

SEKVENCIRANJE CELOG GENOMA – PRAKTIČNA OGRANIČENJA I ETIČKE DILEME

Vida Jeremić¹, Karel Turza¹

¹ Katedra humanističkih nauka, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

I. Projekat ljudskog genoma i nove tehnologije sekvenciranja genoma

Kada je 2003. godine uspešno završen projekat sekvenciranja ljudskog genoma (*Human Genome Project*), naučna, ali i šira javnost su sa velikim entuzijazmom prihvatile obećanje o revolucionarnom značaju koji će šifra genoma imati za zdravlje i život ljudi, i čovečanstvo uopšte. Jedan od vodećih naučnika na ovom projektu, Francis S. Collins [Francis S. Collins] u svom govoru pred Američkim kongresom, prilikom svečanog objavljivanja rezultata projekta, izložio je svoje očekivanje da će u narednih deset godina prediktivno genetsko testiranje biti moguće za najčešća oboljenja, tako da će svako od nas moći da dobije informaciju o pojedinačnim rizicima za najčešće bolesti i u skladu sa tim preduzme mere prevencije pravovremeno [1]. Dalje, Collins je najavio i da će do 2020. godine lekovi prilagođeni genskoj strukturi biti dostupni za dijabetes, Alchajmerovu bolest, hipertenziju, i mnoge druge. Takođe, i terapija kancera će se značajno unaprediti, jer će genetska informacija o pacijentu omogućiti individualno prilagođavanje terapije, a dijagnoza i terapija mentalnih oboljenja biće kompletno transformisane.

Sekvenciranje ljudskog genoma trajalo je više od deset godina i koštalo 2,7 milijardi dolara. U međuvremenu, nova generacija tehnologija sekvenciranja (*next generation sequencing – NGS*) je razvijena, tako da je danas individualni genom moguće sekvencirati za vremenski period kraći od nedelju dana, po ceni od 5,000 - 10,000 dolara(2). Predviđanja su da će u skorijoj budućnosti biti moguće sekvencirati genom po ceni od svega 1000 dolara, što implicira da će ova tehnologija postati priuštv klinički alat(3).

Sekvenciranje genoma je određivanje redosleda nukleotida u DNK lancu, koje je do skoro rađeno tradicionalnim, Sangerovim metodom, koji je korišćen i u Projektu ljudskog genoma. Primenom Sangerovog metoda za sekvenciranje genoma jedne osobe potrebne su godine. Sekvenciranje nove generacije je neuporedivo brži i jeftiniji metod, prisutan od 2009. godine kada su prvi aparati za sekvenciranje postali dostupni na tržištu. Nova tehnolo-

gija sekvenciranja podrazumeva automatizovan proces masivnog paralelnog sekvenciranja velikog broja baznih parova, i primenu bioinformatičke obrade dobijenih podataka(4). Najpre se čitav genom razbija na manje delove DNK, a potom se ti delići DNK vezuju za specijalne adaptore za čitanje DNK tokom sitneze. Ovaj princip sekvenciranja se još zove „sekvenciranje putem sinteze“. Potrebno je razlikovati sekvenciranje čitavog genoma (*Whole genome sequencing – WGS*) i sekvenciranje čitavog egzoma¹ (*Whole exome sequencing – WES*). Prilikom WGS-a genomska DNK pacijenta se izoluje, i određuje se kompletna sekvenca. Bioinformatički kompjuterski program poredi sekvenca pacijenta sa referentnom sekvencom, beleži odstupanja (varijante) i pretražuje baze podataka ne bi li pronašao iste varijante i utvrdio njihovu kliničku značajnost. Prosečnom pacijentu se metodom WGS-a otkrije 3-4 miliona varijanti, od kojih nakon poređenja sa bazom podataka preostane nekoliko stotina varijanti od mogućeg kliničkog značaja. WES je fokusiraniji i jeftiniji pristup, jer egzom predstavlja kodirajući deo genoma i obuhvata svega 1% ukupnog genoma, a poznato je da se više od 85% poznatih mutacija uzročnika bolesti nalazi upravo u egzonskim sekvencama.

Termin „genomika“ definiše se kao sistematsko izučavanje ljudskog genoma. Dešifrovanje (sekvenciranje) genoma samo je prvi korak u razumevanju kako zapravo genom funkcioniše, i kako informacije u DNK regulišu i oblikuju život. Ono što sledi i čime se naučnici različitih profila uveliko bave, je dobijanje smislenih informacija iz DNK sekvence. Pre svega potrebno je da definitivno utvrdimo funkcije gena regulatornih delova DNK, zatim da pronađemo varijacije u DNK sekvenci koje postoje u populaciji, i da utvrdimo značaj ovih varijacija, tj. da li su varijacije povezane sa povećanim rizicima od određenih bolesti. Od ništa manjeg značaja je i utvrđivanje mehanizama interakcije DNK i sredine, tj. funkcije i značaja epigenoma². Novi pristup u genomici je moguć zahvaljujući novim tehnologijama sekvenciranja, i podrazumeva da se čitav genom analizira u cilju detektovanja svih mogućih varijacija, koje bi zatim studijama na velikim populacionim uzorcima bile povezivane sa određenim karakteristikama i patološkim stanjima (tzv.

¹Egzom je zbirni naziv za egzome – kodirajuće delove DNK

²Epigenom obuhvata hemijske grupe koje su vezane za DNK i koje regulišu aktivnost gena. Ove hemijske grupe nisu deo DNK, već se 'kače' za nju pod uticajem sredine, na taj način prilagođavajući ekspresiju gena okruženju. Najčešći tip epigenomske regulacije je metilacija tj. 'kačenje' metil-grupa na delove DNK.

„*genom wide association studies*“). Kako bi se omogućio što veći uzorak i što veća količina podataka, formiraju se međunarodne baze podataka, dostupne naučnicima i lekarima. Kao logičan nastavak projekta ljudskog genoma oformljen je ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) projekat, čiji je cilj da interpretira sekvencu humane DNK i formira bazu – enciklopediju DNK.

II. Klinička primena sekvenciranja genoma

Prve primene novih tehnologija sekvenciranja zabeležene su krajem prethodne decenije, u oblastima dijagnostike retkih naslednih bolesti, ispitivanja kompleksnih oboljenja i profilisanja tumora radi prilagođavanja terapijskih protokola(5). Tradicionalno genetsko testiranje ograničeno je na mali broj gena koji se biraju na osnovu prethodno utvrđene verovatnoće da će u datom oboljenju biti mutirani. Ovakav pristup ima brojna ograničenja, jer su mnoge nasledne bolesti genski heterogene, te potraga za genom-izazivačem može biti preduga i preskupa.

U ovom trenutku sekvenciranje čitavog genoma najveću primenu ima u dijagnostici retkih nejasnih kliničkih stanja, sa atipičnim kliničkim manifestacijama, a kod kojih rutinska klinička i laboratorijska dijagnostika nije dovela do identifikovanja uzroka ni prirode oboljenja. Najčešće su u pitanju genski heterogena obojenja, kao što su intelektualna ometenost, kongenitalne malformacije i mitohondrijalne disfunkcije [6]. Ranije su ovakvi pacijenti bili podvrgavani ciljanom genetskom testiranju, što je podrazumevalo da se za svaki ciljani gen radi pojedinačni test, a s obzirom na atipičnu kliničku sliku, targetiranje gena uzročnika često je bilo nemoguće. Primena novih tehnologija sekvenciranja omogućava da se istovremeno sekvenciraju svi poznati geni povezani sa određenom grupom oboljenja, ponekad i čitav genom, što znatno olakšava identifikovanje genskih varijacija kao uzročnika bolesti. Navešćemo primer dijagnostike u jedinicama neonatalne intenzivne nege, gde je primena sekvenciranja skratila vreme koje je ranije bilo potrebno da se obave svi dijagnostički testovi za retke, monogenske bolesti sa 19 dana na svega 50 sati [7].

Druga važna primena novih tehnika sekvenciranja je u genomskoj analizi tumora. Uzmimo za primer profilisanje tumora dojke, gde se dektovanjem genetskih varijanti može precizno klasifikovati tumor, ali i predvideti prognoza i odgovor tumora na terapiju. U skladu sa rezultatima genetske analize bira se i terapija koja će suzbiti tumor. Predviđa se da će u skorijoj budućnosti biti moguće genetsko profilisanje svih vrsta maligniteta, te da će se ciljanom terapijom njihov rast držati pod kontrolom. Kao

ilustraciju sve većeg interesovanja i ulaganja u primenu sekvenciranja u lečenju kancera navešćemo novi termin – „genomika kancera“.

Smatra se da je primena sekvenciranja celog genoma svrsishodna i opravdana u sledećim kliničkim situacijama: 1) kada fenotip porodice ili porodična anamneza sugerišu određenu genetsku etiologiju, ali fenotip samog pacijenta odstupa od fenotipa koji se očekuje za date gene; 2) kada pacijent pokazuje kliničku sliku genetskog oboljenja koje dokazano podrazumeva visok stepen genske heterogenosti, tako da bi sekvenciranje celog genoma bilo značajno jednostavnije nego testiranje jednog po jednog poznatog gena; 3) kada pacijent pokazuje kliničku sliku određenog genskog oboljenja, ali dostupni genetski testovi za dato oboljenje nisu potvrdili dijagnozu [8].

Predviđanja kažu da će sekvenciranje genoma svoju primenu naći u skriningu novorođenčadi, kao i u neinvazivnom prenatalnom skriningu, a pojedine prognoze čak kažu da će u skorijoj budućnosti svakom novorođenčetu biti sekvenciran genom.

III. Praktična ograničenja primene sekvenciranja genoma u kliničkoj praksi

Ipak, iako su nove tehnike sekvenciranja i dešifrovanje genoma dočekani sa velikim entuzijazmom u javnosti, uz velika obećanja od strane naučnika kako će se pristup dijagnostici i lečenju kompletno promeniti, realnost je pokazala da nove tehnike imaju značajna ograničenja. Sekvenciranje genoma dalo nam je „šifru“, a sledeći korak – „dešifrovanje“, ispostavio se kao ništa manje zahtevan i komplikovan korak, iznedrivši pregršt praktičnih i etičkih dilema i izazova. Na početku je izgledalo da nas samo korak deli od utvrđivanja konkretnih gena - uzročnika najučestalijih bolesti u ljudskoj populaciji, i da će se na osnovu genske predispozicije lako moći primeniti efikasne mere prevencije. Početne zablude o sudbonosnim implikacijama genomike, uzrokovane determinističkim, uprošćenim shvatanjem gena, pored preteranog oduševljenja u naučnim krugovima izazvale su i distopijska³ tumačenja u javnosti u kojima dominira strah od genetske diskriminacije i nove „eugenike“. Ipak, realnost je pokazala da je većina najučestalijih bolesti kompleksna, uzrokovana međudejstvom genetskih i faktora okoline, a da za najveći broj genetskih varijanti još uvek ne možemo sa sigurnošću tvrditi da imaju veze sa nekom patološkom fenotipskom karakteristikom. U ovom poglavlju prođiskutovaćemo o nekim da od najvažnijih praktičnih ograničenja u primeni novih tehnika sekvenciranja, koja su često sama i uzrok etičkih nedoumica.

³ Distopija - negativno viđenje budućnosti, opozit od utopije. Jedan od primera distopičnog viđenja budućnosti sa posebnim akcentom na značaj genetike je naučno-fantastični film *Gattaca* (1997), koji opisuje društvo podeljeno na višu i nižu klasu prema karakteristikama DNK – samo pojedinci čija DNK sadrži superiorne gene imaju pravo da uživaju u društvenim privilegijama.

III.1. Klinička validnost i klinička korisnost

Pojmovi analitička validnost (*analytical validity*), klinička validnost (*clinical validity*) i klinička korisnost (*clinical utility*) koriste se prilikom evaluacije nekog dijagnostičkog testa. Analitička validnost, tj. sposobnost genetskog testa da tačno i pouzdano meri genotipsku karakteristiku od interesa, dokazano je visoka u slučaju novih tehnologija sekvenciranja. Međutim, klinička validnost (tačnost sa kojom test može da predvidi prisustvo ili odsustvo fenotipske karakteristike ili oboljenja) nije još uvek adekvatno procenjena. Da bi genetski test bio klinički validan, mora postojati dovoljan nivo naučnih dokaza koji bi potvrdio vezu između određene genetske varijante i datog zdravstvenog stanja ili oboljenja. Klinička korisnost (povoljan uticaj koji upotreba određenog genetskog testa ima na zdravlje pacijenta, populaciju ili zdravstveni sistem) trebalo bi da bude centralni kriterijum prilikom odlučivanja da li da se određeni genetski test uvede u redovnu dijagnostiku u okviru zdravstvene zaštite [9]. Klinička korisnost većine dijagnostičkih testova baziranih na novim tehnikama sekvenciranja, pa ni sekvenciranja celog genoma nije još uvek evaluirana, iako su pokrenute inicijative da se sprovedu multicentrične studije na velikom broju pacijenata kako bi se procenila ukupna klinička korisnost WGS i WES, uključujući i komparaciju sa drugim vrstama skrininga i dijagnostike, i evaluaciju troškova [10].

Važan faktor koji otežava utvrđivanje kliničke korisnosti je varijabilna penetrantnost većine gena, koji u značajnom broju slučajeva uopšte ne moraju ispoljiti svoju aktivnost, kao i polimorfizam genskih varijanti, koji podrazumeva da mnoge genske varijante samo doprinose, ali nisu i dovoljne da izazovu ispoljavanje neke bolesti. Detektovanjem ovakvog polimorfizma kod pacijenta ne može se sa sigurnošću zaključiti da će se ispoljiti klinička slika, tako da je korisnost testiranja veoma problematična.

III.2. Interpretacija podataka

Kod pacijenata sa porodičnom istorijom bolesti ili specifičnim kliničnim fenotipom, nije teško ustanoviti da je određeni gen i prouzrokovatelj datog oboljenja. Međutim, kod novootkrivenih mutacija, naročito sa varijabilnom penetrantnošću, kao i kod najučestalijih oboljenja sa kompleksnom etiologijom (kardio-vaskularne bolesti, dijabetes...) prisustvo određene mutacije nema veliku prediktivnu moć [11]. Nakon sekvenciranja samo jednog ljudskog genoma utvrdi se 3-4 miliona varijanti, a sekvenciranjem egzoma 20 hiljada. Filtriranjem varijanti ostaje nekoliko stotina varijanti od potencijalnog kliničkog značaja, što je enormno veliki broj informacija i predstavlja veliko opterećenje i za pacijenta,

i za lekara, i za zdravstveni sistem [12]. Iako je zasad većina varijanti od nepoznatog kliničkog značaja, tj. ne postoji dokazana veza između date varijante i fenotipa, očekuje se da će se u narednom periodu zahvaljujući istraživanjima značajnom broju njih utvrditi klinička validnost. Postavlja se pitanje rukovanja ovakvim rezultatima, da li treba ove rezultate saopštiti pacijentima i njihovim porodicama, i na koji način, da li treba ove informacije uključiti u zdravstveni karton pacijenta, i kako. Ovo su samo neka od pitanja na koja još uvek nemamo odgovor. S obzirom na to da se jedino kroz naučna istraživanja i sistematsko katalogiziranje i povezivanje patogenosti sa mutacijama/varijantama može ispitati veza između ovih varijanti i zdravstvenih ishoda, svakako je potrebno dokumentovati ih i omogućiti pristup drugim istraživačima. Pokrenute su inicijative osnivanja dostupnih biobanki sekvenci i baza podataka, koje će se dopunjavati novim rezultatima o vezi genskih varijanti i fenotipskih karakteristika, i koje će biti dostupne istraživačima, ali i lekarima. Međutim, u slučaju da se naknadno utvrdi klinička značajnost određenih varijanti prisutnih u genomu pacijenata kojima je rađeno sekvenciranje genoma, mora se utvrditi sistem kojim će se ovi pacijenti ponovo kontaktirati i upućivati na dalje lečenje.

III.3. Čuvanje podataka

Praktičan problem čuvanja podataka nije ništa manje alarmantan od mnogih ozbiljnih etičkih dilema koje ćemo diskutovati kasnije. Prostor neophodan za skladištenje podataka dobijenih sekvenciranjem samo jednog genoma prevazilazi kapacitet prosečnog kućnog računara, a još uvek nije moguće pohraniti te podatke u postojeće elektronske medicinske kartone [6]. S obzirom na to da cena sekvenciranja ubrzano opada, a i sama tehnika sekvenciranja se usavršava, možemo pretpostaviti da će već u bližoj budućnosti biti jeftinije i praktičnije ponovo sekvencirati genom određenog pacijenta ukoliko su dodatne analize potrebne, nego čuvati sekvencu. Takođe, svako pohranjivanje podataka nosi sa sobom rizik od gubitka privatnosti, tako da se mora voditi računa o merama zaštite poverljivosti skladištenih podataka.

III.4. Troškovi (cena)

Iako cena samog sekvenciranja ubrzano opada, ne smemo zaboraviti prateće troškove koji mogu biti itekako veliki. S obzirom na to da se sekvenciranjem genoma dobijaju enormne količine podataka za kratko vreme, skladištenje i čuvanje podataka, bioinformatička analiza podataka, interpretacija rezultata značajno nadmašuju cenu samog sekvenciranja [13].

III.5. Edukacija zdravstvenih profesionalaca

Ukoliko sekvenciranje čitavog genoma bude uključeno u širu primenu u zdravstvenim sistemima, nezaobilazan korak je sistematska edukacija zdravstvenih profesionalaca u oblasti novih genetičkih tehnologija. U ovom trenutku čak ni osnovno znanje iz oblasti genetike prosečnog lekara nije na zavidnom nivou [14, 15]. Genetičko obrazovanje bi trebalo da se uključi u dodiplomske i postdiplomske kurikule na medicinskim fakultetima, sa akcentom na interpretativnim i komunikacionim veštinama, kako bi se medicinski profesionalci obučili da na pravi način pacijentima tumače i saopštavaju često komplikovane rezultate genetskog testiranja.

IV. Etičke dileme u primeni sekvenciranja celog genoma

Iako se smatra da informacija o sekvenci genoma predstavlja osnov presonalizovane medicine i da će se zahvaljujući ovoj tehnologiji terapija u budućnosti moći prilagoditi specifičnim potrebama pacijenata, trenutna situacija daleko je od idealne. U ovom odeljku predstavimo neke od najvažnijih etičkih dilema, od kojih su neke zajedničke većini novih bio-medicinskih tehnologija, a neke su specifične za genomiku.

IV.1. Informisani pristanak u kliničkoj praksi i biomedicinskim istraživanjima

Informisani pristanak koji podrazumeva adekvatno informisanje pacijenta o svim značajnim aspektima medicinskog tretmana, i pacijentovo dobrovoljno pristajanje nakon razmatranja dobijenih informacija, predstavlja osnov dobre kliničke prakse. Informisani pristanak je otelotvorenje etičkog principa poštovanja autonomije pacijenta, tj. poštovanja prava pacijenta na samoodređenje. U slučaju sekvenciranja genoma postizanje balansa između pružanja dovoljno informacija da bi se donela razumna odluka, sa jedne strane, i preopterećenja pacijenta komplikovanim i još uvek nedovoljno razumljivim informacijama, sa druge strane, predstavlja ozbiljan praktični problem [11]. Imajući u vidu da ni sami naučnici i lekari ne mogu kompletno predvideti sve moguće implikacije testiranja, i da i dalje postoji visok nivo neizvesnosti i nepouzdanosti kada su ishodi genetskog testiranja u pitanju, postavlja se pitanje koja količina informacija o mogućim posledicama sekvenciranja genoma je dovoljna za pacijenta. Prilikom informisanja pacijenta lekari moraju biti obazrivi, i na svaki način se potruditi da izbegnu pružanje lažne nade, ili, pak, neosnovano zastrašivanje. Drugo pitanje povezano sa prethodnim je:

koji rezultati od nekoliko stotina potencijalno relevantnih dobijenih sekvenciranjem genoma će se saopštiti pacijentu? Preporučuje se da se tokom procesa informisanog pristanka sa pacijentom razjasne sve mogućnosti i obim rezultata, te da se pacijent unapred izjasni koje rezultate bi želeo, a koje ne bi želeo da mu budu saopšteni. „Želja da se ne zna“ takođe je deo autonomije pacijenta, i mora se poštovati [13].

S obzirom na to da je genomika još uvek na samom početku dekodiranja genoma, i da su istraživanja povezanosti genoma i zdravstvenih ishoda u punom zamahu, praksa je da se genomi sekvencirani radi postavljanja dijagnoze u kliničkoj praksi dalje koriste u istraživačke svrhe. Logika medicinske etike nalaže da se od pacijenata čiji će se sekvencirani genomi uključiti u istraživanje mora dobiti informisani pristanak za svaku dalju upotrebu genoma. Međutim, s obzirom na to da ni sam istraživač u trenutku pristanka ne može predvideti sve mogućnosti primene genoma pacijenta, postavlja se pitanje na šta pacijent pristaje, i da li se svaki put kada iskrsne nova mogućnost analize i primene rezultata sekvenciranja njegovog genoma treba ponovo kontaktirati pacijenta i ponovo tražiti njegov pristanak. Jasno je da bi ovakva praksa predstavljala veliko praktično opterećenje i veliki trošak. Jedno od rešenja bi bilo da pacijent potpiše „široki pristanak“, čime pristaje na širok spektar mogućih budućih upotreba njegovog genoma. Najekstremnije rešenje je „blanko pristanak“, čijim potpisivanjem pacijent daje opšti pristanak na svaku buduću upotrebu njegovog genoma. Mnogi autori, međutim smatraju da se ovakav pristanak ne može nazvati informisanim, jer bez informacija o prirodi budućih istraživanja subjekt ne može valjano proceniti koristi i rizike od takvog istraživanja, te ne može ni doneti adekvatnu odluku. S druge strane, odgovor na ovu primedbu bio bi da su rizici od učešća u ovakvim studijama zanemarljivi. Da rizici ipak postoje videćemo na primeru genetskog testiranja u plemenu Hawatsupai indijanaca, koje je započeto 1990. godine, kada je oko 200 uzoraka krvi sakupljeno od članova plemena Hawatsupai, radi izučavanja genskih osnova dijabetesa, za šta je dobio pristanak od ispitanika (16). Međutim, istraživači su koristili rezultate genetskih analiza ovih uzoraka i za istraživanja koja nisu imala veze sa dijabetesom, i takođe su ih ustupali drugim istraživačima za različita istraživanja. Ono što je članovima plemena najviše smetalo, i zbog čega su i podigli tužbu protiv istraživača, je upotreba njihovih uzorka u studiji genskih osnova shizofrenije, čija je posledica mogla da bude stigmatizacija Hawatsupai plemena. Takođe, strah od stigmatizacije i narušavanja kulturnih verovanja izazvan je kod članova plemena i studijom o genetskim posledicama ukrštanja bliskih srodnika, a genetička studija porekla koja je rađena na uzorcima članova plemena ukazala je da dotadašnje verovanje o pore-

klu plemena nije istinito, što je dovelo u pitanje čitav kulturni sistem i folklor plemena. Pleme nije bilo upoznato sa činjenicom da će se na njihovim uzorcima vršiti ovakva ispitivanja, te je njihov spor sadržao tužbe zbog namerne obmane, nemara i zbog kršenja obaveze čuvanja poverljivosti podataka. Nakon nekoliko godina suđenja istraživačka kompanija je ponudila članovima plemena finansijsku kompenzaciju i formalno izvinjenje, tako da spor nije nikada sudski rešen. Ipak, kao posledica ovog slučaja ostala je dilema kakav informisani pristanak je adekvatan u situacijama kada se za uzorke uzete za jednu vrstu genetske analize utvrdi da se mogu primeniti u drugim studijama u budućnosti, a što se ne može predvideti u trenutku pristanka. Takođe, otvoreno je i pitanje vlasništva nad uzorcima, i da li se uzorci mogu smatrati svojinom.

IV.2. Saopštavanje rezultata, poverljivost informacija, porodični odnosi

Značajno pitanje kada je analiza celog genoma posredi jeste da li pacijenta treba obavestavati o pronađenim genetskim varijantama koje ne impliciraju kliničku intervenciju, tj. za koje ne postoji ni tretman ni prevencija. Da li je moralna dužnost lekara da saopšti pacijentu sve rezultate dobijene analizom genoma, bez obzira na njihovu kliničku značajnost? Poštovanje autonomije pacijenta podrazumeva da se pacijentu saopšte sve važne informacije, ali moramo na umu imati psihološki stres koji neizvesnost i nerazumevanje posledica ovakvih rezultata mogu izazvati kod pacijenta. Grupa autora je ponudila klasifikaciju rezultata na osnovu koje kliničar može odlučivati o tome koje rezultate da saopšti pacijentu: 1) rezultati kod kojih je moguća klinička intervencija kategorički se moraju saopštiti pacijentu; 2) rezultati od nejasnog ili nepostojećeg kliničkog značaja se ne saopštavaju pacijentu (u ovu grupu još uvek spada većina varijanti dobijenih sekvenciranjem genoma) i 3) rezultati koji su klinički validni, ali kod kojih ne postoji tretman, saopštavanje ovih rezultata zavisi od želje pacijenta, koja se utvrđuje pre testiranja (npr. Hantingtonova bolest) [17].

Saopštavanje rezultata problematično je i kada su u pitanju kompleksna oboljenja, kod kojih genska predispozicija ima samo udeo u etiologiji, pored faktora okruženja i epigenetskih faktora. Utvrđivanje genske predispozicije za, na primer, ishemijsku bolest srca, daje određeni procenat za koliko dati pacijent ima veću ili manju šansu da oboli od date bolesti, u odnosu na opštu populaciju. Proteklih godina u SAD i Britaniji pojavio se značajan broj kompanija koje nude usluge genetskog testiranja preko interneta, koje se vrši direktno, bez učešća lekara i genetskih savetnika (*direct-to-consumer genetic testing*). Pacijent šalje svoj uzorak DNK dobijen iz bu-

kalne sluzokože, a kompanija mu nakon urađene analize vraća sekvenciran genom i izračunate predispozicije za različite bolesti. Na osnovu predispozicija klijentu se daju saveti o merama prevencije koje je neophodno da preduzme kako bi izbegao ispoljavanje bolesti, ali bez direktnog kontakta sa lekarom ili genetičarom. Kada se pacijent nađe sa spiskom bolesti i brojevima koji označavaju šanse obolevanja, a bez valjane interpretacije datih rezultata, lako je zamisliti osećanje neizvesnosti i anksioznosti i posledični psihološki stres koji dobijene informacije mogu izazvati kod njega [12]. Takođe, zamislite pacijenta kome je utvrđeno da su mu šanse za obolevanje od kardiovaskularnih bolesti manje od proseka, i koji na osnovu toga odlučuje da prestane sa merama prevencije koje je do tad upražnjavao, jer smatra da mu to više nije potrebno. S obzirom na to da heterogenu etiologiju kardiovaskularnih bolesti, može se desiti da takav pacijent nesmotrenim ponašanjem i nebrigom o faktorima rizika sebi značajno poveća šanse za obolevanje, a sve kao posledica pogrešnog tumačenja genetskog testa. Smatra se da se genetsko testiranje ne sme raditi bez prethodnog konsultovanja sa genetskim savetnikom, koji pored znanja o genetici i genetskom testiranju poseduje i veštine psihološkog savetovanja.

Neophodno je spomenuti i pitanje poverljivosti informacija dobijenih sekvenciranjem genoma. Primer na kome se najbolje vidi problematičnost očuvanja privatnosti podataka je Projekat 100,000 genoma, organizovan u Velikoj Britaniji sa ciljem da se uspostavi baza genoma koja će predstavljati osnovu za buduću nacionalnu bazu genetskih podataka. Baza će biti dostupna svim istraživačima i naučnicima, kako bi se stimulisala saradnja i naučni progres. Međutim, podaci o subjektima čiji su genomi uključeni u bazu, iako kodirani i anonimni, ipak mogu biti povezani sa samim subjektima, jer je neophodno pratiti povezanost genetskih podataka sa kliničkim ishodima. Međutim, prilikom informisanja o projektu, a pre davanja pristanka, subjektima je rečeno da će njihovi podaci biti kompletno anonimni. Na ovaj način grubo se krši autonomija subjekata, jer bi možda neki od njih, da su bili obavesteni o tome da će njihovi podaci i identitet biti dostupni trećim licima (istraživačima, pa čak i predstavnicima komercijalnog sektora i industrije) odustali od učešća u projektu. Videli smo na primeru Hawatsupai Indijanaca na koji način može biti naneta šteta subjektima ukoliko se dozvoli mogućnost njihovog identifikovanja. S druge strane, identifikovanje je neophodno radi utvrđivanja povezanosti genotipa i zdravlja, te se balans mora napraviti između zahteva nauke i poštovanja autonomije ispitanika, a to se može postići otvorenim i poštenim informisanjem ispitanika.

Druga etička dilema vezana za poverljivost genetskih podataka javlja se u situaciji kada je rezultat dobijen

genetskom analizom od značaja za srodnike pacijenta. Lekar/genetičar se može naći u neugodnoj situaciji između striktno želje pacijenta da se rezultati čuvaju pod okriljem lekarske tajne, i sa druge strane, pacijentovih srodnika koji mogu biti pogođeni genima visokog rizika i kojima bi informacija o riziku bila od velikog značaja. Da li lekar ima etičku dužnost da srodnike pacijenta obavesti o rizicima ostaje nerešena dilema.

IV.3. Slučajni nalazi

Gotovo uvek se prilikom sekvenciranja genoma dobijaju rezultati za kojima se nije ni tragalo, koji nisu u vezi sa kliničkim razlogom zbog koga je sekvenciranje preduzeto. Na primer, prilikom traženja genetskog uzroka mentalne retardacije, može se desiti da se usput identifikuje varijanta gena povezana sa povećanim rizikom od karcinoma [18]. Ovakvi nalazi se zovu „slučajni nalazi“ (*incidental findings*), često predstavljaju neugodno iznenađenje i za lekare i za pacijente, a mišljenja su podeljena kada je u pitanju njihovo saopštavanje pacijentima. Američki koledž za medicinsku genetiku (ACMG) izdao je preporuke svim laboratorijama koje nude usluge sekvenciranja genoma da se prilikom svakog sekvenciranja iskoristi prilika i uradi skrining na mutacije u 56 gena za koje je dokazana klinička značajnost, bez obzira šta je bio početni razlog sekvenciranja(19). Takođe, ovo udruženje izdalo je i listu gena čije se mutacije, ukoliko se slučajno otkriju u genomu moraju saopštiti pacijentu. Ovakav stav ACMG-a izazvao je brojne kritike, bazirane pre svega na pravu pacijenta na izbor „da ne zna“ („*right not to know*“) koje se mora poštovati, tako da je društvo ubrzo objavilo amandman, koji nalaže da se odluka o tome da li će se slučajni nalazi saopštiti ili ne donese zajedno sa pacijentom pre testiranja. Stav da se treba poštovati pacijentovo pravo „da ne zna“, i da treba smanjiti mogućnost dobijanja neželjenih nalaza pomoću korišćenja filtera i targetiranim sekvenciranjem zauzima Evropsko udruženje za humanu genetiku (ESHG) [18]. Ovo udruženje takođe sugeriše da se mogućnost dobijanja slučajnih nalaza predoči pacijentima pre testiranja, i unapred dobije njihov stav o saopštavanju takvih rezultata, uključujući i stav „da ne zna“.

V. Zaključak

Iako je sekvenciranje ljudskog genoma uspešno okončano, a zahvaljujući novih tehnikama sekvenciranja sam proces ubrzan i pojednostavljen, genetičari i medicinski profesionalci našli su se pred velikim izazovima i dilemama prilikom transponovanja ove nesumnjivo revolucionarne tehnologije u kliničku praksu. Pre svega, tumačenje genomske sekvence pokazalo se kao ništa manje zahtevan zadatak, koji podrazumeva

sprovođenje velikih multicentričnih studija ne bi li se varijante gena povezale sa zdravstvenim ishodom, i time utvrdile klinička validnost i korisnost ove tehnologije. Kao što smo videli, brojna druga praktična ograničenja su prisutna, praćena još uvek nerešenim etičkim dilemama, pre svega vezanim za pitanja informisanog pristanka, saopštavanje rezultata, poverljivosti podataka i problema slučajnih nalaza. U međuvremenu, zahvaljujući medijima, ali i samim naučnicima, u široj javnosti možemo čuti preterano entuzijastična predviđanja da će sekvenciranje genoma revolucionarno promeniti pristup u dijagnostici, lečenju i prevenciji čak i najtežih bolesti, dok su istovremeno prisutna i pesimistička distopijska predviđanja o novoj eugenici. S obzirom na ove brojne zablude i predrasude koje vladaju u javnosti o novim genetskim tehnologijama, neophodno je da se uspostavi kontinuirani dijalog između naučnika i zdravstvenih profesionalaca o implikacijama genomike, kako bi se očekivanja i sumnje sveli na realističnu meru. Sve interpretacije moraju biti zasnovane na potvrđenim naučnim činjenicama. Takođe, s obzirom na značaj formiranja velikih baza podataka, bez kojih utvrđivanje kliničke korisnosti WGS-a i WES-a nije moguće, javnost se mora upoznati sa svim merama zaštite privatnosti i prevencije zloupotrebe genetskih podataka.

Reference

1. The Future of Genomics. Statement of Francis S. Collins, NIH National Human Genome Research Institute. Testimony Before the Subcommittee on Health Committee on Energy and Commerce United States House of Representatives, May 22, 2003.
2. Wetterstrand KA. DNA sequencing cost: data from the NHGRI Large-Scale Genome sequencing Program. <http://www.genome.gov/sequencingcosts>. Accessed April 15, 2015.
3. Lohmann K, Klein C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics* 2014; 11:699-707.
4. Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*. 2011;38(3):95-109. doi:10.1016/j.jgg.2011.02.003.
5. Ayuso, C, Millan JM, Mancheno M, Dal-Re R. Informed consent for whole-genome sequencing studies in the clinical setting. Proposed recommendation on essential content and process. *European Journal of Human Genetics* 2013; 21:1054.
6. Johansen Taber KA, Dickinson BD, Wilson M. The promise and challenges of next-generation genome sequencing for clinical care. *JAMA Internal medicine* 2014; 174(2):275-280.
7. Saunders CJ, Miller NA, Soden SE, et al. Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units. *Sci Transl Med*. 2012; 4(154):ra135

8. Guttmacher AE, Porteous ME, Mclernez JD. Educating health-care professionals about genetics and genomics. *Nat Rev Genet.* 2007; 8(2):151-157.
9. Ros Hastings, Guido de Wert, Brian Fowler et al. The changing landscape of genetic testing and its impact on clinical and laboratory services and research in Europe. *European Journal of Human Genetics* (2012) 20:911–916;
10. Johansen Taber KA, Dickinson BD, Wilson M. The promise and challenges of next-generation genome sequencing for clinical care. *JAMA Internal medicine* 2014; 174(2): 275-280.
11. Lucassen A, Houlston RS. The challenge of genome analysis in the health care setting. *Genes* 2014; 5:576-585.
12. Lohmann K, Klein C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics* 2014; 11:699-707.
13. Pinxten W, Howard HC. Ethical issues raised by whole genome sequencing. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2014; 28:269-279.
14. Harvey EK, Fogel CE, Peyrot M, Christensen KD, Terry SF, Mclnerney JD. Providers' knowledge of genetics: a survey of 5915 individuals and families with genetic conditions. *Genet Med* 2007; 9(5):259-267.
15. Salary K. The dawning era of personalized medicine exposes a gap in medical education. *Plos Med.* 2009; 6(8):e1000138.
16. Mello MM, Wolf LE. The Havasupai Indian Tribe Case — Lessons for Research Involving Stored Biologic Samples. *NEJM* 2010; 363 (3):204-207.
17. Berg JS, Khoury MJ, Evans JP. Deploying whole genome sequencing in clinical practice and public health: meeting the challenge one bin a time. *Genet Med* 2011; 13(6): 499-504.
18. Van El CG, Cornel MC, Borry P, Hastings RJ, Fellman F, Hodgson SV, et al. Whole genome sequencing in health care: recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet* 2013; 21:580-4.
19. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med* 2013; 15:565-574.