РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА
М И Н И С Т Е Р С Т В О
ЗА ОБРАЗОВАНИЕ И НАУКА

Универзитет „Св. Кирил и Методиј" во Скопје
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
Република Северна Македонија
Бр. 03-339/1
25.01.2024 год.
СКОПЈЕ
РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА
REPUBLIKA E MAQEDONISË SË VERIUT
МИНИСТЕРСТВО ЗА ОБРАЗОВАНИЕ И НАУКА
MINISTRIA E ARSIMIT DHE SHKENCËS
СКОПЈЕ-SHKUP
Примено: 25-01-2024
Org. единица: Nj. org. | Број: Numër: | Прилог: Shtojcë: | Вредност: Vlerë:

ЗАВРШЕН ИЗВЕШТАЈ
ЗА НАУЧНОИСТРАЖУВАЧКИ ПРОЕКТ
Образец ОБ-3

ШИФРА НА ПРОЕКТОТ: Проект од проектна линија 3: Поддршка за модернизација и развој на лабораториски ресурси (набавка на опрема)

НАСЛОВ НА ПРОЕКТОТ:

Воведување на Next Generation Sequencing (NGS) технологија со цел зголемување на апликативните и истражувачките капацитети на Генетската лабораторија при Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија на Медицинскиот факултет во Скопје

ГЛАВЕН ИСТРАЖУВАЧ:

Проф. д-р Златко Јаковски

ИНСТИТУЦИЈА:

Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ

ТРАЕЊЕ НА ПРОЕКТОТ: **Од:** 31.10.2021 година

До: 31.10.2023 година

БРОЈ НА ДОГОВОР:

15-15590/7 од 22.11.2021 година

ИЗВЕШТАЈ НА ГОДИНА: **2021/23**

ДАТУМ НА ПОДНЕСУВАЊЕ НА ИЗВЕШТАЈОТ: 25.01.2024 _____

1. УЧЕСНИЦИ ВО РЕАЛИЗАЦИЈАТА НА ПРОЕКТОТ ВО ИЗВЕШТАЈНАТА ГОДИНА (Име и презиме, научно, наставно-научно звање, матична институција)

а) Главен истражувач: Проф. д-р Златко Јаковски, редовен професор, спец. по судска медицина, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ

б) Соработници – истражувачи

1. Александар Станков, вонреден професор, спец. по судска медицина, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ
2. Викторија Белакапоска Српанова, асистент, спец. по судска медицина, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ
3. Сашо Ристески, дипл.молекуларен биолог – спец. помедицинска генетика, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ
4. Хилда Јовановиќ, дипл.инж. биолог – спец. помедицинска генетика, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ
5. Ксенија Николова, дипл. биолог, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ
6. Наташа Битољану, доцент, спец. по судска медицина, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ
7. Горан Павловски, доцент, спец. по судска медицина, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ
8. Љупчо Чакар, асистент, спец. по судска медицина, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ
9. Ана Ивчева, асистент, спец. по судска медицина, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ

10. Марија Бујароска Перковиќ, научен соработник, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ
11. Зорица Божиноска, дипл. инж. по хемија, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ

в) Соработници - млади истражувачи

1. Стефанија Убавкова, дипл. лабораториски биоинженер, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ

2. Росица Сиамкоури, доктор по медицина, Институт за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија – Медицински факултет, УКИМ

2. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ*-ПРОЕКТОТ:

Главните цели на проектот се:

-набавка на инструмент за Next Generation Sequencing;

-воведување, валидација и акредитација на методи за секвенционирање на гени и генски панели релевантни во форензичката и клиничката молекуларна генетика.

Споредни цели на проектот:

1. Цел: Воведување на методи
2. Цел: Валидација и акредитација на методи
3. Цел: Публикации и апликативна дејност

---

*По потреба употребете дополнителни листови за сите точки од завршниот извештај.

3. ОЧЕКУВАНИ РЕЗУЛТАТИ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ-ПРОЕКТОТ:

1. Зголемување на капацитетите за генетски анализи во форензичките истраги, со истовремено испитување на голем број генетски идентификациони маркери (гени, STRs, SNPs, indels) одеднаш во краток временски рок, што ќе овозможи брзо делување на институциите, како што се судовите, обвинителствата, адвокатите, полицијата, приватните баратели на анализи и друго;
2. Зголемување на капацитетите за истовремена анализа на повеќе гени и генски панели, релевантни во клиничката генетика и други области на медицината, што ќе доведе до превенција и точна дијагноза;
3. Зголемување на апликативната дејност на Институтот, а воедно и меѓународно признавање на резултатите од испитувањата;
4. Публикација на воведените методи и резултати од нивната валидација;
5. Акредитација, апликација на воведените методи и учество на меѓународни проекти.

4. ОСВРТ НА ОПРАВДАНОСТА НА ИСТРАЖУВАЊЕТО ВО ПОГЛЕД НА ПОСТИГНУВАЊЕТО НА ДЕФИНИРАНИТЕ ЦЕЛИ И ОЧЕКУВАНИТЕ РЕЗУЛТАТИ СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ-ПРОЕКТОТ:

Со воведување на новата технологија на секвенционирање на Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија ќе се овозможи користење на придобивките на последниот фронт на технолошките достигнувања во областа на геномиката од повеќе аспекти:

1) Судско-медицински аспект: зголемување на капацитетите за генетски анализи во форензичките истраги, бидејќи ќе се овозможи истовремено испитување на голем број генетски идентификациони маркери (гени, STRs, SNPs, indels) одеднаш во краток временски рок и ќе се овозможи брзо делување на институциите, како што се судовите, обвинителствата, адвокатите, полицијата, приватните баратели на анализи и друго, со цел брзо делување на правосудниот систем. Покрај маркерите за идентификација на луѓе, ќе може да се испитуваат маркери за определување на фенотипските карактеристики на непозната личност (т.е. генетски фоторобот), за

определување на присуство телесни течности, за определување на биогеографското потекло на непозната индивидуа и други маркери.

2) Медицински-генетски аспект: зголемување на капацитетите за истовремена анализа на повеќе гени и генски панели, релевантни во клиничката генетика и други области на медицината, што ќе доведе до превенција и точна дијагноза. Фокусот ќе биде ставен на испитувањето генетски полиморфизми поврзани со ненадејна срцева смрт, алергии, фармакогенетика (специфична реакција на лекови, алкохол и дроги) и секвенционирање на вирусни геноми (SARS-CoV-2).

3) Апликативен и меѓународен аспект: со акредитирање на методите кои ќе се испитуваат со апаратот за NextGenerationSequencing (NGS), ќе се зголеми апликативната дејност на Институтот, а воедно ќе овозможи и меѓународно признавање на резултатите од испитувањата.

Покрај во апликативната и дијагностичка сфера, поседувањето на ваква технологија за секвенционирање ќе го отвори патот на Генетската лабораторија и Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија за истражувања на најразлични полиња од науката, а ќе го зголеми капацитетот за учество во национални и меѓународни научни проекти.

5. ДЕТАЛЕН ИЗВЕШТАЈ ЗА НАУЧНОИСТРАЖУВАЧКИОТ ПРОЕКТ:

Предмет на истражување беше ненадејната срцева смрт и варијантите на гени кои се асоцирани со ризикот од нејзино настанување. Направен беше преглед на досегашните сознанија и проблеми при судско-медицинската експертиза на ненадејната срцева смрт, како и значењето на воведување на молекуларна аутопсија, преку генетска анализа на сет од гени кои го носат тој ризик.

Оваа област е актуелна, научна и судско-медицинска проблематика, вредна и оправдана за истражување, од научен аспект, но исто така и од апликативен аспект. Секое откривање на варијанти на гени асоцирани со кардиоваскуларните фенотипови, или пак варијанти асоцирани со зголемен ризик од ненадејна

срцева смрт, ги дополнува популациските датабази со нови податоци и ја утврдува или менува класификацијата на веќе утврдените варијанти кај други индивидуи. Секое истражување во оваа насока претставува особен придонес за потесното научно поле, но и за зголемување на апликабилноста и прецизноста на толкувањето на резултатите од генетското тестирање.

Опис на применетите методи

Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија при Медицинскиот факултет во Скопје обезбедува судско-медицинска експертиза за најмалку 70% од територијата на Македонија, односно опслужува приближно 1.500.000 луѓе. За потребите на оваа ретроспективно-проспективна студија беа анализирани податоци од главниот регистар на Институтот за судска медицина во периодот од 2013 до 2023 година, а дополнителна, проширена анализа е направена и на писмените извештаи за обдукцијата на случаите на ненадејна срцева смрт, извршени во Институтот во дадениот период. Беа селектирани 60 случаи, кои ги исполнуваа критериумите за вклучување во студијата.

Критериуми за учество во студијата

Критериуми на вклучување: Лица починати од НСС, лица со „негативна обдукција“, лица со суспектна наследна кардиоваскуларна болест.

Обдукцијата како и сите биолошки примероци кои беа предмет на анализа се извршени и обезбедени според стандардните, рутински протоколи за судско-медицинска обдукција, обработка и складирање на биолошки примерок пропишан од Европскиот совет за судска медицина и препораките R99. Во истражувањето беа вклучени 60 испитаници обдуцирани на Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија. При селекција на случаите анализирани беа целосните обдукциски протоколи кои содржат оперативни податоци за случајот, хетероанамнестични податоци за починатиот, демографски податоци, податоци за надворешни и внатрешни обдукциски наоди, податоци од

хистопатолошки, биохемиски и токсиколошки испитувања, патоанатомски дијагнози и причина за смртта. За испитаниците кај кои беа достапни парафинските блокови со ткивни исечоци од обдукцијата, беше направено повторно боење со H&E (haematoxylin & eosin) и повторна евалуација на хистопатолошкиот наод. Кај сите 60 испитаници се изврши изолација на ДНК од биолошки материјал. Кај 53 испитаници ДНК се изолираше од биолошки материјал крв, обезбедена за време на обдукција, кај 4 испитаници се изолираше од FFPET (формалин – фиксирано ткиво вкалапено во парафински блокови), а кај 3 испитаници се изолираше ДНК од трулежно променето ткиво. Се изврши квантитативна и квалитативна анализа на изолираниот ДНК материјал со која се издвоија 30 примероци, кои ги исполнија критериумите за квалитет за последователна молекуларна анализа. Дополнително, обезбеден беше биолошки материјал - крв, од двајца живи сродници на еден од покојните испитаници.

Молекуларната анализа се изврши со технологија на секвенционирање на следната генерација, т.н. „NGS- секвенционирање на следната генерација“

За анализа се користеше истражувачки „Ion AmpliSeq target NGS panel“ за кардиомиопатии и аритмии (eng. Ion AmpliSeq™ Cardiac Arrhythmias and Cardiomyopathy Research Panel) на Thermo Fisher Scientific. Истражувачкиот панел содржи 92 гени асоцирани со кардиомиопатии и срцеви аритмии. Истражувањето, во сите негови етапи, обдукциите и лабораториските анализи, целосно се спроведе на Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија, на Медицински факултет, при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“- Скопје.

Селекција на случаи

Кај случаите обработени во студијата беше применет стандардниот протокол за обдукција, кој вклучува низа на постапки и дејства според стандардизирани правила и утврден редослед и тоа: Увид на местото на настанот (по потреба) и Податоци за случајот- оперативни (место на настапување на смртта, начинот на настапување на смртта, податоци за точно време на настапување на смртта, присуство на сведоци); Хетероанамнестички податоци за покојниот (податоци за возраста, претходни заболувања и/или здравствени проблеми, медицински интервенции, податоци за злопупотреба на алкохол и психотропни супстанци);

Детален надворешен преглед и опис на телото (Signum mortis, фенотипски карактеристики и повреди); Макроскопски преглед на внатрешните органи и скелетот; стандардна хистопатолошка анализа на ткива од сите органи обезбедени за време на обдукцијата, фиксирани во 10% формалдехид и обоени со H&E хематоксилин и еозин боење; Токсиколошки анализи на биолошкиот материјал обезбеден од обдукцијата (скрининг со флуоресцентна поларизација/Ензимска имуноанализа - FPIA/EIA (AxSYM /Architect c4000, Abbott) за примероците од урина, како и Biochip Array Technology - BATigatorEvidx за примероците од крв. Потврдните тестови беа спроведени со гасна хроматографија со масена спектрометрија (GC-MS QP2010 Shimadzu, Јапонија), Определувањето на етил алкохол беше спроведено со гасна хроматографија Headspace with Flame Ionization Detection (GC-FID 2010 Plus Shimadzu, Јапонија); Биохемиски анализи за утврдувањето на кардијалните ензимски маркери Тропонин I и CK-MB се извршени на Институтот за клиничка биохемија на ЈЗУ, Скопје, со помош на имуноензимски тестови CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay) за Тропонин I и PHO (фосфатаза имуноензимски тест) за CK/ MB. Врз основа на податоците од обдукциските протоколи, обдукцискиот наод, токсиколошкиот, биохемискиот и хистопатолошкиот наод, причината за смртта, беше направена селекција на 60 случаи кои според наодот ги исполнуваа критериумите да влезат во студијата.

Екстракција на ДНК од периферна целосна крв

Крвта од која беше направена екстракција на ДНК беше земена директно од крвниот сад на починати. Применет е протокол за екстракција на геномска ДНК од мали количини (1-100 µl) крв.

Екстракција на ДНК од ткива вкалапени во парафин

Ткивото што од кое екстрахиравме ДНК беше земено за време на обдукцијата и фиксирано во 10% формалин, а потоа вградено во парафин. Парафинските блокови беа чувани на собна температура. Применет беше протокол за екстракција на геномска ДНК од ткиво вкалапено во парафин.

Екстракција на ДНА од трулежно променето ткиво

Ткивото користено за изолација на ДНК беше земено за време на обдукцијата и беше применет протокол за изолација на геномска ДНК од мали количини биолошки материјал.

Квантификација на ДНК со флуориметриски принцип

По екстракцијата на ДНК, првичната квантификација беше направена со примена на Qubit™ dsDNA HS Assay Kit на Qubit 3.0 флуориметар.

Квантификација на ДНК со Real-Time PCR

Со цел проценка на количеството на амплификабилна ДНК од различни post-mortem биолошки примероци со Real-Time PCR, користен беше Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit (Thermofisher Scientific) на 7500 Real-Time PCR System.

NGS – next generation sequencing – секвенционирање на следната генерација на селектираните случаи со Ion S5 Gene Studio.

Подготовка на Ion AmpliSeq™ библиотеки на Ion Chef™ System Во нашата студија користевме истражувачки „Ion AmpliSeq target NGS panel“ за кардиомиопатии и аритмии (eng. Ion AmpliSeq™ Cardiac Arrhythmias and Cardiomyopathy Research Panel) на Thermo Fisher Scientific. Библиотеките беа квантификувани со Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit.

Биоинформатичка обработка на резултати од секвенционирање

Технологијата на секвенционирање на следната генерација анализира милиони мали полинуклеотидни фрагменти од 50 до 250 базни парови (bp), кои ги нарекуваме „кратки отчитувања“, односно, секвенционира големо количество на ДНК молекули кои што се читаат во исто време. Ваквиот принцип произведува огромно количество на податоци, за кои е неопходна бионформатичка обработка. Специфичните статистички алатки се насочени кон „филтрирање“ на варијантите проценувајќи ја веројатноста откриеното несовпаѓање да претставува вистинска генска варијанта или техничка грешка, која се одвива во 3 нивоа. Во првото ниво се проценува квалитетот на анализата, преку софтвер кој е интегриран во самиот инструмент IonS5, Torrent Suite Software, а кој врши анализа на планирање, следење и обработка на анализата и ја следи работата во текот на циклусите на секвенционирање. Второто ниво на биоинформатичка анализа подразбира

порамнување и составување на фрагментите на ДНК и нивна споредба со референтен геном со помош на софтверот Ion Reporter™ Software со кој на секој од испитуваните примероци се пријавуваат пронајдените генетски варијанти и истите се класифицираат според нивниот степен на влијание. Последниот степен на анализа на податоци претставува софтверско толкување на резултатите, а во суштина претставува анализа на варијантите и нивните биолошки информации, ефектот на варијантата, како и асоцираност на варијантите со испитуваниот фенотип. Софтверот кој се користеше во последната фаза од биоинформатичката обработка овозможи идентификување и класификација на варијантите релевантни за болеста. Избраниот софтвер содржи широк опсег на биолошки податоци агрегирани од голем број на извори во единствена база на податоци.

Варијантите со алелната фрекфенција на минорните алели (MAF) помала од 1/10.000 според Genome Aggregation Database (gnomAD) како и синонимните варијанти кои не се лоцирани на сплајсинг локации беа исклучени од статистичката интерпретација. Класификацијата на варијантите беше во согласност со консензуалните насоки на American College of Medical Genetic (ACMG) според кој тие беа класифицирани како патогени (P), веројатно патогени (LP) или варијанти со несигурно клиничко значење (VUS). Класификацијата беше направена според застапеноста на варијантите во јавно достапните бази на податоци, според функционалните анализи како и поврзаноста на генот и типот на варијантата со механизмот на ненадејна срцева смрт (Табела 6). Ново идентификуваните варијанти ќе бидат пријавени во ClinVar според препораките на ACMG. Класификација на варијантите според софтверот Franklin by Genoox Franklin by Genoox класификација P (eng. pathogenic)- Патогена LP (eng. likely pathogenic) Веројатно патогена VUS (eng. variant of uncertain significance) Несигурно, LB (eng.likely benign) Веројатно бенигно, B (eng. benign) Бенигно Класификацијата на патогеноста на варијантите е направена според стандардите и упатствата на ACMG - Американскиот колеџ за медицинска генетика и геномика (eng. American College of Medical Genetics and Genomics) кои препорачуваат 28 критериуми за нејзина класификација.

Краток опис на резултатите од истражувањето

При процената на геномските секвенци, се утврди поврзаност на генски варијанти со суспектниот фенотип кај починатите од ненадејна срцева смрт. Со биоинформатичка обработка се утврдија патогени варијанти, веројатно патогени варијанти, варијантни со несигурно значење и варијанти кои тежнеат кон бенигни, но нивната фреквенција во испитуваната група беше значајна, наспроти нивната фреквенција во популациските бази на податоци. Исто така, беа утврдени нови варијанти кај кои ин силико предвидувањата укажуваа на патоген ефект, но и нови варијанти кај кои имаше нејасни предвидувања. Кај значаен дел од испитаниците беше детектирана повеќе од една генска варијанта, асоцирана со нарушување на спроводната функција на срцето, како и сложени хетерозиготи. Поврзувањето на детектираните генски варијанти со суспектната причина за смрт овозможува поголема прецизност при судско-медицинската експертиза, посилна доказна вредност на експертскиот извештај, а во исто време и можност за превенција кај живите сродници преку скрининг за осомничените варијанти.

6. РЕЗИМЕ НА ПОСТИГНАТИТЕ РЕЗУЛТАТИ ОД ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА:

6.1. На македонски јазик:

-Воведување на нов метод за секвенционирањена ДНК;

-Истражување на присуството на генетски полиморфизми поврзани со ненадејна срцева смрт кај починати лица во судско-медицинската пракса.

6.2. На англиски јазик:

-Introduction of new DNA sequencing method;

-Reasearching the presence of genetic polymorphisms associated with sudden cardiac death in forensic medical practice.

6.3. Клучни зборови

6.3.1. На македонски јазик:

ДНК секцвенционирање, форензичка генетика, ненадејна срцева смрт, идентификација, превенција

6.3.2. На англиски јазик

DNA sequencing, forensicgenetics, sudden cardiac death, identification, prevention

7. ЗНАЧАЈНИ НАУЧНИ СОЗНАНИЈА ЗДОБИЕНИ СО РЕАЛИЗАЦИЈАТА НА ПРОЕКТОТ:

1. Примероците на крв, иако хемолизирани и деградирани, сè уште остануваат прв избор на примерок за анализа, но ткивото вградено во парафин, по претходна фиксација со формалин, покажа солиден потенцијал за понатамошна употреба во пракса, кај случаите кај којшто нема друг биолошки примерок.
2. Се утврди каузалност помеѓу идентификуваните варијанти и обдукцискиот наод кај испитаниците и се потврди генетска хетерогеност на кардиоваскуларниот фенотип. Кај 19 испитаници се идентификуваа патогени и веројатно патогени варијанти, што претставува 59% од вкупниот број испитаници и висок процент на утврдена каузалност споредено со другите студии.
3. Детектирани се 28 нови варијанти во 17 гени кои се асоцирани со кардиваскуларниот фенотип и ненадејна срцева смрт.
4. Варијантите во генот LDB3 (LIM domain binding 3) бележат висока фреквенција кај испитаниците со кардиомиопатија, со поголема застапеност во групата на дилататива кардиомиопатија. Во истата група се регистрира поголема фреквенција и на варијанти во генот DPP6 т.н. ген на аритмија (eng. “the arrhythmia gene DPP6”)
5. Варијантите во генот TPM1 (tropomyosin 1) се идентификувани кај испитаниците со хипертрофична кардиомиопатија, кај кои постои инволвираност на микроваскуларната коронарна циркулација.
6. Варијантите кои учествуваат во регулирањето на срцевата електрофизиолошка функција, кај испитаниците со структурни нарушувања на срцето, иако не се основна детерминанта на болеста, веројатно го зголемуваат ризикот од ненадејна срцева смрт.
7. Широкиот целен генски панел кој вклучуваше 92 гена поврзани со срцеви аритмии и со кардиомиопатии, покажа одлична чувствителност, специфичност и покриеност за избраните гени и висок дијагностички принос, што го прави добар избор за молекуларно тестирање кај случаи на HCC.

8. Воведувањето на молекуларна аутопсија овозможи да се прецизира причината за смрт кај 12 испитаници, да се утврди причината за смрт кај 11 испитаници кај кои што не беше утврдена, да се промени причината за смрт кај 3 испитаници и да се потврди кај 4 испитаници. Овие резултати го потврдуваат значењето на молекуларната аутопсија и нејзината улога во судско-медицинската експертиза.
9. Молекуларната анализа со таргетиран панел за кардиомиопатии и срцеви аритмии ја оправдува својата функција во обезбедување и зацврстување на материјалниот доказ во судско-медицинската експертиза.
10. Сеопфатниот пристап во судско-медицинската експертиза на ненадејна срцева смрт обезбедува докази за патогените ефекти од варијантите и нуди елементи за нивна рекласификација.
11. Одредување на етиологијата и ризикот на ненадејна срцева смрт е од големо
12. значење за воведување превентивни терапевтски модули и намалување на стапката на смртност кај ризичните групи.
13. Како производ од истражувањето се создаде нов специфичен протокол за судско- медицинска експертиза на ненадејна смрт кој вклучува специфични обдукциони техники, генетско тестирање, како и план за постапување со живите сродници на починатите од ненадејна срцева смрт.

8. КОРИСНИЦИ НА ИСТРАЖУВАЧКИТЕ РЕЗУЛТАТИ, НАЧИНИ НА ПРЕНЕСУВАЊЕ И ПРИМЕНА НА ИСТИТЕ:

Како корисници на резултатите од истражувањето се јавуваат неколку институции од јавниот сектор:

1. институциите кои вршат дејности од областа на образованието и науката (научно - истражувачки центри, лаборатории, високо-образовни установи);
2. институциите кои вршат дејности од областа на здравството (клиниките и болниците, коишто се дел од терциерното ниво на здравствена заштита во државата);
3. институциите кои вршат дејности од безбедносниот сектор (судовите, обвинителствата, адвокатите, полицијата)

Како корисници на резултатите од истражувањето се јавуваат и чинители на граѓанскиот сектор:

4. приватните баратели на анализи.

Сите резултати од истражувањата се објавуваат во домашни и странски научни списанија, работилници, конференции и друго.

9. ТЕХНОЛОШКИ ИНОВАЦИИ И ПАТЕНТИ

/

10. МОЖНИ ЕКОНОМСКИ И КОМЕРЦИЈАЛНИ ЕФЕКТИ:

Секвенционирањето на следната генерација (NGS) носи значителни комерцијални и економски ефекти, особено во областа на геномиката и биомедицинските истражувања.

1. **Биомедицински истражувања и обезбедување на индивидуална терапија:**

Забрзано истражување: NGS овозможува секвенционирање на ДНК со многу поголема брзина и пониска цена во споредба со традиционалните методи. Ова го забрзува темпото на геномското истражување и придонесува за подобро разбирање на разни болести.

Персонализирана медицина: NGS овозможува секвенционирање на целиот геном на поединецот, отворајќи го патот за персонализирана медицина. Ова има импликации за целните терапии, бидејќи плановите за третман може да се прилагодат на генетскиот профил на поединецот.

2. **Дијагностички и клинички апликации:**

Дијагноза на болеста: NGS технологијата се користи за дијагностицирање на генетски нарушувања и идентификување на мутации поврзани со различни болести. Ова има импликации за рано откривање и интервенција.

Геномика на кардиоваскуларниот фенотип: NGS стана инструмент во разбирањето на генетската основа на кардиоваскуларниот фенотип. Тоа помага да се идентификуваат специфични мутации, овозможувајќи развој на насочени терапии за оваа широка група хетерогени болести која е одговорна за 20% од смртноста во општата популација.

3. **Економски раст и создавање работни места:**

Раст на индустријата: Побарувачката за NGS услуги и технологии доведува до раст на силна индустрија околу геномиката. Институтот за судска медицина поседува инфраструктурни лабораториски и човечки ресурси за да стане

централизиран државен истражувачки и апликативен центар за дијагностика на кардиоваскуларниот фенотип, ненадејната срцева смрт и превенција кај живите сродници на починатите. Со зголемување на капацитетите институцијата може да стане и регионален истражувачки и апликативен центар за наведената проблематика. Со ова обезбедува покритие за научно-истражувачка работа, клиничка и здравствена примена на технологијата.

Создавање работни места: Проширувањето на секторите геномика и биотехнологија придонесува за создавање работни места во истражувањето, развојот, производството и биоинформатиката.

4. **Образование и создавање на нов кадар**

Студенти на трет циклус студии: Во моментов ДНК лабораторијата при институтот за судска медицина поседува капацитет да прими кандидати докторанди од државата и од странство кои ќе бидат вклучени во тековната работа.

Меѓународни проекти: Со воведување на технологијата на секвенционирање на следната генерација се зголемија капацитетите на институтот по судска медицина за меѓународна соработка на научно-истражувачки проекти од светско значење како што е програмата за финансирање на истражување и иновации на Европската унија, Horizon Europe.

11. МЕЃУНАРОДНА СОРАБОТКА ОСТВАРЕНА ПРИ РЕАЛИЗАЦИЈА НА ПРОЕКТОТ ВО ИЗВЕШТАЈНИОТ ПЕРИОД

1. Центар за форензика и применета молекуларна генетика, Факултет за биологија, Универзитет во Белград

06.02.2023-10.02.2023

12. ОБЈАВЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОИ ПРОИЗЛЕГУВААТ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО *

а) Оригинални научни трудови објавени во списанија во:

земјата:

DNA extraction from post-mortem samples with different degrees of degradation and their suitability for Ion S5™ next-generation sequencing system.

Authors: Viktorija Belakaposka Srpanova, Sasho Risteski, Natasha Bitoljanu, Ljupcho Chakar, Ana Ivcheva, Goran Pavlovski, Aleksandar Stankov, Svetlana Krstevska Balkanov, Zlatko Jakovski, Acad Med J 2023;3(2):117-127 https://www.doi.org/10.53582/AMJ2332117bs

странство:

Importance of quality control in sample preparation workflow of forensic degraded samples for massively parallel sequencing (MPS).

Authors: Viktorija Belakaposka Srpanova, Sasho Risteski, Natasha Bitoljanu, Aleksandar Stankov, Zlatko Jakovski, Journal of Bioanthropology Volume 3, 2023. p. xx-xx ISSN 2787-8201; https://doi.org/10.54062/jb.3.1.3

б) Монографски публикации во:

земјата: _____

странство: _____

в) Трудови презентирани на научни собири во:

*Во прилог на точките 12 и 13 да се достави список.

земјата: _____

странство: 14th Annual Scientific Meeting of the Balkan Academy of Forensic Sciences 03-08 October, Istanbul, Turkey, Importance of quality control in sample preparation workflow of forensic degraded samples for massively parallel sequencing (MPS).

13. МАГИСТЕРСКИ, ДОКТОРСКИ СТУДИИ, СПЕЦИЈАЛИЗАЦИИ, УСОВРШУВАЊА, СТУДИСКИ ПРЕСТОИ И КОРИСТЕЊЕ НА ЕКСПЕРТИ ВО ТЕКОТ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО ВО ИЗВЕШТАЈНАТА ГОДИНА

1. Докторска дисертација на д-р Викторија Белакапоска Српанова, со наслов: „Полиморфизми на гени кај аритмии и кардиомиопатии асоцирани со ненадејна срцева смрт и нивна улога во судско-медицинската експертиза“.

14. ИСТРАЖУВАЧКА ОПРЕМА НАБАВЕНА ВО ТЕКОТ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО:

14.1 Систем за брзо секвенционирање со напредна технологија (Next Generation Sequencing -NGS технологија, платформа S5/IonChef од Applied Biosystems, 2021 година, 8.008.475.00 денари без ДДВ, односно 9.450.000.50 денари со ДДВ

14.2 Уред за непрекинато напојување ITY_E_TW100B, SOCOMEC, 2021 година 610.170,00 денари без ДДВ 720.000,00 денари со ДДВ.

15. РЕКАПИТУЛАЦИЈА НА ПОТРОШЕНИ СРЕДСТВА ЗА РЕАЛИЗАЦИЈА НА ПРОЕКТОТ: (во намени и извори на средства)

а) Надомест за истражувачи - пензионери _____/_____

б) Непосредни материјални трошоци: _____

Потрошена енергија, материјали и суровини: 5.050.000.00

Патувања во земјата:	_____
Патувања во странство:	_____
Дневници, теренски додатоци и други надоместоци:	_____
Ангажирање на експерти:	_____
Производни и непроизводни услуги (информатички, ПТТ и сл.):	_____
Одржување на научноистражувачка опрема:	2.000.000,00
Набавка на научноистражувачка литература:	_____
Други трошоци:	_____
В к у п н о :	_____

в) Извори на средства:

Сопствено учество:	4.950.000.00
Учество на други институции:	_____
Учество на меѓународни институции:	/
Учество на Министерството за образование и наука:	11.550.000,00
В к у п н о :	16.500.000,00

16. ПОВАЖНИ ЗАКЛУЧУВАЊА И НАСОКИ ЗА ПОНАТАМОШНИ ИСТРАЖУВАЊА КОИ ПРОИЗЛЕГУВААТ ОД НАУЧНО-ИСТРАЖУВАЧКИТЕ РЕЗУЛТАТИ:

ЗАКЛУЧОЦИ

1. Успешно се воведе стандарден протокол за секвенционирање на следната генерација во форензичната ДНК лабораторија при Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија.
2. Биолошките примероци кои се достапни во судско - медицинската пракса и покрај високиот степен на деградација, сè уште можат да обезбедат доволно количество и квалитет на ДНК за понатамошна анализа со секвенционирање на следната генерација со инструментот Ion S5™.
3. Примероците на крв, иако хемолизирани и деградирани, сè уште остануваат прв избор на примерок за анализа, но ткивото вградено во парафин, по претходна фиксација со формалин, покажа солиден потенцијал за понатамошна употреба во пракса, кај случаите кај којшто нема друг биолошки примерок.
4. Се утврди каузалност помеѓу идентификуваните варијанти и обдукцискиот наод кај испитаниците и се потврди генетска хетерогеност на кардиоваскуларниот фенотип.
5. Кај 19 испитаници се идентификуваа патогени и веројатно патогени варијанти, што претставува 59% од вкупниот број испитаници и висок процент на утврдена каузалност споредено со другите студии.
6. Варијантите кои учествуваат во регулирањето на срцевата електрофизиолошка функција, кај испитаниците со структурни нарушувања на срцето, иако не се основна детерминанта на болеста, веројатно го зголемуваат ризикот од ненадејна срцева смрт.
7. Широкиот целен генски панел кој вклучуваше 92 гена поврзани со срцеви аритмии и со кардиомиопатии, покажа одлична чувствителност, специфичност и покриеност за избраните гени и висок дијагностички принос, што го прави добар избор за молекуларно тестирање кај случаи на НСС.

8. Воведувањето на молекуларна аутопсија овозможи да се прецизира причината за смрт кај 12 испитаници, да се утврди причината за смрт кај 11 испитаници кај кои што не беше утврдена, да се промени причината за смрт кај 3 испитаници и да се потврди кај 4 испитаници. Овие резултати го потврдуваат значењето на молекуларната аутопсија и нејзината улога во судско-медицинската експертиза.
9. Молекуларната анализа со таргетиран панел за кардиомиопатии и срцеви аритмии ја оправдува својата функција во обезбедување и зацврстување на материјалниот доказ во судско-медицинската експертиза.
10. Сеопфатниот пристап во судско-медицинската експертиза на ненадејна срцева смрт обезбедува докази за патогените ефекти од варијантите и нуди елементи за нивна рекласификација.
11. Одредување на етиологијата и ризикот на ненадејна срцева смрт е од големо значење за воведување превентивни терапевтски модули и намалување на стапката на смртност кај ризичните групи.
12. Како производ од истражувањето се создаде нов специфичен протокол за судско-медицинска експертиза на ненадејна смрт кој вклучува специфични обдукциони техники, генетско тестирање, како и план за постапување со живите сродници на починатите од ненадејна срцева смрт.
13. Заради својот сеопфатен пристап и достапност на човечки и лабораториски ресурси, институтот за судска медицина покажува супериорност во ова поле што ги обврзува специјалистите по судска медицина да ја унапредуваат научно- истражувачката дејност во областа. Во исто време тие треба да бидат главните иницијатори за мултидисциплинарна соработка и промотори на општествената важност на молекуларната аутопсија која ги надминува проблемите на финанскиот и работниот товар коишто произлегуваат од неа.

ПРЕПОРАКИ

1. Судско-медицинската експертиза кај лица починати од ненадејна смрт на возраст под 40 години, треба да биде задолжителна.

2. При судско-медицинска експертиза на ненадејна срцева смрт задолжително треба да се обезбеди ткиво од срцев мускул и крв, кои ќе се складираат на -80°C.
3. Во судско-медицинската пракса треба да се спроведува поригорозен лабораториски протокол за подготовка на примероците за молекуларна анализа со технологија на секвенционирање на следната генерација што подразбира:

   - биолошките примероци обезбедени за време на судско-медицинска обдукција задолжително треба да минат контрола на квалитет пред секвенционирање, преку квантификација со PCR во реално време за да се утврди вкупната амплифицирана ДНК во примерокот.

   - Времето на складирање на биолошкиот примерок, степенот на деградација и присуството на инхибитори, значително го намалува приносот на ДНК, така што, количеството на ДНК и бројот на циклусите во понатамошните чекори во работниот тек на подготовка на библиотеката, треба внимателно да се прилагодат за да се постигне оптимална концентрација на библиотеката за последователно секвенционирање.

   - Типичните судско-медицински биолошки примероци кои ќе бидат предмет на молекуларна анализа со технологија на секвенционирање, треба планирано да се групираат според квалитетот на ДНК, за да се обезбеди приближно еднаква ефикасност при амплификација и веродостоен краен резултат.
4. Целните панели за срцеви аритмии и кардиомиопатии треба да се прошират и да вклучуваат и стандардизирани регулаторни елементи дефинирани од истражувачката заедница, а варијантите кои првично се означени како „подобни само за истражување“ треба да добијат дијагностичка вредност.
5. Варијантите во некодирачките региони, треба да бидат разгледани како потенцијално значајни во градење на профилот за ризик од НСС.
6. Потребно е да се создаде софтвер за процена на полигенетски ризик од различните варијанти во испитуваните гени кај испитаникот.
7. Потребно е да се изработат студии за процена на генетското оптоварување за испитуваните фенотипови во популацијата на територија на Македонија.

8. Потребно е да се спроведе истражување за процена на патогениот ефект на околинските фактори и други егзогени чинители врз генската регулација и нивната улога во експресијата на кардиоваскуларниот фенотипот.
9. Потребно е да се воведе електронски ЛИПС (лекарски извештај за причина за смрт) за да се обезбеди оптимална временска рамка за детална и прецизна дијагностика.
10. Потребно е да се подигне свеста за ризикот од ненадејна срцева смрт и значењето на генетската анализа и навремена медицинска интервенција.
11. Потребно е да се создадат експертски тимови од специјалист по судска медицина, молекуларен биолог и супспецијалист кардиолог (по потреба и експерти од други области) што ќе придонесе за унапредување на судско-медицинската експертиза, поголемо разбирање на механизмите за смрт кај испитуваните фенотипови, но и превенција од ненадејна срцева смрт кај засегнатата популација.
12. Потребна е национална превентивна програма за редовно следење на крвните сродници на лицата починати од ненадејна срцева смрт асоцирана со генетска етиологија.

17. ВЕРИФИКАЦИЈА НА ЗАВРШНИОТ ИЗВЕШТАЈ:

Потпис на главниот истражувач: **Проф. д-р Златко Јаковски**

Потпис на одговорното лице на институцијата: Проф д-р Светозар Антовиќ

Датум и печат: _____

Универзитет „Св. Кирил и Методиј" во Скопје
Медицински факултет
Република Северна Македонија
1
СКОПЈЕ