



MOLEKULARNE METODE U LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI

Kamelija Madacki Todorović

Sarajevo School of Science and Technology, Medical school

Hrasnička cesta 3a, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Kamelija Madacki Todorović, SSST Medicinski fakultet; kamelija.madacki@ssst.edu.ba

ABSTRACT

Savremene molekularne metode revolucionirale su laboratorijsku dijagnostiku posljednjih desetljeća, pružajući nevjerovatne uvide u genetsku i molekularnu osnovu bolesti. Ovaj rad daje pregled ključnih molekularnih tehnika koje se koriste u laboratorijskoj dijagnostici i njihov uticaj na kliničku praksu. Rad obuhvata pregled tehnike amplifikacije nukleinskih kiselina kao što su lančana reakcija polimerazom (PCR), PCR u stvarnom vremenu, ističući njihove primjene u otkrivanju i kvantificiranju genetskog materijala. Dodatno, ulogu sekvenciranja sljedeće generacije (NGS) u otkrivanju genomske informacije, omogućavajući sveobuhvatnu analizu genetskih varijacija povezanih s raznim bolestima. Primjena molekularne dijagnostike je ključna u tačnom i pravovremenom otkrivanju bolesti u infektivnim bolestima, onkologiji i genetskim poremećajima. Kako se molekularne metode nastavljaju razvijati, primjena istih otvara mogućnosti za povećanje preciznosti, brzine i obima laboratorijske dijagnostike, što u konačnici pridonosi učinkovitom liječenju pacijenata, te personaliziranim pristupima liječenja pacijenta. Napredak u molekularnim metodama revolucionirao je laboratorijsku dijagnostiku, nudeći neuporedivu preciznost i učinkovitost u otkrivanju i karakterizaciji bolesti. Naglasak je na primjeni molekularnih tehnika u savremenom dijagnostičkom pristupu, njihova uloga u identifikiranju genetskih markera, uzročnika infekcija i različitih procesa na nivou ćelije.

Tehnike hibridizacije nukleinskih kiselina, kao što su fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) i microarray su metode koje olakšavaju vizualizaciju i identifikaciju specifičnih sekvenci DNA ili RNA, nudeći dragocjene uvide u hromosomske abnormalnosti i obrasce ekspresije gena. Savremena primjena molekularne dijagnostike i metoda važne su u procesu donošenja kliničkih odluka, terapijske strategije i pristupa personalizirane medicine. Molekularne metode imaju sve istaknutiju ulogu u laboratorijskoj dijagnostici, pružajući kliničarima neprocjenjive uvide u tačnu dijagnostiku i personaliziranu brigu za pacijente.

Primjena molekularne dijagnostike pored zaraznih bolesti i genetike također ima ulogu u farmakogenomici, personaliziranoj medicini i praćenju onkoloških pacijenata.

Ključne riječi: molekularne metode, laboratorijska dijagnostika, personalizirana medicina

Autor za korespondenciju:

Kamelija Madacki Todorović, MA genetike

dipl. ing. MLD

SSST Medicinski fakultet, Sarajevo

Tel. 061/219-088

E-mail: kamelija.madacki@ssst.edu.ba





UVOD

Molekularna dijagnostika, korištenje dijagnostičkog testiranja za razumijevanje molekularnih mehanizama bolesti pojedinog pacijenta, bit će ključna u pružanju sigurne i učinkovite terapije za mnoge bolesti u budućnosti. Dijagnostika utiče na čak 70 % donošenja odluka u zdravstvu, a nova generacija dijagnostičkih testova koji pružaju uvide na molekularnoj razini ispunjava obećanje personalizirane medicine. Uloga molekularne dijagnostike u personaliziranoj medicini obuhvata slijedeće aspekte:

- Rano otkrivanje i odabir odgovarajućeg liječenja za koje se na temelju molekularne dijagnostike utvrdi da su sigurni i učinkoviti
- Integracija molekularne dijagnostike s terapijom
- Praćenje terapije kao i određivanje prognoze

Molekularne metode u laboratorijskoj dijagnostici igraju ključnu ulogu u analizi genetskog materijala kako bi se identificirale genetske promjene, dijagnosticirale bolesti, pratili terapijski odgovor i pružile informacije o individualnim genetskim karakteristikama pacijenata. Ove metode

omogućava detaljniju i precizniju analizu na molekularnoj razini, što doprinosi razvoju personalizirane medicine.

Istorija molekularne dijagnostike obuhvata razvoj tehnologija i metoda koje se koriste za analizu genetskog materijala, identifikaciju genetskih varijacija i dijagnostiku bolesti na molekularnom nivou. U nastavku su prikazani ključni događaji kroz istoriju u razvoju molekularne dijagnostike:

1953. - Otkriće strukture DNA: James Watson i Francis Crick predstavili su model dvostrukog heliksa strukture DNA, otvarajući put za razumijevanje genetskog materijala.

1977. - Sekvenciranje DNA: Frederick Sanger razvio je metodu sekvenciranja DNA, što je omogućilo određivanje redoslijeda nukleotida u genetskom materijalu.

1983. - PCR (Polimerazna lančana reakcija): Kary Mullis razvio je PCR, revolucionarnu tehniku koja omogućava umnožavanje specifičnih sekvenci DNA. PCR je postao ključna tehnika u molekularnoj dijagnostici.

1985. - DNA fingerprinting: Alec Jeffreys je prvi put koristio tehniku DNA otiska prsta (DNA fingerprinting) za forenzičke svrhe,



što je značilo otkriće genetskih markera koji se mogu koristiti za identifikaciju pojedinaca.

1987. - Sekvenciranje ljudskog genoma: Nacionalni instituti za zdravlje (NIH) pokreću Human Genome Project (Projekat ljudskog genoma) s ciljem potpune sekvencije ljudskog genoma.

1990. - Razvoj PCR bazirane dijagnostike: PCR postaje sve prisutna tehnika u laboratorijima za dijagnozu genetskih bolesti, infekcija i drugih stanja.

1996. - Metoda sekvenciranja sljedeće generacije (NGS): Razvoj NGS-a omogućava brže i jeftinije sekvenciranje genoma, što dodatno ubrzava istraživanje genetskih bolesti.

2001. - Dovršetak Human Genome Project-a: Prva potpuna sekvencija ljudskog genoma objavljena je kao rezultat međunarodnog Human Genome Project-a.

2005. - Personalizirana medicina: Molekularna dijagnostika postaje ključna u personaliziranoj medicini, gdje se terapija prilagođava genetskim karakteristikama pojedinca.

2010. - CRISPR-Cas9: Razvoj CRISPR-Cas9 tehnologije omogućava precizno uređivanje gena, što ima veliki potencijal u liječenju genetskih bolesti.

2013. - Nove metode sekvenciranja: Razvoj treće generacije tehnika sekvenciranja, kao što su PacBio i Oxford Nanopore, omogućuje čitanje dužih sekvenci i bolje razumijevanje strukture genoma.

2020. - Molekularna dijagnostika u pandemiji COVID-19: Molekularne metode, uključujući PCR, odigrale su ključnu ulogu u dijagnostici i praćenju COVID-19.

U daljem tekstu možemo vidjeti opće prikaze, karakteristike i primjene molekularnih metoda u laboratorijskoj dijagnostici danas:

PCR (Polimerazna lančana reakcija) je tehnika molekularne biologije koja omogućava amplifikaciju (umnožavanje) određenih dijelova DNA. Za ovu metodu zaslužan je Kary Mullis 1983. godine, te je postala ključna u mnogim laboratorijskim disciplinama, uključujući genetsku dijagnostiku, molekularnu biologiju, forenziku i istraživačke znanosti (1).

Osnovni princip rada PCR-a sastoji se od nekoliko koraka, započinje sa :

Denaturacija (94-98°C): Prvi korak u PCR-u je denaturacija, gdje se uzorak zagrijava na visoku temperaturu (obično između 94 i 98°C). Ovaj proces razgrađuje dvostuke



lanca DNA na pojedinačne niti, otvarajući ih za daljnju analizu.

Anneling (50-65°C): Nakon denaturacije, temperatura se snižava na temperaturu annelinga. Tokom ovog koraka, prajmeri (kratke niti DNA koje određuju mjesto amplifikacije) vežu se uz svoje komplementarne sekvence na ciljanoj DNA.

Elongacija (72°C): Temperatura se zatim podiže za elongaciju, tokom koje enzim poznat kao DNA polimeraza sintetizira novu niti DNA komplementarnu ciljanoj sekvenci. Ovaj korak proizvodi dva nova dvostuka lanca DNA.

Cikliranje: Svi ovi koraci se ponavljaju u ciklusima kako bi se postigla eksponencijalna amplifikacija ciljane DNA sekvence. Broj ciklusa određuje količinu amplificirane DNA.

Postoje različite vrste PCR-a, a ovdje su prikazane samo osnovne vrste:

RT-PCR (Reverse Transcription PCR): Koristi se za amplifikaciju RNA, a ne DNA. Prvo se provodi reverzna transkripcija kako bi se pretvorila RNA u komplementarnu DNA.

Real-time PCR (qPCR): Omogućava praćenje amplifikacije u stvarnom vremenu. Reakcija se može pratiti kontinuirano tokom

ciklusa, što omogućava kvantifikaciju početne količine DNA (Slika1).



Slika 1. Real-time PCR (qPCR)

(Izvor: <https://www.fishersci.ca/shop/products/quantstudio-5-real-time-pcr-system-96-well-0-2ml-laptop/a28569>)

Nested PCR: Koristi se dvije skupine prajmera za dodatnu specifičnost. Prvi set prajmera amplificira cijelu regiju, dok drugi set amplificira manju unutarnju podregiju.

Multiplex PCR: Koristi se za amplifikaciju više ciljanih regija istovremeno, što štedi vrijeme i resurse (2).

PCR je izuzetno važan alat u molekularnoj biologiji i dijagnostici. Omogućava brzu, specifičnu i selektivnu amplifikaciju genetskog materijala, čime olakšava analizu genetskih varijacija, dijagnozu bolesti, identifikaciju mikroorganizama i druge aplikacije u istraživačkom i kliničkom okruženju.

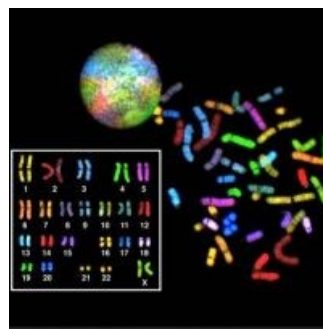


Kariotipizacija i FISH tehnika često se koriste u kombinaciji kako bi se dobile sveobuhvatne informacije o genetskim promjenama. Kariotipizacija pruža pregled cjelokupnog kariotipa, dok FISH omogućava detaljnu analizu specifičnih sekvenci na hromosomima. Ove tehnike igraju ključnu ulogu u dijagnostici genetskih poremećaja, onkologiji i istraživanju genoma (3).

Kariotipizacija

Kariotipizacija je tehnika koja se koristi za vizualizaciju i analizu kompletne garniture hromosoma jednog organizma. Procedura se sastoji od uzimanje uzorka najčešće krvi, amnionska tekućina, koštana srž. Potom slijedi stimulacija diobe stanica: Stanice se potiču na diobu kako bi hromosomi bili u fazi najveće kontrakcije. Potom slijedi zaustavljanje diobe i fiksacija stanica: Dioba se zaustavlja, a stanice se fiksiraju kako bi se spriječila daljnja dioba. Bojenje hromosoma je slijedeći postupak gdje se hromosomi boje određenim bojama, često koristeći tehniku Giemsa (G-banding), kako bi se omogućila njihova vizualizacija pod mikroskopom. Posljednja faza je analiza kariotipa gdje se hromosomi organiziraju po veličini, obliku i centromerima, a rezultat je prikazan u obliku kariotipskog dijagrama (4).

Ova tehnika nalazi svoju primjenu u dijagnostici genetskih poremećaja, praćenje djelotvornosti i izloženosti zračenju te analiza genetskih promjena u onkologiji i prenatalnoj dijagnostici (Slika 2).



Slika 2. Kariotipizacija

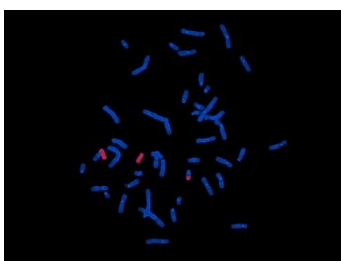
(Izvor: [https:// hr.womanuntamed.com / fetal-karyotyping/](https://hr.womanuntamed.com/fetal-karyotyping/))

FISH je tehnika koja koristi fluorescentno označene sonde kako bi se identificirale i locirale specifične sekvence DNA na hromosomima. Postupak se sastoji od nekoliko koraka, od pripreme uzorka gdje se stanice fiksiraju na staklenom nosaču. Zatim slijedi denaturacija DNA, hibridizacija: fluorescentno označena DNA-sličica (sonda) koja se komplementira sa specifičnom DNA sekvencijom hromosoma dodaje se uzorku i vezuje se za svoju ciljanu sekvencu. Slijedi pranje i uklanjanje nepovezane sonde, te detekcija: Fluorescentni signali se detektiraju



pod fluorescentnim mikroskopom, omogućujući vizualizaciju specifičnih hromosomskih područja (5).

FISH tehnika nalazi svoj primjenu u detekciji i lokalizaciji određenih gena ili sekvenci na hromosomima (Slika 3).



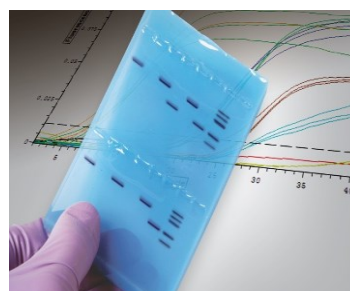
Slika 3. FISH

(Izvor: <https://clgenetics.com/our-services/fluorescence-in-situ-hybridization/>)

Identifikacija hromosomskih abnormalnosti i istraživanje hromosomskih struktura i organizacija. Ove dvije tehnike često se koriste u kombinaciji kako bi se dobile sveobuhvatne informacije o genetskim promjenama. Kariotipizacija pruža pregled cjelokupnog kariotipa, dok FISH omogućava detaljnu analizu specifičnih sekvenci na hromosomima.

Gel elektroforeza je tehnika koja se koristi za razdvajanje i analizu fragmenata DNA, RNA ili proteina na temelju njihove veličine i/ili naelektrisanja. Ova tehnika se često

primjenjuje u molekularnoj biologiji, genetici i biohemiji (Slika 4).



Slika 4. Gel elektroforeza

(Izvor: <https://www.fishersci.com/us/en/browse/90155123/agarose-gel-electrophoresis-systems>
<https://www.bio-rad.com/en-ba/a/edu/dna-pcr-agarose-gel-electrophoresis>)

Princip Gel Elektroforeze sastoji se od nekoliko koraka, od pripreme gela, gdje se najčešće koristi agarozu (za DNA) ili poliakrilamidni gel (za proteine), pripreme uzorka, nalijevanje uzorka u pokretanja sistema električne energije. Elektroforeza se izvodi u prisustvu električnog polja koje vuče nabijene molekule prema suprotnom kraju gela (6). Električna struja prolazi kroz gel, a



molekule se kreću prema suprotnom kraju gela ovisno o njihovoj veličini i/ili naelektrisanju. Manji fragmenti ili manje naelektrizirani fragmenti putuju brže, dok veći fragmenti ili veći naelektrizirani fragmenti putuju sporije. Nakon elektroforeze, gel se obično boji određenim bojama koje omogućuju vizualizaciju i dokumentaciju rezultata. Na taj način, mogu se vidjeti i analizirati veličine i relativne količine fragmenata.

Postoje različiti tipovi gel elektroforeze: agarozni gel elektroforeza (za DNA), Poliakrilamidni gel elektroforeza (za proteine): Ova vrsta gela se često koristi za razdvajanje proteina, posebno u tehnikama kao što su SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Gel elektroforeza je temeljna tehnika u molekularnoj biologiji koja omogućava brzo i učinkovito razdvajanje i analizu genetskog materijala i proteina. Gel elektroforeza se koristi za DNA analizu, RNA analizu, uključujući mRNA u tehnikama poput Northern blot analize, proteinska analiza: razdvajanje i analiza proteina prema njihovoj veličini i/ili naelektrisanju (7). Također se koristi za proučavanje genetskih varijacija: Gel

elektroforeza može se koristiti za detekciju i analizu genetskih varijacija, poput polimorfizama duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP) i nezaobilaznu molekularnu dijagnostiku, identifikaciju genetskih poremećaja ili bolesti putem analize DNA fragmenata.

Sekvenciranje DNA (Deoksiribonukleinska kiselina) je proces određivanja redoslijeda nukleotida (A, T, C, G) u molekuli DNA. To je ključna tehnika u molekularnoj biologiji i genomici koja omogućava detaljno razumijevanje genomske strukture organizama, identifikaciju genetskih varijacija te istraživanje bioloških procesa. NGS (Next-Generation Sequencing) je skup tehnologija koje omogućava brže i masovno sekvenciranje DNA u usporedbi s prethodnim metodama (8). Klasično sekvenciranje je Sangerovo sekvenciranje: Razvijeno 1977. godine, ova metoda koristi modificirane nukleotide i omogućava određivanje nukleotidnog redoslijeda pomoću elektroforeze.

NGS (Next-Generation Sequencing): NGS predstavlja skup modernih tehnologija koje omogućavaju istovremeno sekvenciranje velikog broja DNA fragmenata. Glavne karakteristike NGS-a uključuju visoku



brzinu, visoku paralelizaciju i niže troškove u odnosu na klasične metode sekvenciranja (9). Primjene sekvenciranja i NGS-a je široka i obuhvata genomska istraživanja, Također se koristi u onkologiji, mikrobiološkim istraživanjima, identifikaciji patogena, biotehnologiji u procesu razvoja novih lijekova (Slika 5).



Slika 5. NGS (Next-Generation Sequencing)

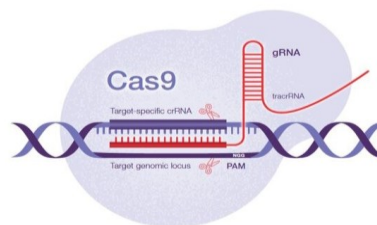
(Izvor: <https://www.chemistryworld.com/news/the-future-of-next-generation-dna-sequencing/4014391.article>)

Sekvenciranje i NGS su ključni alati u modernoj biologiji, pružajući dublje uvide u genetske informacije i omogućavajući inovacije u mnogim područjima znanosti i medicine.

CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated protein 9) predstavlja revolucionarnu tehnologiju za precizno uređivanje gena. Razvijena je iz prirodnog

obrambenog mehanizma bakterija protiv napada virusa te je kasnije prilagođena za genetsko inženjerstvo. Ovaj sistem omogućava istraživačima da precizno mijenjaju, dodaju ili isključuju gene u genomu organizama, uključujući i ljudski genom (10).

Nekoliko koraka su ključni: dizajn gRNA: naučnici dizajniraju gRNA koji je komplementaran specifičnoj sekvenci ciljanog gena, dalje imamo vezanje sa Cas9 gdje se gRNA se poveže s Cas9 proteinom, stvarajući kompleks koji je sposoban prepoznati i vežu se za ciljanu sekvencu u genomu. Na dalje, rezanje DNA: Cas9 djeluje kao "molekularne makaze" i reže DNA na određenom mjestu (Slika 6.)



Slika 6. CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated protein 9)

(Izvor: <https://www.thermofisher.com/ba/en/home/life-science/genome-editing/genome-editing-learning-center/crispr-cas9-technology-information.html>)



Ovaj rezultat potiče prirodni proces popravka DNA u stanici. Zadnji korak predstavlja reparacija DNA: kada DNA bude izrezan, stanica ima nekoliko opcija za popravak. Postoje dvije glavne metode: nehomologna završetna faza (NHEJ) koja može uzrokovati slučajna umetanja ili brisanja, i homologna rekombinacija (HR) koja koristi homolognu sekvencu za tačno popravljanje (11).

Primjena CRISPR-Cas9 tehnike je široka, od genetsko inženjerstvo gdje postoji mogućnost preciznog uređivanja gena omogućava različite primjene, uključujući ispravak genetskih bolesti i stvaranje genetski modificiranih organizama (GMO); istraživanje funkcije gena: omogućava istraživačima da ispituju funkciju određenih gena eliminacijom ili izmjenom tih gena u modelnim organizmima, potom borba protiv infekcija, te je moguće koristiti CRISPR-Cas9 za poticanje očuvanja i održivost ugroženih vrsta. Personalizirana medicina također nalazi primjenu u ovoj tehnologiji. Međutim, primjena CRISPR-Cas9 tehnologije donosi sa sobom niz etičkih pitanja koja se odnose na promjene u genetskom materijalu organizama, posebno u kontekstu ljudi.

Etičkih pitanja vezanih uz CRISPR-Cas9:

Mogućnost uređivanja gena ljudskih embriona postavlja ozbiljna etička pitanja, posebno kada se radi o promjenama koje se mogu prenijeti nasljedno. Postavlja se pitanje gdje povući granicu između terapijskih intervencija (poput ispravljanja genetskih bolesti) i poboljšanja genetskih osobina (12). Mogućnost preciznog uređivanja gena otvara vrata mogućnosti stvaranja "dizajnirane djece" s određenim genetskim karakteristikama, što izaziva etička pitanja vezana uz autonomiju pojedinca i mogućnost stvaranja genetskih elitizama. Genetskog uređivanja s ciljem poboljšanja određenih svojstava (inteligencija, sportske sposobnosti, itd.) postavlja pitanje etičkih granica i potencijalnog stvaranja socijalnih nejednakosti.

Neželjeni genetski učinci i neželjene promjene u genomu mogu se dogoditi tokom postupka uređivanja, a njihovo dugoročno ispitivanje i predviđanje može predstavljati etički izazov. Sigurnost i pouzdanost postupaka CRISPR-Cas9 uređivanja gena su ključne etičke brige (13). Kako će tehnologija biti dostupna i ko će imati pristup njoj? Pitanja pravednosti i jednake distribucije dobiti od genetskog uređivanja postaju



važna u kontekstu globalne zdravstvene jednakosti.

Postavlja se pitanje kako spriječiti zloupotrebu CRISPR-Cas9 tehnologije, uključujući neetičke primjene, terorističke prijetnje, ili potencijalnu upotrebu u vojne svrhe.

Zbog brzog razvoja tehnologije, važno je osigurati učinkovitu suradnju između naučnika, etičara, zakonodavaca i javnosti kako bi se postigla odgovorna primjena CRISPR-Cas9 tehnologije.

Također se neophodno postaviti jasna i stroga pravila, regulacije i etičke standarde kako bi se osigurala odgovorna upotreba CRISPR-Cas9 tehnologije i kako bi se izbjegle neetičke ili rizične primjene (14). Etička pitanja vezana uz CRISPR-Cas9 tehnologiju aktivno se raspravljaju i prate na globalnoj razini, uključujući i rad međunarodnih organizacija, kao što su UNESCO i WHO, kako bi se postavili smjernice za sigurnu, odgovornu i etičku primjenu ove moćne tehnologije.

ZAKLJUČAK

Personalizirana medicina kombinira informacije o genetskim, molekularnim i drugim biološkim faktorima pacijenta kako bi se prilagodila dijagnoza, liječenje i prevencija bolesti. Kada se personalizirana medicina integrira sa savremenom molekularnom dijagnostikom, otvara se mogućnost preciznije dijagnoze i prilagođenijeg tretmana svakom pacijentu (15).

Na temelju molekularnih analiza, ljekari mogu odabrati ciljanu terapiju koja je usmjerena na specifične molekularne promjene povezane s bolešću pacijenta. Ovo može poboljšati učinkovitost terapije i smanjiti nuspojave. Molekularna dijagnostika omogućava praćenje promjena u genetskom i molekularnom profilu tokom vremena, što može biti od posebne važnosti u praćenju hroničnih bolesti ili raka. Razumijevanje genetskih predispozicija ili rizičnih faktora pomoću molekularne dijagnostike omogućava usmjeravanje preventivnih mjera i rano otkrivanje bolesti (16). Personalizirana medicina uz korištenje savremenih molekularnih dijagnostičkih alata donosi revoluciju u pristupu



zdravstvenoj zaštiti, pružajući prilagođene terapije temeljene na jedinstvenim biološkim karakteristikama svakog pacijenta.

S novim dostignućima dolaze i izazovi, uključujući etička pitanja privatnosti podataka, dostupnost tehnologije, nužnost educiranja zdravstvenih stručnjaka i pacijenata. Ipak, u konačnici na prvo mjesto treba biti humani pristup prema svakom pacijentu i čovjeku, te ljudska empatija, profesionalni pristup i razumijevanje svakog ljudskog bića.



LITERATURA:

1. Zhang H, Li H, Zhu H, Pekárek J, Podešva P, Chang H, et al. Revealing the secrets of PCR. *Sens Actuators B Chem.* 2019; 298:126924.
2. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Eurosurveillance.* 2012;17(39):20285.
3. Cicatiello R, Pignataro P, Izzo A, Mollo N, Pezone L, Maruotti GM, et al. Chromosomal microarray analysis versus karyotyping in fetuses with increased nuchal translucency. *Medical Sciences.* 2019;7(3):40.
4. Santos M, Kishimoto RK, Safranauskas R, Coimbra AAC, Silva GSE, Silva JL, et al. KARYOTYPE ANALYSIS OF ADVANCED THERAPY SPECIMENS IN A ROUTINE CYTOGENETIC LABORATORY. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2023;45:S515–6.
5. Nath J, Johnson KL. A review of fluorescence in situ hybridization (FISH): current status and future prospects. *Biotechnic & Histochemistry.* 2000;75(2):54–78.
6. Hajba L, Jeong S, Chung DS, Guttman A. Capillary Gel Electrophoresis of Proteins: Historical overview and recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2023;117024.
7. Green MR, Sambrook J. Agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc.* 2019;2019(1):pdb-prot100404.
8. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature.* 2017;550(7676):345–53.
9. Rodriguez R, Krishnan Y. The chemistry of next-generation sequencing. *Nat Biotechnol.* 2023;41(12):1709–15.
10. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-as13a/C2c2. *Science (1979).* 2017;356(6336):438–42.
11. Wight A V, Nuñez JK, Doudna JA. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell.* 2016;164():29–44.
12. Xonto'rayev S. ETHICAL CONSIDERATIONS IN GENETIC ENGINEERING. *Engineering problems and innovations.* 2023;
13. Erdmann A, Rehmann-Sutter C, Bozzaro C. Patients' and professionals' views related to ethical issues in precision medicine: a mixed research synthesis. *BMC Med Ethics.* 2021;22(1):116.
14. Pullman D, Etchegary H. Ethical, Legal, and Social Issues (ELSI) in Clinical Genetics Research. *Clinical*



- Epidemiology: Practice and Methods. 2021;65–82.
15. Mathur S, Sutton J. Personalized medicine could transform healthcare. Biomed Rep. 2017;7(1):3–5.
 16. Zhang S, Bamakan SMH, Qu Q, Li S. Learning for personalized medicine: a comprehensive review from a deep learning perspective. IEEE Rev Biomed Eng. 2018;12:194–208.



MOLECULAR METHODS IN LABORATORY DIAGNOSTICS

Madacki Todorović K.

ABSTRACT

Modern molecular methods have revolutionized laboratory diagnostics in recent decades, providing incredible insights into the genetic and molecular basis of disease. This paper provides an overview of key molecular techniques used in laboratory diagnostics and their impact on clinical practice. The paper includes an overview of nucleic acid amplification techniques such as polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, highlighting their applications in the detection and quantification of genetic material. Additionally, the role of next-generation sequencing (NGS) in uncovering genomic information, enabling comprehensive analysis of genetic variation associated with various diseases. The use of molecular diagnostics is essential in the accurate and timely detection of diseases in infectious diseases, oncology and genetic disorders.

As molecular methods continue to develop, their application opens up possibilities for increasing the precision, speed and scope of laboratory diagnostics, which ultimately contributes to the effective treatment of patients and personalized patient treatment approaches.

Advances in molecular methods have revolutionized laboratory diagnostics, offering unparalleled precision and efficiency in disease detection and characterization. The emphasis is on the application of molecular techniques in the modern diagnostic approach, their role in identifying genetic markers, infectious agents and various processes at the cellular level.

Molecular techniques have transformed genetic analysis, enabling the identification of mutations, genomic variations, and microbial genomes with high precision.

Nucleic acid hybridization techniques such as fluorescence in situ hybridization (FISH) and microarray are methods that facilitate the visualization and identification of specific DNA or RNA sequences, offering valuable insights into chromosomal abnormalities and gene expression patterns.

Modern application of molecular diagnostics and methods are important in the process of making clinical decisions, therapeutic strategies and approaches to personalized medicine. Molecular methods are playing an increasingly prominent role in laboratory diagnostics, providing clinicians with invaluable insights into accurate diagnosis and personalized patient care. In addition to infectious diseases and genetics, the application of molecular diagnostics also plays a role in pharmacogenomics, personalized medicine and monitoring of oncology patients.

Keywords: molecular methods, laboratory diagnostics, personalized medicine

CORRESPONDING AUTHOR

Kamelija Madacki Todorović, MA genetic

School of Science and Technology,

Medical school Sarajevo

Tel. 061/219-088

E-mail: kamelija.madacki@ssst.edu.ba

