



НУТРИГЕНЕТИЧНИ ТЕСТОВЕ ЗА НАУЧНА И КОМЕРСИАЛНА УПОТРЕБА

ас. Елена Кузова,
Национален център по общественото здраве и
анализи

май, 2020 г.

Информационният материал е предназначен за лични
лекари, диетолози, нутриционисти и всички, които се
занимават и интересуват от науката за храните и
храненето

Въведение в (нутри)генетичното тестване

“Вероятността е прогнозиране и потенциал, а не съвършенство.”

Биологията рядко ни дава окончателен прост отговор на въпроси като:



Коя е най-добрата диета?



Коя е най-добрата рутинна тренировка?



Ще отслабна ли с кетодиета?



Гладуването ще ми навреди ли?



Да ям или не gluten-съдържащи храни?

Така че всяка услуга за генетично тестване (заедно с всяка книга, уебсайт или коучинг услуга), която обещава да ви осигури **перфектен план** за хранене или режим на тренировка, или **точно да предскажете вашите рискове** за здравето, е подвеждаща.



Генетичната информация може да ни насочи как да променим поведението си (ако искаме) и какви могат да бъдат последствията от тази промяна.

Да подходим с внимание и критична мисъл...

Когато става въпрос за нутригенетични тестове, трябва да имаме предвид някои основни идеи, базирани на знанията ни за генетиката, например:

Генетичните взаимодействия са комплексни и много обширни и повечето от тях все още не са картографирани.



Тази област на изследване все още е много нова.

Мутации и промени в нашия генетичен код се случват непрекъснато. Понякога те имат значение. Понякога не.



Генетиката не е цялата история. Много физиологични взаимодействия не са генетични.



Все още не можем да правим категорични прогнози или рестрикции за дадена храна или да предпишем дадена диета само в зависимост от резултата от нутригенетичен тест.

Финансови параметри на генетичните тестове

В днешно време генетичните тестове стават все по-достъпни. Благодарение на молекулярно-генетичните технологии, които се развиват бързо и стават все по-евтини, прецизни и достъпни.

2001

Секвениране на пълен човешки геном (цялата ДНК в ядрото на човешка клетка) струва около \$100 млн.

2011

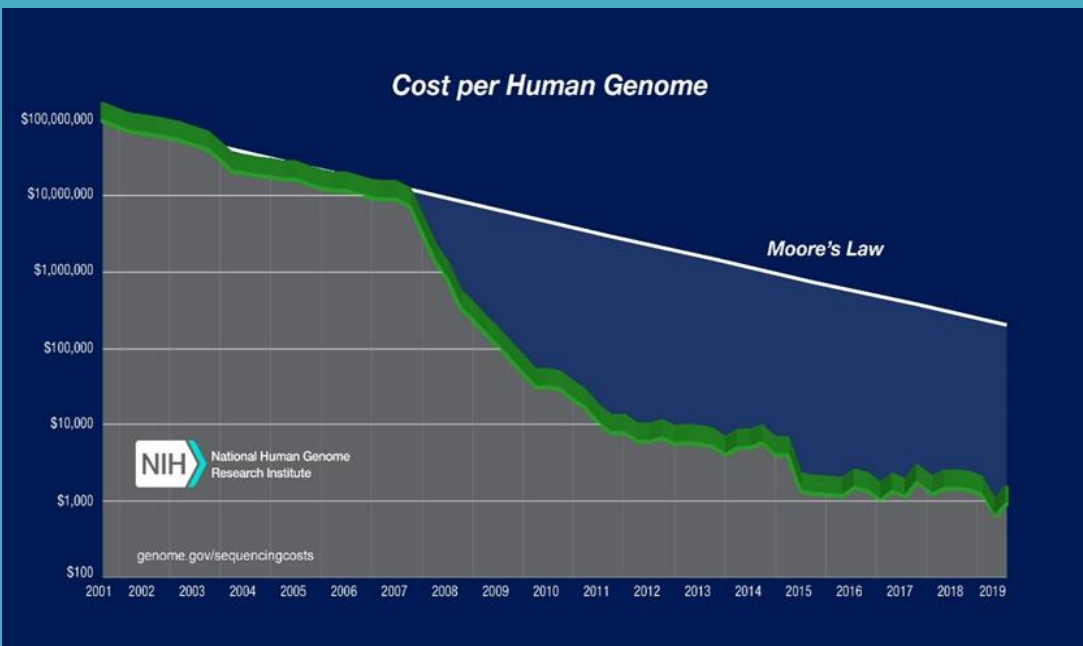
Цената е вече около \$10 000.

2016

Може да се направи пълно геномно секвениране за едва около \$1000.

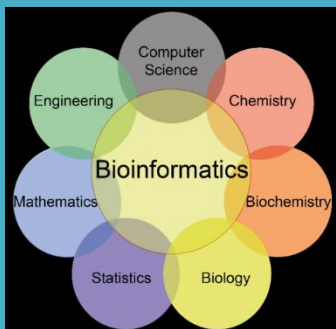
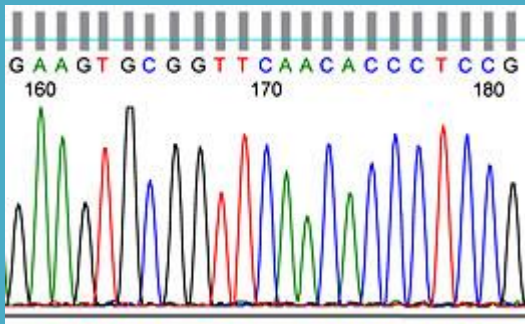
2019

За \$199 можете да се тествате за стотици генетични варианти, които носят информация за евентуални здравни ефекти и/или да дадат информация за родословието ви.



<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>

Предизвикателства... готови ли сме за такъв обем от информация?



(Big Data Problem)

Това означава, че също трябва да помислим как да се справим с всички данни, които генерираме от генетичните анализи и които трябва да се компилират, преобразуват и съхранят.

Ролята на биоинформатиката

Можем да мислим за това по отношение на биоинформатиката – комбиниране на технически области, като компютърни науки, статистика, математика и биоинженерство за анализ и интерпретация на данните, които сме събрали.

Ролята на консултиращия специалист

След това трябва да анализираме резултатите и да балансираме всички клинични съвети или интерпретация, които даваме.

Защо всеки етап от процеса на генетично тестване е важен



правилно събиране



транспортиране



съхраняване на проба



правилно амплифициране



правилно разчитане на пробата



анализ на извадката



съхраняване на данните

Functional Area	PHYSIOLOGIC SYSTEM							Recommended Support
	Heart	Circulatory	Detoxification	Immune	Neurologic	Pulmonary	Skeletal	
Oxidative Stress -1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Added Support
Oxidative Stress -2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Basic Support
Detoxification	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Basic Support
Heart, Circulatory Health -1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Maximum Support
Heart, Circulatory Health -2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Added Support
Immune Health	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Maximum Support
Bone Health	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Basic Support



интерпретиране на данните



решаване какво означава всичко



генетично консултиране



промяна на поведението и начина на живот

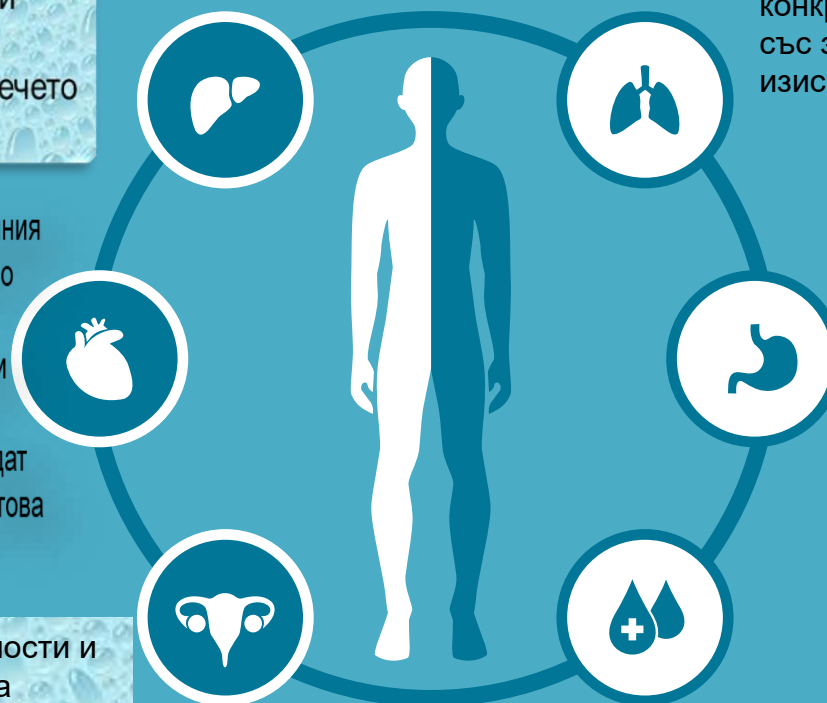
Трябва да внимаваме да не правим твърде много предположения за този процес

Основни презумпции за нутригенетичното тестване

➤ Много заболявания или състояния със силна генетична основа са доста редки и затова тестването за тези редки генетични варианти не е приложимо и оправдано при повечето хора

➤ Много заболявания и здравословни състояния са сложни. Може да има генетичен принос, но може да са предизвикани от няколко взаимодействащи гена или дори регулаторни пътища, които не включват гени. Тогава околната среда и/или начин на живот ще бъдат доста силна детерминанта, в развитието на това състояние или болест

Резултати като физически дадености и атлетически постижения също са сложни. Например има ли "спринтьор ген"? Ами ако имате определен набор от гени, които ви дават мускулатура и сила, но не и набор от гени, които ви дават мотивация да се появите сутрин за тренировка?



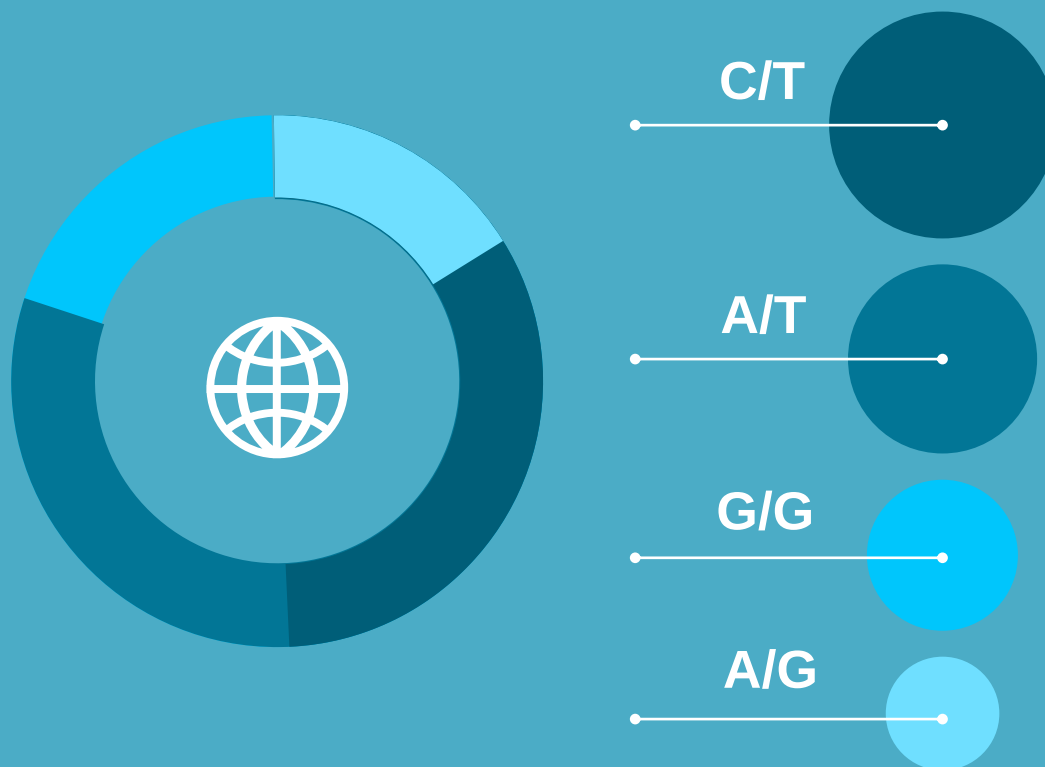
Данните са ограничени и понякога противоречиви. Може да няма много изследвания за конкретен ген или връзката му със здравето да е неясна или да изисква по-подробни проучвания.

Невинаги и не всички специалисти знаят какво да правят с резултатите от теста. Само знанието какво има в нашата ДНК рядко променя поведението ни. Трябва да има адекватна интерпретация и ясни и конкретни стъпки за промяна в поведението.

Технологиите за тестване, анализ и интерпретация на генетичен материал се развиват и променят бързо.

Компаниите, които предлагат нутригенетично тестване, невинаги са напълно коректни за това каква информация реално може да бъде получена чрез съответния тест. Понякога водещ е търговският им интерес или пък използват за популяризирането на тестовите положителното мнение на свои клиенти.

За какво могат да бъдат ползвани генетичните тестове?



- ❑ диагностика на заболяване;
- ❑ част от прогноза за здравен риск;
- ❑ тестване за носителство на даден проблемен ген (генен вариант, който не е активен във вас, но може да премине в потомството);
- ❑ пренатално тестване за идентифициране на конкретни състояния при плода;
- ❑ скрининг на новородено, направен скоро след раждането, за да се търсят потенциални заболявания;
- ❑ фармакогеномно тестване, за да се проучи как бихте могли да реагирате на определен медикамент;
- ❑ научно-изследователски проучвания със специфична цел или за генерално проучване;
- ❑ **За определяне на персонализиран подход към храненето и/или физическа активност.**

Генетични тестове за хранителни и диетични нужди и протоколи за редукция на теглото

Оксидативен стрес *SNPs in Oxidative stress-1 Gene*

Ключов ензим е манган супероксиддисмутаза (MnSOD)
Детоксикира супероксидни радикали
Първа линия на защита от натрупване на свободни радикали и оксидативен стрес



Как тялото ви обработва витамин D SNP in VDR (vitamin D receptor)

Ala54Thr на FABP (fatty acid-binding protein 2) гена
Какъв е заложеният диапазон на телесното ви тегло (например дали е по-вероятно да имате по-висок ИТМ)



Rs1175544 в *PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) гена, *ADRB3* (beta adrenergic receptor)

Генетични биомаркери, свързани с по-успешна загуба на тегло



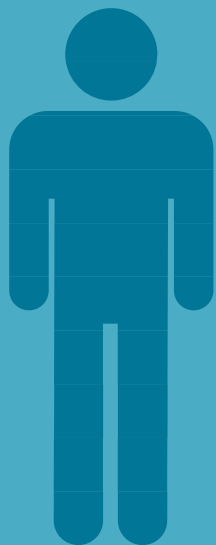
Rs1042714 (*Glu27Glu*) в гена, кодиращ β 2-AR рецептор

Ролята на процеса на липолиза по време на физически упражнения, тоест дали двигателният режим ще ви подкрепи съществено при програмата за редукция на теглото.

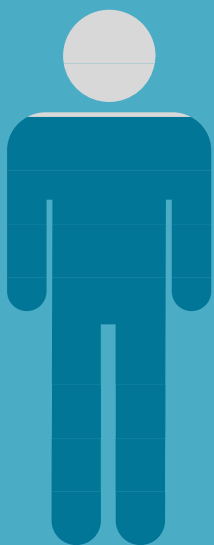
N.B. Все пак малко от тези заключения са окончателни или с напълно изяснени механизми.

Какво включва генетичното тестване?

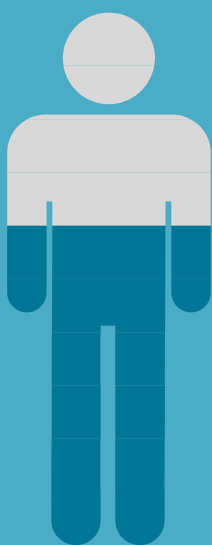
Най-общо, клиничните генетични тестове включват:



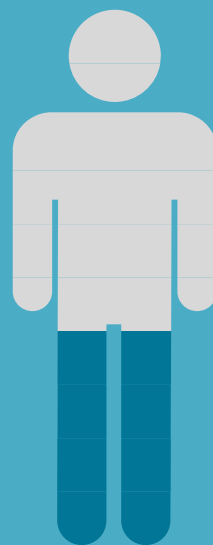
Анализиране на ДНК за специфични генетични варианти (SNPs), които кодират генетични продукти като ензими или други протеини.



Търсене на генетични вариации, които са свързани с болест/здравен статус/атлетичен капацитет.



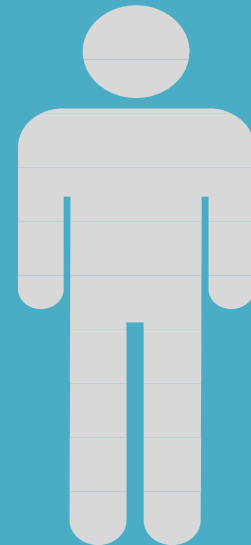
Съсредоточаване върху определено население (например **етническа група** с по-висок риск на специфично наследствено заболяване).



Насочени към разкриване на информация, която пациентите могат по някакъв начин да използват, например за да се **намали рискът** от заболяване, да се **изберат правилните лекарства** или да се **коригира хранителният режим**.



Някои генетични тестове включват **родословието** и **етническото наследство**.





Комерсиалните генетични тестове не целят да разчетат цялата геномна последователност на даден човек (whole genome sequencing). Това се прави по-скоро в изследователските лаборатории. За целите на приложната нутригенетика се търсят единични нуклеотидни полиморфизми или SNPs (замяната на една нуклеотидна база с друга в ДНК последователността).

SNPs (единични нуклеотидни полиморфизми) и некодиращи региони на ДНК молекулата

Обикновено нутригенетичните генотипиращи тестове обхващат около 600 000 SNP от потенциално трите милиарда SNP, които всеки човек има... или само 0,02% от генома. Дори най-изчерпателните услуги за генотипиране обхващат по-малко от 0,15% от генома.

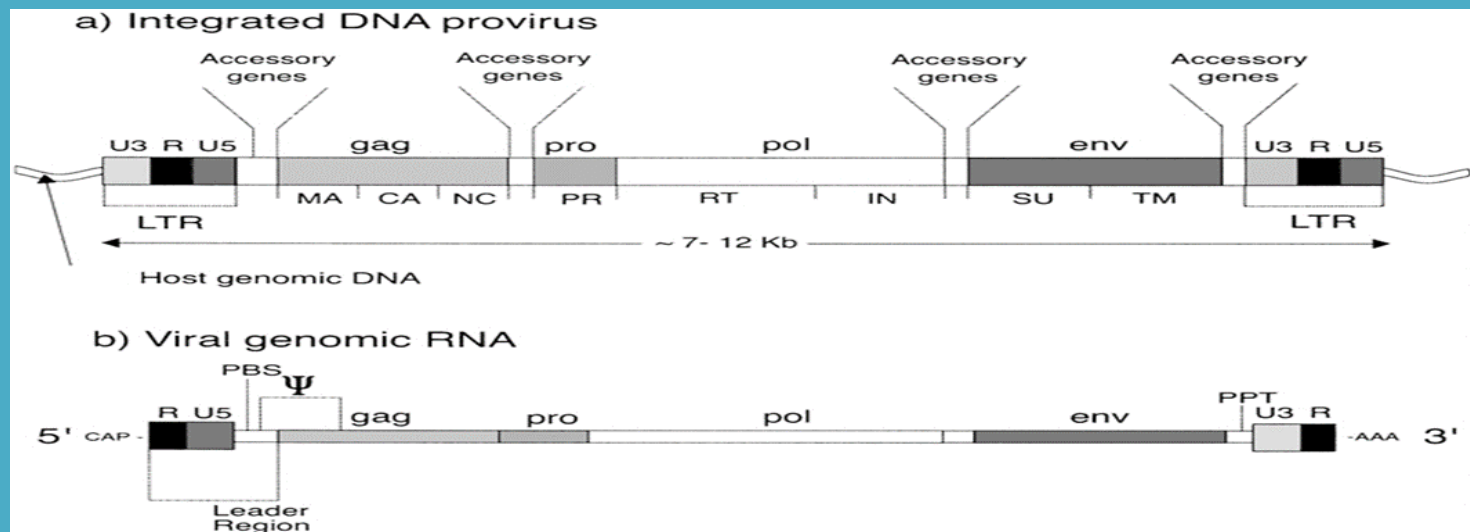


Голяма част от тези SNPs се намират в некодиращ регион на DNA, което значи, че това са последователности от ДНК, които не се транскрибират в mRNA, за да образуват протеини.

Това е, което в миналото изследователите са наричали „боклук ДНК“, докато не са проумели неговото значение. Разбира се, част от него включва остатъчни или нефункционални гени, отпаднали като неактивни по време на еволюционна история, но много от нефункционалните гени имат свое предназначение.

Некодиращата ДНК може да включва:

- ✓ Псевдогени: гени, които са били активни, но вече не са.
- ✓ Регулаторни последователности: части от ДНК, които увеличават, намаляват или дори могат напълно да спрат генната експресия.



- ✓ Провируси: напр. ретровируси – клас вируси, които транскрибират генома си и го вмъкват в генома на клетките, които заразяват. Този генетичен материал е известен като провирус. ХИВ вероятно е най-известният пример за ретровирус, но има и много други. Тъй като процесът, чрез който това се случва (известен като обратна транскрипция), е сравнително нестабилен и предразположен към грешки, много от тези ретровирусни последователности са неактивни. Неактивиранияте ретровирусни последователности съставят изненадващо голяма част от нашия геном – около 10%.

Предимства и недостатъци на комерсиалните нутригенетични тестове

Pros...

- ❑ Нутригенетичните генетични тестове могат да откриват или функционални SNP (в кодиращи региони), или SNP, намиращи се в не кодиращите региони.
- ❑ Търси се целенасочено даден полиморфизъм, който е асоцииран с даден метаболитен процес, черта или изява.
- ❑ Можем да получим много полезна информация от SNPs, свързана например с **нашето потекло** или добре известни асоциации с определени **наследствени черти** или **заболявания**.

Cons...

- ❑ Използването на SNP зависи от наличието на известни асоциации или идентифициране на региони с чести вариации.
- ❑ Вече трябва да сме идентифицирали и интерпретирали тези SNPs – къде са те, колко често се срещат и какво правят, в каква степен и в коя популация. (С това се занимават научните изследователи в областта на нутригенетиката и нутригеномиката.)
- ❑ Всяко едно SNP, за да се включи в панел от нутригенетични изследвания, трябва доказано да има силна връзка с процеса, на който искаме позитивно да повлияем чрез хранителна или друга интервенция.
- ❑ Не можем да определим **copy number variation** (колко копия на дадена ДНК последователност имате).
- ❑ Нито **транслокационни мутации** (където ген се движи от една хромозома в друга или от една част на хромозома в друга). И двете могат да повлияят на нашия фенотип, но познаването на SNP маркери няма да ни каже нищо за техните ефекти.

Комерсиални нутригенетични тестове vs. експериментални изследователски генетични тестове

Комерсиални NG тестове

- ✓ Рядко изследват целия геном.
- ✓ SNP или панел от SNPs са доказани като сигнификантни. Лесни и готови за употреба.
- ✓ Дават еднозначни резултати за наличието/отсъствието на SNP.
- ✓ Необходими са специалисти за разчитането му.
- ✓ Необходима е подходяща интерпретация на получените резултати.
- ✓ Бързи са – отнемат само няколко дни/седмици.
- ✓ Не е нужна разнородна лабораторна апаратура.
- ✓ В повечето случаи се правят от компании, които имат подизпълнител голяма генетична лаборатория.

Научно-изследователски NG тестове

- ✓ В научната лаборатория често се налага да правят пълногеномно секвениране (GWAS), защото често се търсят връзки и зависимости между конкретен генен вариант и биологичен процес или здравен проблем.
- ✓ Протичат по-скоро като клинични проучвания.
- ✓ Използва се различно и понякога много скъпо лабораторно оборудване, различни консумативи.
- ✓ Резултатите трябва да преминат през няколко етапа, повторения и сложни статистически анализи и интерпретации.
- ✓ Резултатите трябва да се повторят и от други изследователски групи.
- ✓ Отнемат месеци, понякога години.
- ✓ Едва тогава те могат да бъдат разработени като специфични нутригенетични биомаркери и да бъдат имплементирани в комерсиални генетични тестове.

Някои изводи за (нутри)генетичното тестване. Поглед като цяло.

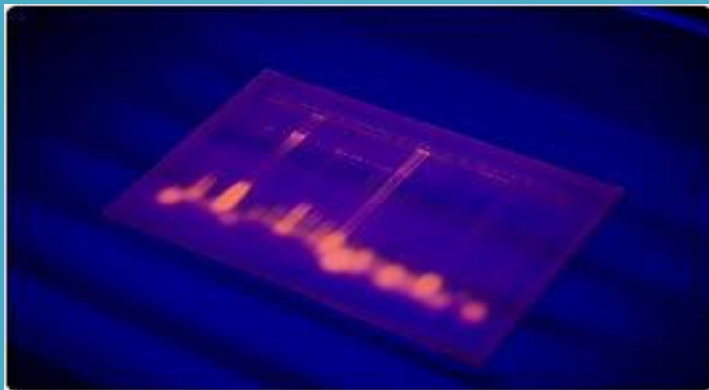


Засега не се предлагат комерсиални нутригенетични тестове, които да разчитат целия геном. Това е скъпо начинание и няма голям смисъл. Доста по-бързо, евтино и лесно е да се тестват само регионите, които ни интересуват и за които има достатъчно потвърдена научна информация от проучвания с добър експериментален дизайн.

Едно от предизвикателствата е, че изследователите не са разкрили всички различни връзки между нашите гени и външната им експресия (фенотипна изява). „*The scientific community has only scratched the surface.*“



Предлаганите комерсиални нутригенетични тестове могат да ни кажат неща само въз основа на това, което научните изследвания знаят днес – това са добре проучени специфични процеси и генетични фактори, отнасящи се до добре проучени популации. Но това далеч не е цялата информация.





Основни стъпки при процеса на генетично тестване

- 01 Стъпка 1 - Набиране на пробата
- 02 Стъпка 2 - Извличане на ДНК (екстракционни методи)
- 03 Стъпка 3 - Амплификация (намножаване) на ДНК
- 04 Стъпка 4 - Разчитане/анализ на ДНК последователността
- 05 Стъпка 5 - Интерпретация на резултатите и изводи



Стъпка 1 - Набиране на пробата

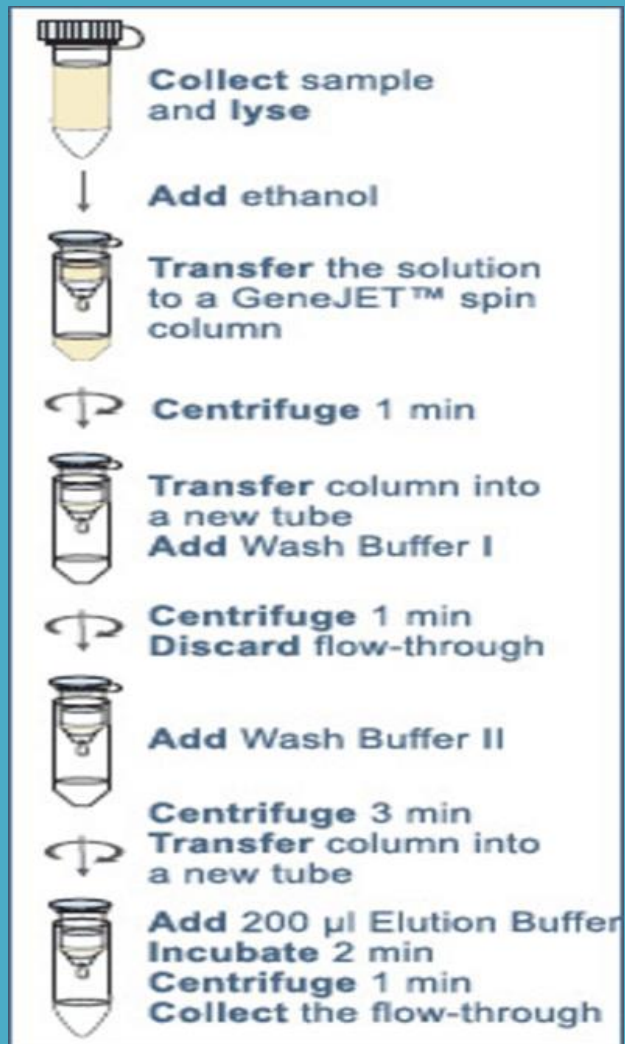
Материал за анализиране може да бъде всеки биологичен материал, но най-често се използват:

- ☐ Кръв
- ☐ Клетки от букална лигавица
- ☐ Амниотична течност (течността, заобикаляща фетуса в утробата)
- ☐ Коса (по-специално клетки от космените фоликули)



Стъпка 2 - Извличане на ДНК (екстракционни методи)

- ❑ Лизиране на клетката с лизиращи агенти (по-старите методи са включват използването на натриева основа (NaOH) и SDS (sodium dodecyl (lauryl) sulfate) - алкален лизис на клетката).
- ❑ Пречистване от белтъци, РНК и др. структури чрез фенол-хлороформ (токсично!!!), етанол.
- ❑ Екстракционни китове - бързи, евтини и безопасни/нетоксични.
- ❑ Използват екстракционни колонки със силициеви мембрани за улавяне на DNA.
- ❑ Proteinase и RNase за пречистване от ненужни компоненти, готови лизиращи и смилащи буфери.

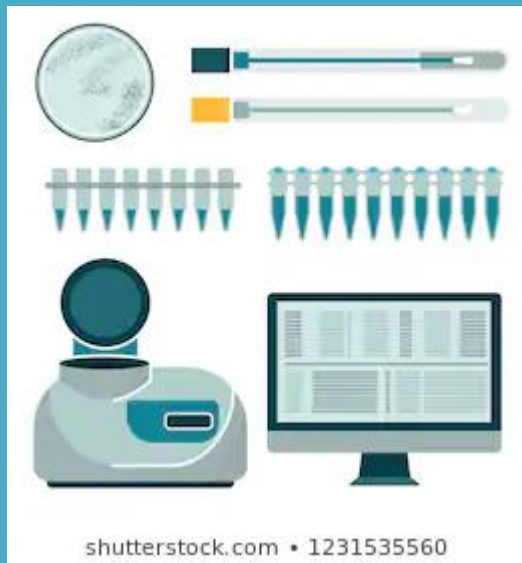


Автоматичен екстрактор

ДНК е забележително стабилна извън клетката, много повече от РНК или протеин. Ето защо можем да направим ДНК тест и дни или дори години, след като е оставена проба. Всъщност древна ДНК може да бъде извлечена и анализирана от проби на хиляди години.

Стъпка 3 - Амплификация (намножаване) на ДНК

Намножаване броя на
копията на ДНК с цел по-
добър анализ



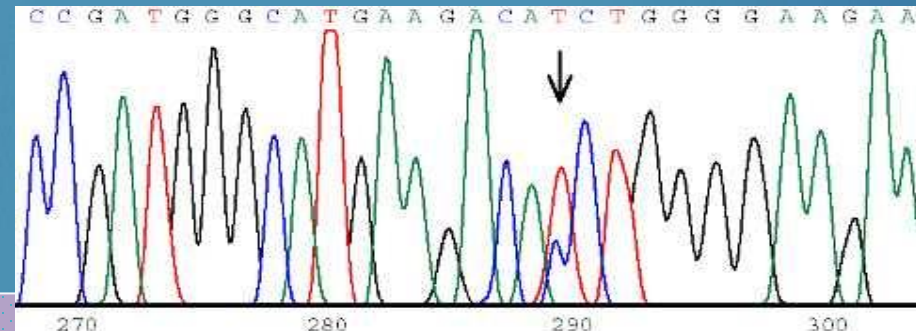
Обикновено се извършва чрез
т.нар. полимеразна верижна
реакция - PCR





Стъпка 4 - Разчитане/анализ на ДНК последователността

- ❑ Southern Blot Analyses - открива специф. ДНК секвенция (1979 – restriction restriction endonucleases-British biologist Edwin Southern,) + електрофореза + радиоактивна/ флуоресцентно белязана хибридизационна сонда за детекция
- ❑ DNA fingerprinting
- ❑ DNA Chip (Microarray)-десетки хиляди SNPs
- ❑ Allelic Discrimination Protocols – RealTime PCR
- ❑ Секвениране+Агарозна гелелектрофореза
- ❑ Next Generation Sequencing



N.B.! Секвенирането създава масив от данни, които първо трябва да са събрани в ред, който има смисъл и ни носи определена информация. Това се постига със сложни изчислителни методи и алгоритми, използвайки техниките на биоинформатиката за идентифициране, интерпретиране и анализ на суровите данни.

Next Generation Sequencing Technologies



Next-generation Sequencing

NGS is capable of sequencing large numbers of different DNA sequences in a single reaction [14]. All Next-Generation Sequencing (NGS) technologies monitor the sequential addition of nucleotides to immobilized and spatially arrayed DNA templates, but differ substantially in how these templates are generated and how they are interrogated to reveal their sequences [15]. Current NGS platforms may show significant differences and their different characteristics are mentioned in (Table 1).

Machine	Method	Sequencing chemistry	Read length (bp)	Sequencing speed/h	Maximum output per run	Accuracy (%)	Error rate*	Main source of error
454 FLX	Emulsion PCR	Pyrosequencing	400-700	13 Mbp	700 Mbp	99.9	10^{-2} - 10^{-4}	Intensity cutoff, homopolymers, amplification, mixed beads
Illumina (Illumina)	Bridge PCR	Reversible terminators	100-300	25 Mbp	600 Gbp	99.9	10^{-2} - 10^{-3}	Homopolymers, phasing, nucleotide labeling, amplification, low coverage of AT rich regions
Solid (Life technologies)	Emulsion PCR	Ligation	75-85	21-28 Mbp	80-360 Gbp	99.9	10^{-2} - 10^{-3}	Phasing, nucleotide labeling, signal degradation, mixed beads, low coverage of AT rich regions
Helicos (Helicos Biosciences)	No amplification Single molecule	Reversible terminators	25-55	83 Mbp	35 Gbp	97	10^{-2}	Polymerase employed, molecule loss, low intensities
Ion torrent PGM	Emulsion PCR	Detection of released H	100-400	25 Mb-16 Gbp	100 Mb-64 Gbp	99	3×10^{-2}	Homopolymers, amplification

Table 1: Review of current next-generation technologies.

Стъпка 5 – Интерпретация на резултатите и изводи

- ❑ Веднъж разчетена и добила форма, с която можем да боравим, можем да решим как да използваме тази информация.
- ❑ Дава ни представа какви единични нуклеотидни полиморфизми има в дадената проба. Какъв е генотипът спрямо даден полиморфизъм на определен ген.
- ❑ Какво е подходящото хранително поведение.
- ❑ Какви промени в поведението можем да предприемем в полза на нашето здраве.





Литература и източници

За повече информация по темата:

Roger Williams, Biochemical Individuality, 1950

“Всеки от нас има уникален “химичен състав”, който разкрива вариациите в отговора на организма към храните, лекарствата и околната среда.

Причината да сме уникални са разликите в нашите гени.”



Biochemical Individuality, Roger Williams

Nutrigenomics and Nutrigenetics in Functional Foods and Personalized Nutrition, Lynnette R. Ferguson

Nutrigenetics and Nutrigenomic, Artemis P. Simopoulos, Edited by Jose M. Ordovas

