>).

Ponadto coraz częściej wymieniane

- Life Technologies z niedawno wprowadzonym na rynek urządzeniem Ion Proton, którego działanie polega na pojedynczym dodawaniu do reakcji kolejnych nukleotydów i rejestrowaniu zmian potencjału elektrycznego powodowanych odłączeniem się protonu w reakcji syntezy nukleotydu do nici DNA. Obserwowany sygnał jest wynikiem sumy potencjałów odłączonych protonów powstałej na skutek jednoczesnego sekwencjonowania wielu fragmentów DNA. Precyzyjny pomiar zmian napięcia elektrycznego uzyskano przez zastosowanie „perforowanych” półprzewodnikowych mikro chipów, przez co jednocześnie reakcja realizowana jest w milionach studzienek (dla chipu PI jest to 165 milionów studzienek).

Wydajność urządzenia to 30 Gb w 3-4 godzin. Średnia długość odczytywanych sekwencji to 100 zasad (<http://www.invitrogen.com>).

Teoretyczne wydajności odczytu poszczególnych urządzeń w przeliczeniu na milion zasad na godzinę (Mb/h) zostały przedstawione w Tabeli I.

Dużo niższa cena za odczyt pojedynczego nukleotydu w przypadku urządzeń

NGS, w porównaniu do urządzeń bazujących na sekwencjonowaniu sangerowskim powoduje, że są one dobrym rozwiązaniem dla sekwencjonowania długich genów np. APC, BRCA1 i 2, czy DMD i FBN1. Ponadto patogenezą coraz większej liczby chorób okazuje się mieć podłoże wielogenowe, gdzie brak jest konkretnie zdefiniowanych miejsc, w których mutacje obserwowane są z większą częstością (*ang.* hot spots) przez co dla kompleksowej diagnostyki konieczny jest odczyt wszystkich skorelowanych z chorobą genów. Przed wprowadzeniem technologii NGS ze względu na bardzo duży całościowy koszt reakcji, badania takie nie były przeprowadzane.

Pomimo tego, że urządzenia do wieloskalowego sekwencjonowania DNA nie dają idealnego odczytu sekwencji i w przypadku niektórych odcinków DNA permanentnie popełniają błędy nawet w przypadku dużego pokrycia (wielokrotnego sekwencjonowania tego samego fragmentu DNA), to osiągnięta przez nie wiarygodność przy bardzo dużej wydajności uzyskiwanych wyników daje nam możliwość odczytania dużego, np. ludzkiego genomu w przeciągu kilkunastu godzin. Otwiera to przed badaczami zupełnie nowe horyzonty poznawcze i jest potencjalnie interesującym narzędziem diagnostycznym. Generowana ogromna ilość danych rodzi jednak szereg pytań dotyczących ich dalszego wykorzystania, co implikuje poważne aspekty etyczne.

#### Sekwencjonowanie nowej generacji w diagnostyce

Wprowadzenie technologii sekwencjonowania nowej generacji, czyli nie bazującego na reakcji Sangera, do laboratoriów diagnostycznych spowoduje zmianę formatu ich pracy. Ilość pozyskiwanych danych zwiększy się z średnio 1 000 par zasad (pz), jakie odczytujemy obecnie w ramach standardowych badań diagnostycznych, nawet do  $3079 \cdot 10^9$  pz (wielkość genomu człowieka). Doszliśmy do momentu, w którym to nie pozyskiwanie danych jest największym problemem, a ich interpretacja. Zwiększenie skali badania przy jednoczesnym zachowaniu jego dokładności jest darem technologii, który umiejętnie wykorzystany umożliwi zarówno wcześniejsze przewidywanie i zapobieganie chorobom, jak i ich dokładniejszą diagnozę. W obu przypadkach przekładając się na szybszy sukces terapeutyczny i całościowe obniżenie kosztów leczenia, co w aspekcie publicznej opieki zdrowotnej nie pozostaje bez znaczenia. Aby jednak możliwym było oszacowanie stopnia w jakim jesteśmy w stanie usprawnić proces profilaktyki i leczenia musimy zastanowić się jak wiele z pozyskanych informacji będziemy mogli realnie wykorzystać i na ile możliwe jest spersonalizowanie terapii, przy obecnych możliwościach polskiej służby zdrowia, zarówno sektora publicznego, jak i prywatnego [2, 5].

#### Kwalifikacje laboratorium

Następstwem wprowadzenia technologii NGS do laboratoriów będzie szereg wyzwań organizacyjnych i etycznych.

Pierwszym z nich jest zdefiniowanie rodzaju jednostki, w jakiej takie badanie

może zostać wykonane oraz ustalenie kryteriów dotyczących jego wyposażenia. W wymaganych przez Narodowy Fundusz Zdrowia warunkach udzielania świadczeń zdrowotnych kontraktowanych oddzielnie [11] brak jest rozróżnienia pomiędzy cytogenetyką a genetyką molekularną. Powoduje to kłopotliwym zdefiniowanie potrzebnego sprzętu oraz personelu laboratorium genetyki molekularnej, pozostawiając w pełni decyzji właściciela jednostki jego odpowiednie wyposażenie i dobór pracowników, który w przypadku badań genetycznych wykorzystujących zaawansowane techniki molekularne nie jest łatwy, gdyż niejednokrotnie wymaga interdyscyplinarnego zespołu specjalistów. Rozwiązaniem mogłoby być tutaj stworzenie ogólnokrajowych wytycznych uwzględniających podział na typ laboratorium i rodzaj wykonywanych w nich badań. Umożliwiłoby to dokładne sprecyzowanie wymagań i spowodowało dużo większą elastyczność w ich ewentualnej aktualizacji np. o technologię NGS.

Duża dynamika badań nad ludzkim genomem w aspekcie poznania etiologii poszczególnych chorób oraz mała ilość gotowych, komercyjnie dostępnych rozwiązań w połączeniu z ograniczoną liczbą odczynników przeznaczonych do diagnostyki genetycznej, często wymaga opracowywania metod diagnostycznych przez personel laboratorium, dla każdego laboratorium osobno (niezależnie). Zgodnie z rozporządzeniem ministra zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 r. [10], każda metoda badawcza opracowana w laboratorium wymaga pełnej walidacji, a zapewnienie jakości badań realizowane jest przez jej stałą wewnętrzną i zewnętrzną kontrolę. Zewnętrzna kontrola jakości przeprowadzana jest przez udział w krajowych lub zagranicznych programach zewnętrznej oceny jakości. Daje to dużą dowolność w wyborze laboratorium referencyjnego, co jest dobre, ponieważ nie ogranicza rynku. Niemniej jednak brak rekomendowanej przez Ministerstwo Zdrowia lub NFZ listy laboratoriów referencyjnych powoduje, że system kontroli jakości jest mało przejrzysty, przez co trudnym jest dla

pacjenta potwierdzenie kompetencji laboratorium. W aspekcie badań genetycznych bazujących na odczycie genomowego DNA szczególnie ważnym jest, aby badania te przeprowadzane były w jednostkach do tego dobrze przygotowanych i odpowiednio zwalidowanych, gdyż wynik badania jest ważny przez całe życie pacjenta, a w przypadku zmian dziedzicznych ma także znaczenie dla jego krewnych. Rozszerzenie badania z sekwencjonowania pojedynczego lub kilku wybranych genów do sekwencjonowania całego eksomu lub genomu, czyni problem tym ważniejszym, gdyż mając całościowy wgląd w DNA pacjenta, potencjalnie będziemy mogli uzyskać bardzo liczne dodatkowe informacje niezwiązane z aktualnym powodem wykonywania analizy genetycznej niekoniecznie pożądane przez pacjenta (np. dotyczące ryzyka zachorowania na choroby którym nie można obecnie zapobiec).

#### Zgoda na badanie

Obowiązkową częścią każdego zlecenia jest wypełniona i podpisana deklaracja świadomej zgody na wykonanie badań genetycznych, opracowana przez personel laboratorium. Oprócz podstawowych danych personalnych pacjenta, w zależności od laboratorium, na formularzu znajdują się również informacje dotyczące dalszego wykorzystania pobranych próbek, ich ewentualnego wykorzystania do badań naukowych oraz informacje dotyczące implikacji wynikających z badania. To właśnie ilości i rodzaj tych ostatnich budzi największe wyzwanie etyczne, gdyż aby zgodnie z deklaracją, wyrażaną przez pacjenta zgodą była świadoma, powinniśmy mu dostarczyć optymalnie dużo informacji, które pozwolą nabyć mu odpowiednią wiedzę i zrozumieć następstwa wynikające z przeprowadzane go badania. Z drugiej jednak strony trudno oczekiwać, że dokument przeważnie zawarty na pojedynczym arkuszu o formacie A4, wszystkim zainteresowanym w pełni umożliwi zrozumienie skomplikowanych zagadnień z dziedziny genetyki klinicznej. Jakie informacje powinna zatem zawierać deklaracja, aby dawać pacjentowi możliwość

Tabela I

Technologia sekwencjonowania. Porównanie urządzeń pierwszej, drugiej i trzeciej generacji. Sequencing technologies. Comparison of first, second and third generation sequencers.

Rodzaj sekwencjonowania	Generacja	Producent	Model	Teoretyczna (obliczona) wydajność Mb/h
Sangerowskie				
	Pierwsza	Life Technologies	3500	≈ 0,000480
		Beckman	GeXP Genetic Analysis System	≈ 0,000411
Nowej generacji				
	Druga	Roche	454 GS FLX+ System	≈ 43,5
		Life Technologies	SOLiD The 5500 Series Genetic Analysis Systems	≈ 833
		Illumina	HiSeq 2500	≈ 4444
	Trzecia	Pacific Bioscience	PacBio RS	≈ 60
		Complete Genomics	-	-
		Life Technologies	Ion Proton	≈ 7500 (PI chip)

dużą wiedzę na temat planowanego badania, przy zachowaniu czytelnej i ogólnie zrozumiałej formy tekstu?

Innym istotnym aspektem, na który należy zwrócić uwagę, jest fakt, że pacjent wyrażając świadomą zgodę na udział w badaniu pokłada w badaczu zaufanie, co do rzetelnego jego przeprowadzenia, ale i późniejszej ochrony pozyskanych danych dotyczących jego osoby. Dlatego szczególnie ważnym jest ich odpowiednio prawne zabezpieczenie, przez określenie osób upoważnionych do wglądu w te dane, a także miejsce ich przechowywania. Czy każdy z lekarzy zaangażowanych w proces terapeutyczny na dowolnym etapie życia pacjenta powinien mieć do nich dostęp, a jeśli tak, to do jak dużej części?

Informacje pozyskane z sekwencjonowania ludzkiego genomu mają dużą wartość poznawczą; jest zatem prawdopodobne, że będą one chętnie i często wykorzystywane w badaniach naukowych. Żeby jednak stworzyć sobie możliwość pracy badawczej, już na etapie zgody na przeprowadzenie badania należy zastanowić się, w jaki sposób zachęcić pacjenta do brania udziału w przyszłych projektach naukowych, ponieważ będzie to wymagało od niego wyrażenia osobnej zgody na udział w każdym z projektów, wykorzystujących dane dostarczone z analizy jego DNA. Ewentualnie w jaki sposób zmienić obecne wymagania, aby uprościć procedurę przy zachowaniu wszystkich kryteriów etycznych np. wyrażenie czasowej zgody na pewien rodzaj badań naukowych, przy założeniu odpowiednio wcześniejszego przesłania do pacjenta wszelkich niezbędnych informacji dotyczących nowo przeprowadzanego badania, tak aby dać mu możliwość zapoznania się z jego szczegółami i pozwolić na ewentualne wycofanie wcześniej wyrażonej zgody [8].

#### Zarządzanie danymi

Bezpośrednim („surowym”) wynikiem badania genetycznego jest ciąg utworzony z czterech liter: A, T, C, G odpowiadającym czterem nukleotydów, o długości zależnej od badanego regionu DNA. Bez odpowiedniego oprogramowania komputerowego, specjaliści z dziedziny genetyki molekularnej, który potrafi odczytać z niego istotne informacje, oraz lekarza genetyka lub specjalisty z danej dziedziny medycyny, który informacje te potrafi w odpowiedni sposób zinterpretować i przekazać pacjentowi oraz jego rodzinie, wynik ten jest bezwartościowy dla pacjenta. Z drugiej strony ani genetyk, ani lekarz nie są w stanie omówić i wydać wyniku na podstawie analizy całego genomu, ponieważ jest on zbyt duży, a przede wszystkim na obecnym etapie wiedzy brak jest wystarczającej ilości danych klinicznych do jednoznacznej interpretacji większości z obserwowanych zmian. Decydując się na odczytywanie długich fragmentów DNA musimy zastanowić się, czy aby nie sprowadzimy laboratorium do roli swoistego magazynu informacji, w którym odczytane sekwencje oczekiwane będą na ponowną analizę, gdyż w takiej sytuacji rodzą się pytania, kto miałby je przeprowadzić, jak często powinniśmy porównywać posiadane dane z nowo zdefinio-

wanymi wariantami genów i czy powinniśmy informować pacjenta o nowych wariantach oraz kto miałby ponosić koszty ponownej analizy [2]. Nie rozstrzygniętą wciąż kwestią pozostaje zasadność informowania pacjenta o wszystkich obserwowanych w genomie zmianach, włączając: polimorfizmy, mutacje o niskiej penetracji i warianty nie zbadane lub o nieznanym efekcie klinicznym [1]. W przypadku „filtracji” wyników ważne jest, aby określić, na jakim poziomie ich powstawania miałyby ona zostać przeprowadzona, oraz kto miałby decydować o tym, których informacji udzielić pacjentowi.

#### Nauka vs. Diagnostyka

Nie ulega wątpliwości, że wprowadzanie nowych procedur do rutynowej diagnostyki powinno być przeprowadzane w sposób zachowawczy, z naciskiem na dokładne określenie skuteczności i wydajności metody oraz jednoznaczność w interpretacji otrzymywanych wyników, które mają bezpośrednie przełożenie na proces leczniczy. Zdarza się jednak, że w wybranych przypadkach, mając na uwadze dobro pacjenta, decydujemy się na częściową rezygnację z tego konserwatywnego podejścia. Skutkuje to często dylematem przejawiającym się trudnością w rozgraniczeniu pomiędzy badaniem naukowym a diagnostycznym. Rozstrzygającym kryterium jest w takim przypadku wpływ otrzymanego w badaniu wyniku na terapię pacjenta. Postęp w rozwoju technologii sekwencjonowania DNA pozwolił na zaadoptowanie nowych metod badawczych skutkujących zwiększeniem wydajności aparatów i obniżeniem cen badania, jak w przypadku sekwencjonowania nowej generacji. Jednocześnie urzędowania bazujące na reakcji Sanger’a wciąż pozostają niezwykle użyteczne w codziennej pracy laboratoryjnej, a cena za analizę osiągnęła stały poziom. Nietrudno wyobrazić sobie spotkanie obu technologii w laboratorium i sytuację, w której za nieznacznie wyższy koszt badania będziemy w stanie poznać o wiele większy obszar DNA pacjenta, ale przy zachowaniu wpływu na aktualną terapię (powodowane stanem wiedzy), niemniej jednak z obietnicą wykorzystania otrzymanych danych w przyszłości. O ile więcej, jeśli w ogóle, jesteśmy w stanie zapłacić za taką obietnicę? Oraz kto powinien zostać poddany badaniu, gdyż niewykluczone, że to od odpowiedniego doboru pacjentów zależy prawdopodobieństwo jej spełnienia.

Przedstawiony przypadek przesuwa nas na stronę badań naukowych. Powstaje zatem problem finansowania tych badań. W przyszłości możliwe jest, że jednostka która wykonała badanie i gromadzi dane pacjentów, po uzyskaniu zgody pacjenta i odpowiedniej komisji bioetycznej oraz zachowaniu odpowiednich ograniczeń związanych z ochroną danych osobowych (np. nie podawanie nazwiska, numeru PESEL, adresu i innych danych umożliwiających identyfikację pacjenta) mogłaby udostępnić je na określonych warunkach innym placówkom badawczym.

#### Wykorzystanie technologii NGS w badaniach przesiewowych u noworodków

Potencjalna użyteczność technologii

wielkoskalowego sekwencjonowania DNA została dostrzeżona również w aspekcie badań przesiewowych noworodków. Wymienianymi zaletami są tu: rozszerzenie panelu badanych chorób przy jednoczesnej dużej skuteczności metody, zwiększenie czułości testu w porównaniu z aktualnie stosowanymi metodami [4], koszt badania porównywalny z kosztem badań przeprowadzanych obecnie (rekomendowany panel podstawowych badań przesiewowych dla Stanów Zjednoczonych uwzględnia 29 chorób oraz 25 chorób badanych dodatkowo [6]), a także perspektywa korzyści oferowanych przez medycynę personalizowaną [3]. Badania przesiewowe noworodków są przeprowadzane w celu wykrycia zaburzeń wrodzonych, które są możliwe do leczenia lub zapobiegania, ale nie powodują wyraźnych objawów klinicznych po urodzeniu, jednak pozostawione bez leczenia prowadzą do upośledzenia rozwoju umysłowego i fizycznego. Podjęcie odpowiednio wczesnych interwencji pozwala zapobiec manifestacji klinicznej choroby, chroniąc dziecko przed jej nieodwracalnymi skutkami. W obliczu nowych możliwości diagnostycznych oferowanych przez NGS powstaje pytanie o strategię testów przesiewowych. Czy powinny one dotyczyć tylko chorób wymagających nagłej interwencji, jak jest to w przypadku hipertyreoz i fenylketonurii, czy też stosowniejszym byłoby przyjęcie mniej restrykcyjnych kryteriów i badanie także takich chorób, w których zachorowalność obserwuje się w wieku dorosłym? W przypadku badań przeprowadzanych metodami biochemicznymi wybór zawęży się do pierwszego przypadku, co spowodowane jest kosztem analizy, w sytuacji ewentualnego zastosowania NGS brak jest takowego ograniczenia, a jedynym przeciwwskazaniem mogą być aspekty etyczne. Wybierając drugie rozwiązanie, w przypadku pozytywnego rozpoznania stworzymy osobie badanej doskonałe możliwości predykcyjne, gdyż będziemy mogli zaplanować kalendarz badań kontrolnych i na bieżąco monitorować stan pacjenta. Jednocześnie musimy być świadomi faktu, że decydując się na wykonanie badania odbierzemy pacjentowi wolę decydowania o sobie, o tym czy chce zostać zbadany, czy nie. Dodatkowo otrzymanie pozytywnego wyniku w zbyt wczesnym wieku może być dla pacjenta szkodliwe, gdyż będzie on żył z przeświadczeniem o zachorowaniu, co może wpłynąć w znaczący sposób na podejmowane przez niego decyzje.

Eksperti są dotychczas zgodni, że nie należy wykonywać badań genetycznych o charakterze predykcyjnym (przedobjawowym) u dzieci, jeżeli ewentualne wykrycie niekorzystnego wariantu nie wiąże się z możliwością zastosowania skutecznych środków zapobiegawczych lub podjęcia innych interwencji o jednoznacznych korzyściach klinicznych dla badanego dziecka. Niemniej jednak w przypadku NGS dążenie do możliwie najwcześniejszego rozpoznania chorób uleczalnych może się wiązać, co wynika ze swoistych właściwości tej metody, z „przypadkowym” i niepożądanym wykryciem stanu nosicielstwa chorób, którym nie jesteśmy w stanie obecnie zapobiec.

## Strategia wdrażania

Znalezienie złotego środka pomiędzy potencjalną ilością osób badanych a ilością ośrodków wykonujących badanie będzie jednym z ważniejszych czynników decydujących o powodzeniu wdrożenia NGS. Z jednej strony interesującym rozwiązaniem wydaje się być uruchomienie małej ilości ośrodków diagnostycznych: jednego/dwóch w kraju. Zaletą takiego rozwiązania byłoby pełne wykorzystanie sprzętu, gdyż przez pozyskanie stałego popytu na tego rodzaju badania przy jednoczesnej ograniczonej podaży w ich udzielaniu zapobiegamy sytuacji, w której dysponujemy odpowiednim sprzętem i zapleczem medycznym, ale ilość otrzymywanych zleceń, a zatem i wykonywanych oznaczeń jest niewielka. Centralizacja wykonywanych badań przekłada się na większą specjalizację personelu i jego wyższe kwalifikacje oraz łatwość walidacji ośrodka. Nie bez znaczenia jest również to, że pozyskane dane gromadzone są w jednym/dwóch miejscach, ponieważ łatwiej w takiej sytuacji o ich uporządkowanie, przejawiające się m. in. unifikacją w zapisie. W efekcie rozwiązanie takie powoduje także łatwiejszy dostęp do zgromadzonych informacji upoważnionym jednostkom. Z drugiej jednak strony decydując się na świadome zmniejszenie liczby ośrodków nie możemy mieć pewności, co do jakości oferowanych usług. Powodujemy, że powstaje wąskie grono specjalistów w danej dziedzinie, w tym przypadku genetyce klinicznej opartej na sekwencjonowaniu nowej generacji, co w konsekwencji może doprowadzić do wydłużenia czasu i/lub ograniczenia realizacji badania. Dodatkowo, ograniczając liczbę laboratoriów doprowadzamy do wyeliminowania naturalnej konkurencji pomiędzy

jednostkami i zamiast pozwolić pacjentom świadomie decydować o ośrodku, w którym chcą wykonać badanie, zatem pozwolić na samo regulowanie się rynku danej usługi laboratoryjnej, odgórnie decydujemy o tym, który ośrodek jest odpowiedni, a który nie, co nie wpływa korzystnie na podnoszenie jakości usług ani spadek ich cen. Reasumując, pomimo niezaprzeczalnych zauważalnych korzyści płynących z ograniczenia jednostek diagnostycznych zajmujących się sekwencjonowaniem wielkoskalowym, najlepszym rozwiązaniem wydaje się być nie ograniczanie rynku i postępowanie analogiczne, jak w przypadku innych usług laboratoryjnych, pozostawiając decyzję o opłacalności uruchomienia laboratorium genetycznego menadżerom szpitali.

Niewykluczone, że wykorzystanie technologii wielkoskalowego sekwencjonowania DNA do celów medycznych będzie miało pośredni pozytywny efekt społeczny, poprzez stworzenie zapotrzebowania na rozwój ośrodków zajmujących się przechowywaniem i re-analizą danych pacjentów. Spowoduje zatem rozwój nowej branży sektora komercyjnego.

## Podsumowanie

Wprowadzenie technologii sekwencjonowania nowej generacji do diagnostyki w sposób zapewniający maksymalną wydajność oraz spełniający wymogi etyczne jest dużym wyzwaniem, z którym należy się zmierzyć, gdyż nawet w przypadku ograniczonej przydatności uzyskiwanych wyników w chwili obecnej, w długim okresie czasu pozyskane dane stanowią dużą wartość diagnostyczną, naukową i potencjalnie komercyjną (np. w ramach kwalifikacji pacjentów do badań klinicznych).

Odmawiana technologia jest istotnym elementem w realizacji założeń medycyny personalizowanej. Poznanie genomu pacjenta pozwala na precyzyjne ukierunkowanie terapii w przypadku chorób o znanym podłożu genetycznym i przyczyni się do poznania patogenetyki tych słabiej zbadanych.

## Piśmiennictwo

1. **Biesecker L.G.:** Opportunities and challenges for the integration of massively parallel genomic sequencing into clinical practice: lessons from the ClinSeq project. *Genet. Med.* 2012, 14, 393.
2. **Chan E.Y.:** Advances in sequencing technology. *Mutat. Res.* 2005, 3, 13.
3. **Francis S.C.:** *The Language of Life: DNA and the Revolution in Personalized Medicine.* HarperCollins Publishers, United States of America, 2010.
4. **Greeley S.A., Msall M.E., Acharya K.:** Genomic sequencing in newborn screening programs. *JAMA* 2012, 307, 2146.
5. **Hastings R., de Wert G., Fowler B. et al.:** The changing landscape of genetic testing and its impact on clinical and laboratory services and research in Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* 2012, 20, 911.
6. **Levy P.A.:** An overview of newborn screening. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 2010, 31, 622.
7. **Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., et al.:** Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal. Biochem.* 1996, 1, 84.
8. **Rothstein, M.A.:** Expanding the ethical analysis of biobanks. *J. Law Med. Ethics.* 2005, 33, 89.
9. **Sanger F., Nicklen S., Coulson, A. R.:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977, December, 5463.
10. Załącznik nr 3 „Standardy jakości w zakresie czynności laboratoryjnej genetyki medycznej, oceny ich jakości i wartości diagnostycznej oraz laboratoryjnej interpretacji i autoryzacji wyniku badań” do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 r.
11. Załącznik nr 3 „Warunki udzielania świadczeń w rodzaju: świadczenia zdrowotne kontraktowane odrębnie” do Zarządzenia Nr 68/2009/DSOZ Prezesa Narodowego Funduszu Zdrowia z dnia 3 listopada 2009 r.