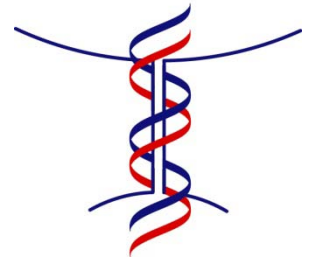




DNS testi laboratorijā GenEra

Juris Šteinbergs, PhD
2012. gada 6. marts



Par mums:

- Gēnu testēšanas laboratorija, dib. 2001
- Reģistrēta ārstniecības iestāde (kods 0192-68301)
- Sertifikāts L-194-A (molekulārā bioloģija)
- Darbinieki: 8
- Sadarbība ar:
 - BMC, Genoma centru
 - Hematoloģijas centru, RAKUS, Linezers (onkohematoloģija)
 - P.Stradiņa KUS, BKUS (trombofilija, himērisms)
 - RDzN (trisomijas)
 - LIC (Žilbēra sindroms, gēna IL28B polimorfismi)
 - Roche (EGFR mutācijas), Novartis (*bcr/abl*)



Ābece

- Cilvēkam ir divi genoma komplekti (2x23 hrom.)
- Izņēmumi – olšūnas un spermatozoīdi
- Katrs cilvēks saņem vienu komplektu no mātes, otru – no tēva
- Cilvēks sākas no vienas šūnas, tāpēc...
- ... visās šūnās genoms (DNS kopums) ir viens un tas pats
- Cilvēka genoma lineārā struktūra (bāzu secība jeb sekvenca) visā garumā faktiski ir zināma

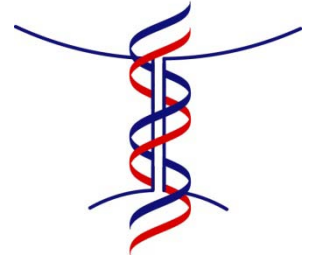


VISIEM CILVĒKIEM GENOMS
IR PAR 99,9% IDENTISKS



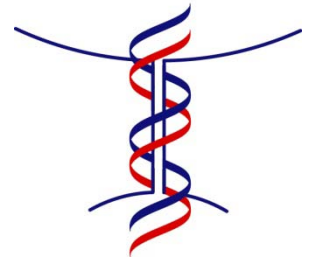
TĀS 0.1% ATŠĶIRĪBAS IR
IZKAISĪTAS PA VISIEM 3,3
MILJARDIEM bp –
MUTĀCIJAS, SNPs u.c. ...

...ŠO ATŠĶIRĪBU MEKLĒŠANA
FAKTISKI IR TĀS, KO SAUCAM
PAR GĒNU TESTĒŠANU



Tradicionālā shēma

- Jāiegūst pacienta paraugs (šūnas)
- Jāizolē genomiskā (hromosomālā) DNS
- Jātiek klāt noteiktam DNS rajonam (PCR)
- Jāizpēta šis DNS gabals (jānosaka precīzs garums, bāzu secība (sekvence) utt.)
- Jāsālīdzina ar kādu nosacītu etalonu
- Jāizdara secinājumi

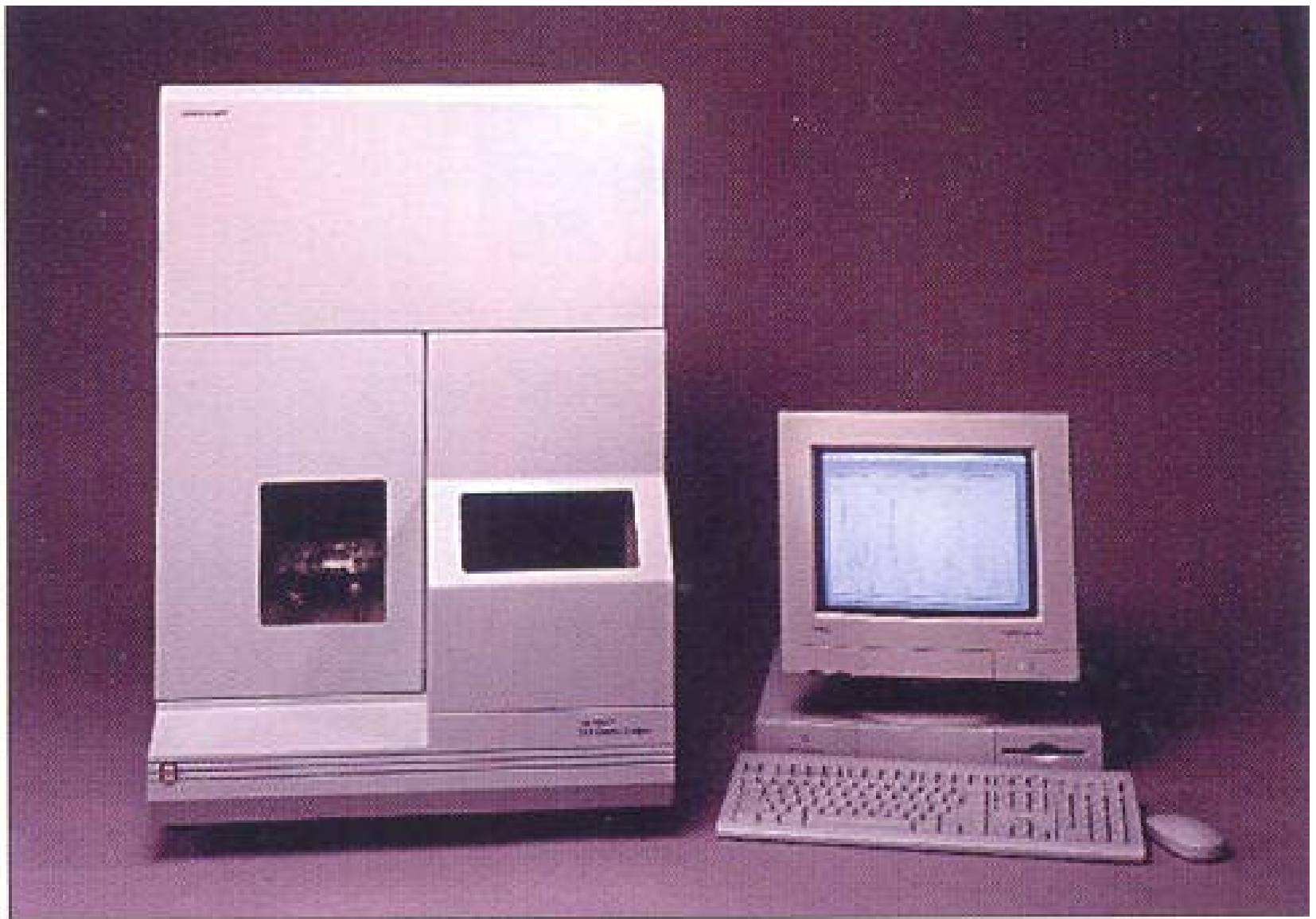


Galvenie “ieroči”

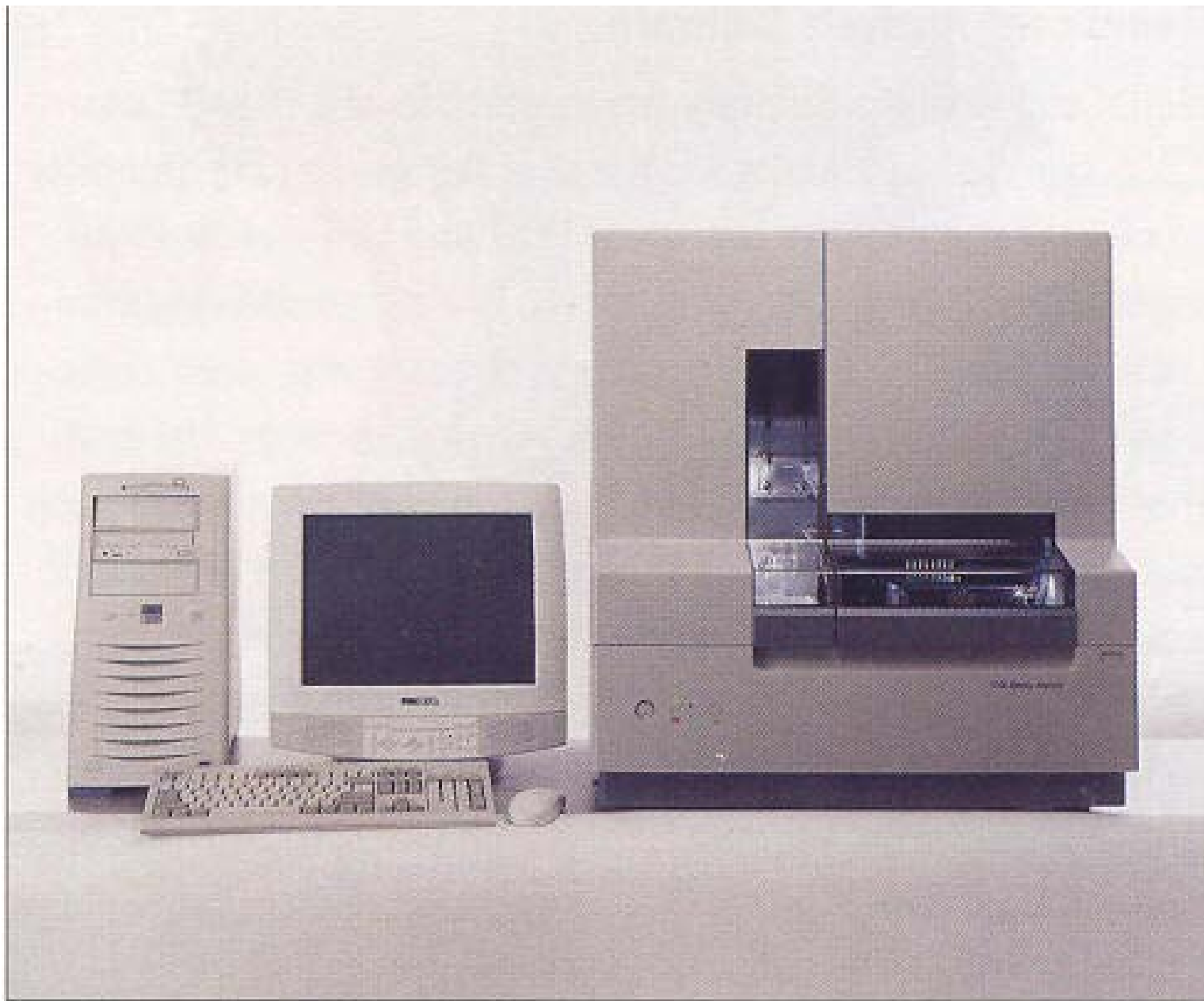
- **DNS izolēšana no dažādiem audiem:** asinis, gļotādas uztriepes *etc.*: speciāli “kiti”
- **PCR jeb polimerāzes ķēdes reakcija:** iespējams specifiski amplificēt praktiski jebkuru DNS rajonu: aparatūra un reaģenti
- **DNS sekvenēšana:** var “nolasīt” bāzu secību
- **Real-Time PCR:** metode kvantifikācijai un dinamikas kontrolei



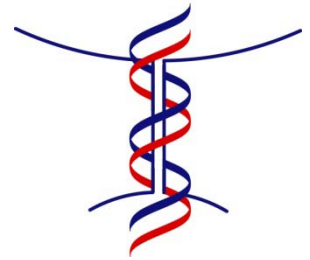
GeneAmp® PCR System 9700



ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer



ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer



Svarīgi:

- Vairumam DNS testu shēma un stratēģija ir praktiski vienāda
- Atšķiras parasti “praimerī” un daži parametri (temperatūras, enzīmi, jonu koncentrācija etc.) PCR reakcijai
- **Galvenā problēma:** padarīt testu no eksperimenta “iznāks/neiznāks” līdz stabilai, atkārtojamai rutīnas manipulācijai un –
- Panākt tās **oficiālu atzišanu** (VSMITA, VEC, VNC, **NVD**.....etc.)

Līgums ar NVD par sekojošām manipulācijām:

- Himērisma monitorings pēc alogēnas kaulu smadzeņu vai perifērisko asiņu cilmes šūnu transplantācijas, izmantojot STR lokusu genotipēšanu (La/MoB 087; 49026)
- Hroniskās mieloleikozes molekulārā diagnostika (La/MoB 075; 49027)
- Ph (Filadelfijas hromosomas) pozitīvas hroniskās mieloleikozes terapijas efektivitātes molekulārā kontrole (La/MoB 089; 49028)
- Cilvēka genoma DNS izdalīšana (49025)
- DNS analīze, izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju cilvēka ģenētisko pataloģiju diagnostikai (49030)



DNS testi, kurus apmaksā NVD:

- Venozo trombožu riska noteikšana
- Žilbēra sindroms
- Hereditārā hemohromatoze
- DNS diagnostika iedzimtā krūts un olnīcu vēža pacientiem
- Polimorfisms C/T (rs1297860) gēna IL28B rajonā (hepatīta C pacientiem)



DNS testi, par kuriem maksā pacients:

- Paternitātes tests
- Biežāk sastopamo trisomiju (13., 18., 21., XY) prenatalā diagnostika
- Laktāzes persistence
- Hemofīlijas A DNS diagnostika
- Hemofīlijas B DNS diagnostika
- Celiakijas riska DNS tests



Iedzimtā krūts un olnīcu vēža riska noteikšana

- Siekalu paraugs (uztriepe no mutes gļotādas); der jebkurš audu paraugs
- DNS izolēšana, PCR, sekvenēšana
- Rezultāta paziņošana ārstam / pacientam
- iespējama “neklātienēs” testēšana – paraugi pa pastu
- Izmaksas: ar ĢĀ (forma 027u) nosūtījumu – sedz NVD



Iedzimtā krūts un olnīcu vēža riska noteikšana

- Latvijā stabili ieņem pirmo vietu saslimstības un mirstības ziņā starp onkoloģiskajām saslimšanām sievietēm
- Latvijā 90% iedzimtā krūts vēža gadījumu ir kāda no izplatītākajām mutācijām gēnā BRCA1:
 - eksonā 2: 185delAG
 - eksonā 5: T(300)G
 - eksonā 11: 4154delA
 - eksonā 20: 5382insC

Iedzimtā krūts un olnīcu vēža riska noteikšana Ieguvumi



- Laicīga predisponētības noteikšana krūts/olnīcu vēža attīstībai
- Sievietēm – savlaicīga profilaktiskā aprūpe
- Onkologiem – optimālas terapijas izvēle, pastiprināta uzmanība gadījumiem ģimenē, iespēja novērst vai savlaicīgi detektēt recidīvu
- Izslēgt mutācijas ģimenes locekļiem, kas nav to pārmantojuši
- Radīt psiholoģisku atvieglojumu tām sievietēm, kuru radnieces slimo ar krūts vai olnīcu vēzi



Laktāzes persistence

- Iedzimta tendence, kas “izslēdz” laktāzes ekspresijas samazināšanos pieaugušajiem, pieaugot vecumam
- “Atbildīgā” mutācija pirms gēna LCT:
 - **C13910T**
- Genotips C/C = laktozes nepanesamība
- Radusies pirms 5000-10000 gadiem, reizē ar lopu domesticēšanu
- Genotipa C/C sastopamība:
 - Z-Eiropā vismazāk: ca 5% populācijas
 - D-Eiropā: vietām 71%
 - Āfrika, Āzija – pat 90% (pēc dažādiem avotiem)

Laktāzes persistence

- Siekalu paraugs (uztriepe no mutes gļotādas); der jebkurš audu paraugs
- DNS izolēšana, PCR, sekvenēšana
- Rezultāta paziņošana ārstam / pacientam
- Iespējama “neklātienes” testēšana – paraugi pa pastu
- Izmaksas: Ls 30; izpilde: 5 darba dienas



Žilbēra sindroma DNS tests

- Sastopamība populācijā: 3-10%
- Nosaka iedzimtu tendenci pazeminātai bilirubīna-UDP glikuronoziltransferāzes (UGT) ekspresijai (pat <30% no normas)
- Kodējošais gēns – UGT1A1 (2q37)
- Diagnostika: pamatā bioķīmiskie izmeklējumi
- Precīza metode apstiprināšanai: DNS sekvenēšana



Žilbēra sindroma DNS tests

- Izmaiņu noteikšana gēna UGT1A1 promotera TATA rajonā
 - Norma: (TA)₆ / (TA)₆
 - **iedzimts Žilbēra sindroms: (TA)₇ / (TA)₇**
- No 325 līdz šim testētiem pacientiem:
 - (TA)₆ / (TA)₆ = 11
 - (TA)₆ / (TA)₇ = 52
 - (TA)₇ / (TA)₇ = 262
- NB! – iespējamās arī citas mutācijas gēnā UGT1A1 (Krīglera-Najara sindroms, I un II tips)

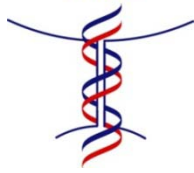
Žilbēra sindroma DNS tests

- Siekalu paraugs (uztriepe no mutes gļotādas); der jebkurš audu paraugs
- DNS izolēšana, PCR, sekvenēšana
- Rezultāta paziņošana ārstam / pacientam
- iespējama “neklātienes” testēšana – paraugi pa pastu
- Laiks: 10 darba dienas
- Izmaksas: ar ĢĀ nosūtījumu – sedz NVD

Venozo trombožu riska noteikšana

Testējam sekojošas mutācijas:

- gēnā F5: **G(1691)A** (Leidena)
- gēnā F5: G(1615)A
- gēnā F5: G(1628)A
- gēnā F2: **G(21538)A**
- gēnā MTHFR: **C(677)T**
- gēnā MTHFR: A(1298)C



Venozo trombožu riska noteikšana

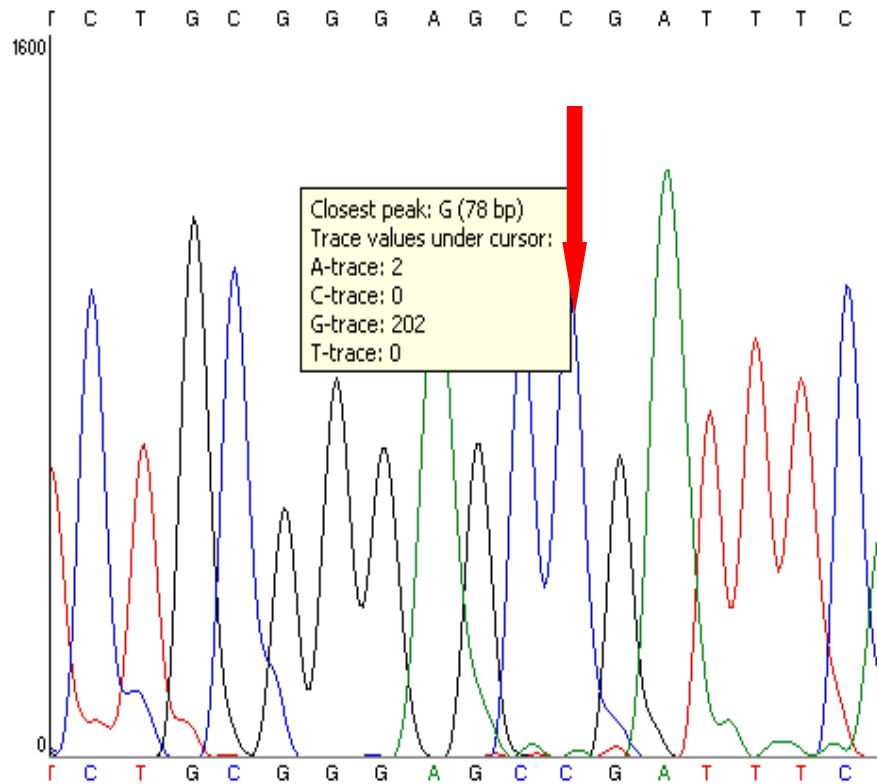
- Pacienti ar venozo trombozi, to radiniekiem
- Hiperhomocisteinēmijas pacientiem
- Koronāro artēriju slimības pacientiem
- Sievietēm
 - kuras lieto hormonālās kontracepcijas līdzekļus
 - Grūtniecēm, kurām bijuši spontānie aborti
 - gadījumos, kad tiek pielietota estrogēnu terapija
 - smēķētājām (jaunākām par 50 gadiem), kas pārcietušas miokarda infarktu



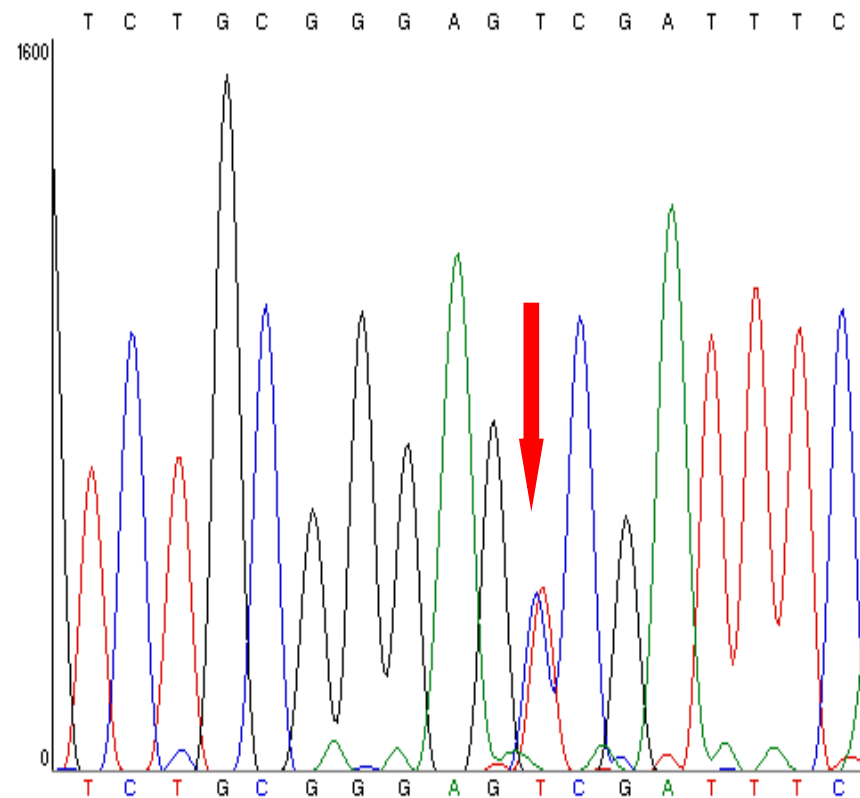
Venozo trombožu riska noteikšana

- Siekalu paraugs (uztriepe no mutes gļotādas); der jebkurš audu paraugs
- DNS izolēšana, PCR, sekvenēšana
- Rezultāta paziņošana ārstam / pacientam
- iespējama “neklātienes” testēšana – paraugi pa pastu
- Laiks: 10 darba dienas
- Izmaksas: ar ĢĀ nosūtījumu – sedz NVD

MTHFR: C(677)T



Homozigots (..GCCGA..)



Heterozigots (..GC/TCGA..)



Trisomiju prenatalā diagnostika

- Invazīva prenatalā diagnostika tiek ieteikta grūtniecēm, kam noteikts paaugstināts augļa hromosomu izmaiņu risks:
 - Skrīninga rezultāti (USG, mātes vecums, hormoni)
 - Vecāku anomālijas; tēva vecums virs 45 gadiem
 - Jonizējošais starojums
 - Ģimenes vēsture (anomālijas, asinsradniecība, hromosomālās saslīmšanas u.c)
- Pašreiz Latvijā NVD apmaksā divas prenatalās diagnostikas metodes:
 - 49040 Hromosomu fluorescentā *in situ* hibridizācija (FISH) (izmaksas - Ls 159,24)
 - 49049 Amniocītu kultūras hromosomu analīze, prenatalā. (izmaksas - Ls 135,13)

Trisomiju prenatalā diagnostika: *ChromoQuant™*



- Paredzēts biežāko hromosomu defektu prenatalai diagnostikai: 13., 18., 21., X, Y
- Balstās uz kvantitatīvas fluorescējošas PCR principiēm (QF-PCR)
- Izstrādājusi *National Genetics Reference Laboratory* (Wessex, UK)
- Ražo firma *CybergeneAB* (Zviedrija)
- Metode reģistrēta NVD: La/MoB 088
- Laiks: parasti 24h
- Izmaksas: Ls 98 (ar Ginekologu asociācijas atbalstu ceram iekļaut NVD apmaksāto sarakstā)

Ko var detektēt *ChromoQuant*TM analīze?

- **Dauna** sindroms – 21. hromosomas trisomija
- **Edvardsa** sindromu – 18. hromosomas trisomija
- **Patau** sindromu – 13. hromosomas trisomija
- Dzimumhromosomu defekti, tajā skaitā:
 - **Klainfeltera** sindroms (XXY)
 - XXX
 - XYY
- **Tērnera** sindromu: sievietes ar (X0)

Trisomiju prenatalā diagnostika: *ChromoQuant™*



- Paraugs: 2-10 ml augļūdens
 - 12. – 22. grūtniecības nedēļā
 - MĢK, Prenatālās Diagnostikas nodaļa, RDzN, dr. J.Bārs
 - “Jūsu Ārsti”, dr. V.Godunova
- Paraugs: *chorion villi*
 - 9. – 13. grūtniecības nedēļā
 - “Jūsu Ārsti”, dr. V.Godunova

Hereditārā hemohromatoze

Primārais defekts - dzelzs metabolisma traucējumi

I Pastiprināta dzelzs absorbcija zarnu traktā

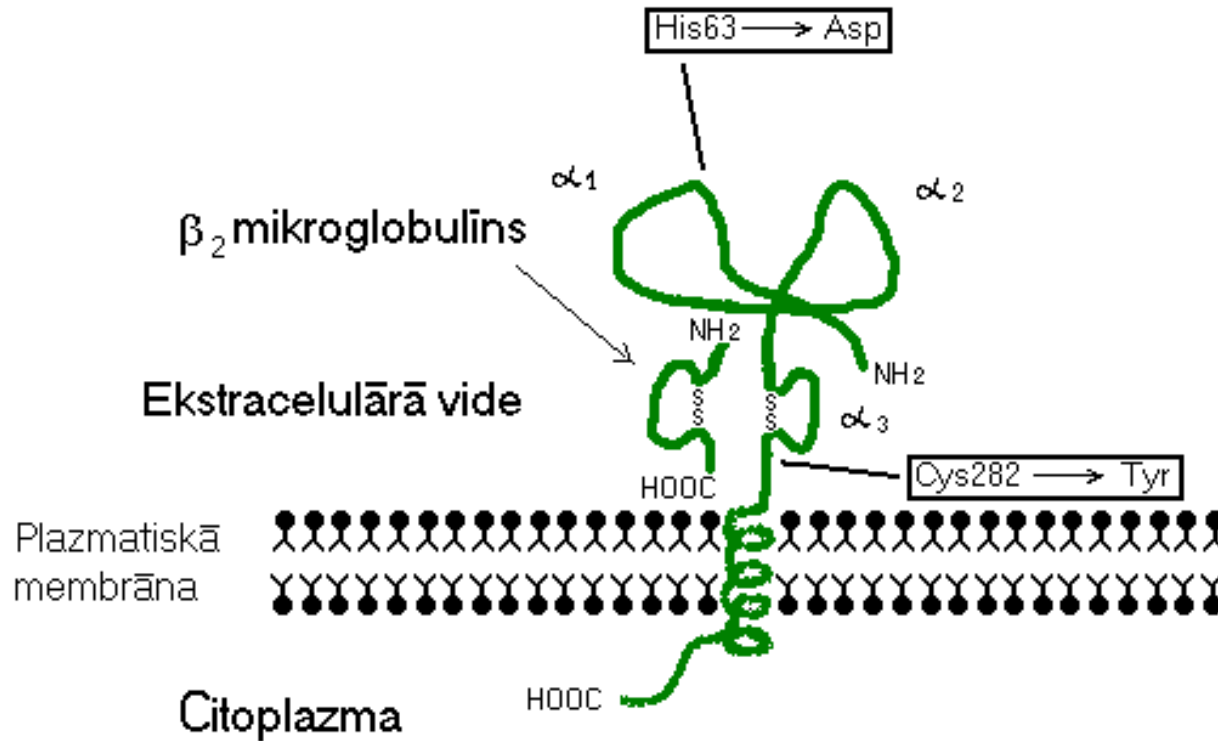
- Hereditāra ar gēnu HFE saistītā hemohromatoze (HH)
- Hereditāra ar gēnu HFE nesaistīta hemohromatoze (iesaistītie gēni HAMP, TFR2, SLC40A1)
- Juvenīla hemohromatoze (gēns HJV)
- Afrikāņu dzelzs uzkrāšanās slimība

II Traucēts dzelzs intra- un ekstracelulārais transports

- hipotransferinēmija / atransferinēmija
- Aceruloplazminēmija

III Neskaidras patoģenēzes dzelzs metabolisma defekti

Hereditārā hemohromatoze – saistīta ar gēnu HFE

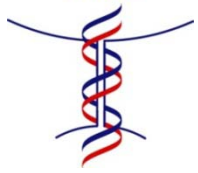


Hereditārā hemohromatoze

- 2 būtiskas mutācijas gēnā HFE:
 - **G845A** (C282Y) – likvidē disulfīdu saiti, kas nepieciešama sasaistei ar beta-2-mikroglobulīnu
 - **C187G** (H63D) – izjauc mijiedarbību ar transferīna receptoru
- Rezultāts: pastiprināta Fe uzkrāšanās aknās u.c. orgānos
- Diagnostika: pamatā bioķīmiskie izmeklējumi
- Precīza metode apstiprināšanai: DNS sekvenēšana

Hereditārā hemohromatoze

- Siekalu paraugs (uztriepe no mutes gļotādas); der jebkurš audu paraugs
- DNS izolēšana, PCR, sekvenēšana
- Rezultāta paziņošana ārstam / pacientam
- iespējama “neklātienēs” testēšana – paraugi pa pastu
- Izmaksas: ar ĢĀ nosūtījumu – sedz NVD



Paternitātes tests

- Nosaka radniecību – arī maternitāti
- Izmaksas: Ls 240 (3 pers.); Ls 210 (2 pers.); Ls 90 (genotips)
- Metodes pamatā – 15 DNS lokusu specifisku ģenētisko marķieru (STR) analīze
 - Pozitīvs rezultāts: ticamība vismaz 99,999%; negatīvs rezultāts: 100%
- Laiks: 5 darba dienas
- Paraugi
 - Siekalas (uztriepe no mutes gļotādas)
 - Asinis, jebkurš šūnas saturošs materiāls (izsmēķi, knupīši, mati ar sakni, etc.)
- Oficiālas ekspertīzes visām Latvijas tiesām civillietās – sertificēti tiesu eksperti
- Anonīmi testi, paraugi pa pastu etc.



Iedzimtā krūts un olnīcu vēža riska noteikšana

- Latvijā stabili ieņem pirmo vietu saslimstības un mirstības ziņā starp onkoloģiskajām saslimšanām sievietēm
- Latvijā 90% iedzimtā krūts vēža gadījumu ir kāda no izplatītākajām mutācijām gēnā BRCA1:
 - eksonā 2: 185delAG
 - eksonā 5: T(300)G
 - eksonā 11: 4154delA
 - eksonā 20: 5382insC

Iedzimtā krūts un olnīcu vēža riska noteikšana Ieguvumi



- Laicīga predisponētības noteikšana krūts/olnīcu vēža attīstībai
- Sievietēm – savlaicīga profilaktiskā aprūpe
- Onkologiem – optimālas terapijas izvēle, pastiprināta uzmanība gadījumiem ģimenē, iespēja novērst vai savlaicīgi detektēt recidīvu
- Izslēgt mutācijas ģimenes locekļiem, kas nav to pārmantojuši
- Radīt psiholoģisku atvieglojumu tām sievietēm, kuru radniecības slimības ar krūts vai olnīcu vēzi



Paldies!

Jūsu jautājumi?



SIA GenEra

Rīgā, Rātsupītes ielā 1

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Tālrunis 6742 5241

www.genera.lv