

## Неинвазивная ДНК-диагностика в репродуктивной медицине\*

Жигалина Д.И.<sup>1</sup>, Скрыбин Н.А.<sup>1,2</sup>, Лебедев И.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> — Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050, г.Томск, пр. Ленина, 36; e-mail: darya.zhigalina@medgenetics.ru

<sup>2</sup> — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики», 634050, г.Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

В настоящее время диагностические процедуры, не требующие инвазивного вмешательства, пользуются большой популярностью. При пренатальной диагностике подобные методы позволяют исключить риск причинения вреда здоровью матери и плода. В обзоре рассмотрены основные подходы, применяемые в настоящий момент при неинвазивной генетической пренатальной диагностике. Отдельное внимание уделено возможности использования разработанных методов в клинической практике в настоящее время и в ближайшей перспективе.

**Ключевые слова:** внеклеточная ДНК плода, неинвазивная пренатальная генетическая диагностика, неинвазивная преимплантационная генетическая диагностика, определение пола плода, резус-фактор плода, анеуплоидия

### Введение

Разработка неинвазивных методов генетического анализа в пренатальной диагностике позволяет выявить хромосомные нарушения плода без использования инвазивных процедур. Такая диагностика имеет ряд преимуществ перед классической инвазивной диагностикой, в настоящий момент широко применяемой в клинической практике и включающей в себя исследование биологического материала, полученного при аспирации ворсин хориона, амниоцентезе или кордоцентезе.

Данные второго российского мультицентрового исследования показывают, что вероятность прерывания беременности в течение двух недель после инвазивного вмешательства составляет в среднем 1,7% [2]. По данным F. Mijezinovic и Z. Alfrevic, инвазивные процедуры приводят к риску выкидыша в 0,6%, а в течение 14 дней после процедуры — в среднем в 2% случаев [36]. Ряд факторов может повлиять на развитие осложнений и на результаты инвазивной пренатальной диагностики. К таким факторам можно отнести возраст женщины, осложненный акушерский анамнез, опыт врача, оснащенность медицинского учреждения и другие [7].

Несмотря на относительную сложность проведения неинвазивной диагностики, ее результативность может быть сопоставима с таковой у инвазивных методов анализа. Использование внеклеточной ДНК, выделенной из плазмы крови матери при неинвазивной генетической диагностике трисомии 21, показало высокую частоту выявления анеуплоидии (99%) и низкий уровень ложноположительных результатов — около 0,1% [10, 38, 48].

Неинвазивная пренатальная генетическая диагностика основана на анализе клеток плода полученных из кро-

вотока матери, а также на исследовании внеклеточной ДНК плода (cell-free fetal DNA, cffDNA) либо внеклеточной РНК плода (cffRNA). До недавнего времени отдельное внимание уделялось получению фетальных клеток из кровотока матери [1, 4]. Однако использование такого подхода сопряжено с существенными методическими ограничениями вследствие чрезвычайно низких концентраций плодных клеток в крови матери. В настоящем обзоре речь пойдет о внеклеточной ДНК/РНК плода в крови матери в связи с тем, что в настоящий момент их анализ является наиболее активно развиваемой областью исследований в репродуктивной медицине.

В 1997 г. Dennis Lo с соавторами показали наличие ДНК плода в плазме и сыворотке крови беременных женщин [30]. Стоит сказать, что заметный вклад в изучение биологии внеклеточных нуклеиновых кислот в плазме крови человека внесли и отечественные ученые — В.В. Власов, П.П. Лактионов и Е.Ю. Рыкова [52]. Так, например, ими было показано, что в крови беременных женщин ДНК может находиться в свободном состоянии и быть связанной с клеточной поверхностью. Также была получена информация относительно размеров фрагментов внеклеточных нуклеиновых кислот. Полученные данные можно использовать не только для неинвазивной пренатальной генетической диагностики, но и, например, для диагностики рака на ранних стадиях.

С момента обнаружения внеклеточных ДНК и РНК плода в крови матери появилась возможность их использования для неинвазивной пренатальной диагностики генетических заболеваний у плода (НПД / NIPT) [13]. Внеклеточная ДНК состоит из фракционированных нуклеазами последовательностей ДНК, наиболее длинные из

\* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 15-04-08265, гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации № 14.120.14.5096-НС и Программы «Научный фонд им. Д.И. Менделеева Томского государственного университета» в 2015 г.

которых (преимущественно материнские) представлены фрагментами по 133—166 п.н. [33]. Внеклеточная ДНК плода составляет 6—10% всей внеклеточной ДНК в первом и втором триместрах беременности и возрастает до 20% в третьем триместре [33, 35]. Именно с ее выделением и анализом связано развитие методов НПД (рис. 1).

### Неинвазивная пренатальная диагностика пола плода

В кровотоке матери внеклеточную ДНК плода можно определить количественно, что важно для ранней доклинической диагностики осложнений беременности.

Первые исследования, касающиеся НПД анеуплоидий, фокусировались на количественном определении последовательностей мужской внеклеточной ДНК плода в материнской плазме методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [31]. Это связано с тем, что выявление последовательностей Y-хромосомы дает возможность точно разделить ДНК плода и внеклеточную ДНК матери.

Опубликованы работы по обнаружению последовательностей Y-хромосомы плода в целях выявления наследственных заболеваний, сцепленных с полом [58]. Было проведено множество исследований для того, чтобы оценить точность детекции Y-хромосомы в виде внеклеточной ДНК плода в кровотоке матери и в дальнейшем использовать эти данные для диагностики пола плода, сцепленных с полом заболеваний и врожденной дисплазии надпочечников [27]. В настоящее время неинвазивное определение пола на основании ДНК плода в плазме крови матери можно считать достаточно точным методом [17]. Известно, что до седьмой недели беременности чувствительность определения локусов

Y-хромосомы методом обычной ПЦР составляет 95%, а при использовании ПЦР в реальном времени уже на пятой неделе развития можно определить пол эмбриона с точностью до 100% [3]. В связи с этим подобные тесты были внедрены в практику в ряде клиник [27].

В качестве примера можно привести работу P.G. Scheffer с соавторами. В их исследовании была проанализирована плазма крови беременных женщин, накопленная в лаборатории за 6 лет [46]. Был проведен ПЦР-анализ гена *SRY* и мультикопийной последовательности маркера *DYS14*. В случае положительного результата для обеих анализируемых последовательностей делали вывод о беременности плодом мужского пола. Если результат был отрицательный, ДНК плода анализировалась по 24 диаллельным полиморфизмам (инсерций/делений) или наследуемым по отцовской линии генам антигенов групп крови. При обнаружении ДНК плода сообщалось о беременности плодом женского пола. Тестирование проводилось с участием 201 женщины. Средний гестационный возраст составил 9 недель. В 189 из 201 случая (94%) был получен результат тестирования; в 10 случаях наличие внеклеточной ДНК плода не было подтверждено; еще в двух случаях (1%) произошел ранний выкидыш. Информация об исходах беременности была доступна в 197 случаях, среди них 105 беременностей завершились рождением мальчиков, а 81 — рождением девочек, 11 беременностей закончились спонтанными выкидышами. Чувствительность и специфичность теста составили 100%. Во всех 10 случаях, в которых не было обнаружено внеклеточной ДНК плода, родились девочки. Таким образом, авторы делают вывод о высокой надежности и возможности применения в кли-

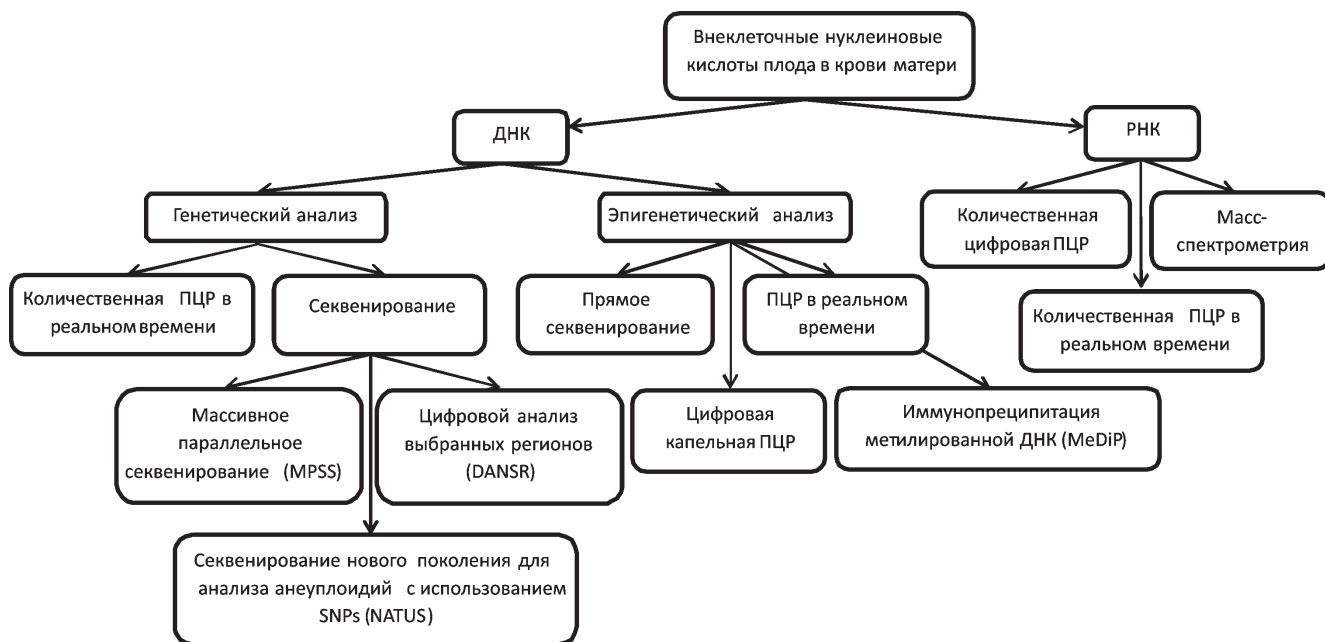


Рис. 1. Схематическое представление методов, используемых в неинвазивной пренатальной генетической диагностике.

нической практике вышеописанных методов анализа для определения пола плода.

В 2011 г. О.В. Малышевой и В.С. Барановым был проведен анализ пола плода с помощью наборов для НПД, изготавливаемых ООО «Ген-технология» [5]. В результате из 16 образцов 10 были верно диагностированы как плоды мужского пола, а также правильно определено 3 плода женского пола. В двух случаях был зарегистрирован ложноположительный результат. Таким образом, диагностическая точность составила 87%.

#### **Определение резус-фактора плода методами неинвазивной пренатальной диагностики**

Еще одной областью применения анализа внеклеточной ДНК плода стало определение резус-фактора (RhD) плода для исключения возможного резус-конфликта. Плод с группой крови RhD+ подвергается риску гемолитической болезни новорожденного, если у матери статус RhD-, и в крови присутствуют антитела к RhD+. Резус-фактор может быть определен методом анализа внеклеточной ДНК плода, потому что ген резус-фактора присутствует в геноме RhD+ плода, но не у резус-негативной матери. Было показано, что анализ внеклеточной ДНК плода является безопасным и эффективным способом определения резус-фактора плода [54]. Этот подход также был широко принят во многих клинических центрах [15].

R.J.P. Rijnders с соавторами проводили количественную ПЦР в режиме реального времени последовательностей резус-фактора и гена *SRY* у пациентов с повышенным риском сцепленных с полом заболеваний, а также у пациентов с антителами к резус-фактору [45]. Было проанализировано 72 образца. Чувствительность ПЦР к RhD составила 100% и специфичность 96,6%, в то время как чувствительность к *SRY* была 97,2%, а специфичность 100%. Исследователи делают вывод о возможности применения плазмы крови матери для определения RhD плода в клинической практике.

В работе А.Н. Маркеловой с соавторами проводилось определение резус-фактора плода на основании анализа плазмы крови беременных женщин. Использовались образцы крови 100 беременных RhD- женщин [6]. Применялась ПЦР в реальном времени с использованием диагностических наборов «ДНК-резус ребенка» производства ООО «Ген-технология» (Россия, РУ №ФСР2010/09565). Чувствительность и специфичность данного метода диагностики составили 100%. Показано, что диагностические наборы можно рекомендовать для внедрения в медицинскую практику для ранней неинвазивной диагностики резус-фактора плода. Данный метод диагностики позволяет разделить беременных с резус-отрицательной кровью на две группы в соответствии с резус-фактором плода. Такой подход дает возможность снизить финансовые затраты на антирезус-иммуноглобулин, определение титра антител у женщин с RhD- плодом и уделить особое внимание женщинам

с RhD+ плодом в связи с возможностью возникновения гемолитической болезни плода и новорожденного.

#### **Неинвазивная пренатальная генетическая диагностика анеуплоидий**

Не менее актуальным вопросом на настоящий момент является НПД анеуплоидий. Было предложено несколько молекулярно-генетических методов, с помощью которых можно определить трисомию хромосом 13, 18 и 21. Данные трисомии наиболее часто фиксируются у развивающегося плода и обуславливают хорошо известные синдромы, а именно, синдром Дауна (трисомия 21), синдром Эдвардса (трисомия 18) и синдром Патау (трисомия 13). Таким образом, разработка и внедрение методов молекулярно-генетической диагностики для выявления данных хромосомных aberrаций крайне важны для клинической практики, а успешное применение методов генетической НПД дает возможность провести диагностику даже у тех женщин, которые по ряду причин отказываются от инвазивного вмешательства.

Выделяют два основных подхода к анализу внеклеточной ДНК — количественный и основанный на исследовании однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) методы. В первом случае внеклеточная ДНК плода, выделенная из плазмы матери, секвенируется и затем определяется принадлежность каждой молекулы к той или иной хромосоме на основании сравнения с референсным геномом человека. Если у плода есть трисомия по какой-нибудь хромосоме, то количество молекул этой хромосомы при сравнении с дисомной референсной хромосомой, является более высоким, чем при эуплоидных беременностях.

В противоположность этому, методы, основанные на исследовании SNP, определяют число копий хромосом путем поиска аллельных различий [39].

В настоящий момент в литературе есть данные о том, что концентрация ДНК плода в крови матери при наличии тех или иных хромосомных нарушений плода возрастает. Так, например, показано, что при вынашивании плода с синдромом Дауна в плазме и сыворотке матери уровень внеклеточной ДНК плода повышается в среднем в 2 раза [3]. В исследовании Y.M.D. Lo с соавторами была проведена количественная ПЦР на Y-хромосому [32]. Анализировали плазму крови, взятую у женщин трех групп: женщин с плодами мужского пола, имеющими трисомию 21; женщин с нормальными плодами мужского пола и женщин с плодами женского пола. Работа выполнялась в двух научно-исследовательских центрах. В исследовании, проведенном в Гонконге, показано, что средние концентрации ДНК плода, циркулирующей в крови матери, у женщин с плодом с трисомией 21 и эуплоидным плодом мужского пола составили 46,0 геном-эквивалент/мл и 23,3 геном-эквивалент/мл соответственно ( $p = 0,028$ ). А в исследовании, которое было проведено в Бостоне, аналогичные показатели в среднем были равны 48,2 геном-эквивалент/мл и 16,3 геном-эквивалент/мл, соответственно ( $p = 0,026$ ). Ни у одной из женщин с пло-

дами женского пола в ДНК из плазмы крови не было обнаружено сигналов Y-хромосомы. Факт получения сопоставимых результатов при анализе двух популяций — Гонконга и Бостона — подтверждает надежность сделанных выводов. В связи с этим, авторы полагают, что проведение межлабораторных исследований с использованием ПЦР в реальном времени демонстрирует, что данный метод является надежным и воспроизводимым при использовании для НПД как анеуплоидий, так и пола плода.

Увеличение концентрации внеклеточной ДНК плода было отмечено не только при трисомии 21, но и при других нарушениях течения беременности, таких, как самопроизвольный выкидыш в первом триместре, преждевременные роды [19], истинное приращение плаценты, гестоз, многоводие, гиперемезис [47]. Отмечено, что повышение концентрации внеклеточной ДНК плода на ранних сроках беременности может служить маркером для ранней диагностики осложнений беременности [55]. Одним из таких осложнений может быть преэклампсия. Показано, что при преэклампсии в 10 раз по сравнению с нормой увеличивается концентрация внеклеточной ДНК плода и внеклеточной ДНК матери. Стоит отметить, что концентрация внеклеточной ДНК повышалась в соответствии с тяжестью осложнения. Также отмечено, что ее концентрация возрастала до появления симптомов преэклампсии [56]. Таким образом, по изменению концентрации внеклеточной ДНК плода в кровотоке матери можно предсказать либо диагностировать осложнения беременности, однако не стоит забывать, что на концентрацию внеклеточной ДНК плода в крови матери могут оказывать влияние срок беременности и, теоретически, возраст женщины.

В лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики г. Томска ранее было проведено одно из первых в России исследований по анализу концентрации внеклеточной ДНК плода в кровотоке матери в течение беременности [9]. Результаты работы показали увеличение концентрации свободно циркулирующей ДНК, а также внеклеточной ДНК матери, связанной с клеточной поверхностью, в ходе беременности. При этом была выявлена тенденция к снижению материнской и плодной внеклеточной ДНК, находящейся на поверхности клеток крови, во II триместре беременности. Аналогичного эффекта в плазме беременных женщин обнаружено не было. В данном исследовании не было обнаружено связи между концентрацией ДНК плода в плазме матери и сроком беременности, несмотря на то, что имеются данные о резком увеличении внеклеточной ДНК плода лишь в последние недели беременности и в период родов [11]. Что касается изменения ее концентрации в зависимости от возраста матери, то корреляции между этими показателями выявлено не было. Хотелось бы отметить, что для интерпретации результатов неинвазивной пренатальной генетической диагностики необходимо учитывать данные, полученные в исследованиях по колебанию концентрации внеклеточной ДНК в кровотоке матери.

В исследовании Т. Wataganara с соавторами было отмечено возрастание уровня ДНК плода по сравнению с нормой в крови женщин, вынашивающих плоды с трисомиями 13 и 21, но для трисомии 18 подобного повышения концентрации отмечено не было [53].

В 2015 г. вышла статья М.М. Gil с соавторами, в которой описаны результаты проведенного метаанализа 37 исследований [21]. Все анализируемые работы были опубликованы с 2011 по 2015 гг. и касались использования внеклеточной ДНК при скрининге анеуплоидий у плода. Авторы вычислили суммарную частоту обнаружения и частоту получения ложноположительных результатов (рис. 2). При одноплодной беременности для трисомии 21 эти показатели составили 99,2% и 0,09%, соответственно, для трисомии 18 — 96,3% и 0,13%, для трисомии 13 — 91,0% и 0,13%, а для моносомии X — 90,3% и 0,23%, для других анеуплоидий половых хромосом — 93,0% и 0,14%. При анализе многоплодных беременностей для трисомии 21 данные показатели составили 93,7% и 0,23%. Авторы полагают, что скрининг трисомии 21 с использованием внеклеточной ДНК превосходит по результативности и более низкой частоте ложноположительных результатов традиционные методы скрининга. Однако данное заключение можно отнести не ко всем обозначенным анеуплоидиям, а только лишь к нарушению копийности хромосомы 21.

Стоит сказать, что в настоящий момент выявление хромосомных аномалий путем анализа внеклеточной ДНК плода можно считать хорошей альтернативой инвазивным подходам. Хотя не стоит забывать о том, что даже методы генетической НПД анеуплоидий, разрабатываемые и используемые в настоящее время, не всегда эффективны и имеют погрешность.

### Массивное параллельное секвенирование генома плода

В первых отчетах об успешном выявлении трисомии во время беременности с использованием массивного параллельного секвенирования (Massive parallel sequencing / MPS) были идентифицированы и подсчитаны несколько миллионов фрагментов ДНК от всех хромосом [18]. Методом массивного параллельного секвенирования можно определить происхождение каждой секвенированной молекулы ДНК из плазмы матери и обнаружить избыточную или недостаточную представленность любой хромосомы в плазме.

S. Dan с соавторами было проведено массивное параллельное секвенирование ДНК материнской плазмы [14]. Исследование включало в себя результаты пренатального теста на трисомии 21 и 18, проведенного у беременных женщин в 49 медицинских центрах за 2 года. Из 11 105 беременностей 190 случаев были классифицированы как положительные, из них 143 случая — с трисомией 21 и 47 — с трисомией 18. При проведении MPS для трисомии 21 был получен всего один ложноположительный результат, так же как и для трисомии 18. Таким образом, чувствительность теста составила 100%, а специфичность обнаружения трисомии 21 и 18 — 99,96%.

J.O. Kitzman с соавторами провели секвенирование геномов двух родителей, полногеномное гаплотипирование матери и глубокое секвенирование материнской плазмы для неинвазивного определения последовательности генома плода на 18,5 неделе беременности [28]. Было обнаружено 39 из 44 точечных мутаций *de novo*, однако наблюдалась чрезвычайно низкая специфичность в связи с наличием ложноположительных результатов. В работе был применен ряд фильтров, позволивших увеличить специфичность практически в 3000 раз. После анализа второй семьи выяснили, что вполне достаточно 300 пар оснований родительских гаплотипных блоков в сочетании с мелкими последовательностями ДНК в материнской плазме, для того, чтобы в значительной степени определять унаследованный компонент родительского генома в геноме плода. Исследователи предполагают, что неинвазивный анализ наследственных изменений и мутаций, возникающих *de novo*, будет содействовать развитию пренатальной диагностики как рецессивных, так и доминантных менделирующих заболеваний.

Описаны две технологии MPS, которые могут представлять интерес для клинического секвенирования — MPSS (Massive parallel signature sequencing) и DANSR (Digital Analysis of Selected Regions). Этими методами можно провести предварительный отбор хромосом для диагностики, что снижает количество неиспользуемых данных секвенирования. Более того, может быть использовано быстрое секвенирование нового поколения (rapid next-generation sequencing), что уменьшит финансовые затраты, время обработки и увеличит количество пациентов, которых можно обследовать в течение недели.

Одним из таких методов является цифровой анализ выбранных областей DANSR, при котором выбранные неполоморфные локусы на хромосомах, представляющих

клинический интерес, анализируются количественно и одновременно. При этом осуществляется селективное секвенирование локусов исследуемых хромосом, тем самым увеличивая производительность и снижая стоимость тестирования [48].

В свою очередь, MPSS представляет собой рандомизированный анализ миллионов фрагментов внеклеточной ДНК плода. Это технология основана на секвенировании коротких сегментов плодной ДНК из крови матери и от плода с последующим распределением их по хромосомам. Такой подход используют, когда необходимо провести анализ большого числа фрагментов ДНК на пробу. Данный подход демонстрирует относительно высокую чувствительность и 100%-ную специфичность. В качестве примера можно привести работу D.W. Bianchi с соавторами [10]. В исследовании проводился анализ 532 проб. Были правильно классифицированы: 89 из 89 трисомий по хромосоме 21 (чувствительность 100%), 35 из 36 трисомий 18 (чувствительность 97,2%), 11 из 14 трисомий 13 (чувствительность 78,6%). Также был корректно определен пол 232 из 233 эмбрионов женского пола (чувствительность 99,6%) и 184 из 184 эмбрионов мужского пола (чувствительность 100%). При этом было выявлено 15 из 16 случаев моносомии X, чувствительность 93,8%. В данной работе при анализе анеуплоидий аутосом не было зафиксировано ни одного ложноположительного результата, таким образом, специфичность теста составила 100%. Стоит отметить, что такие анеуплоидии половых хромосом, как 47,XXX, 47,XXY и 47,XYY также были верно диагностированы.

Клинические исследования показали, что и MPSS, и DANSR могут с успехом применяться для высокоэффективного скрининга трисомии хромосом 21 и 18 и, в меньшей степени, трисомии хромосомы 13 у женщин группы высокого риска [38].

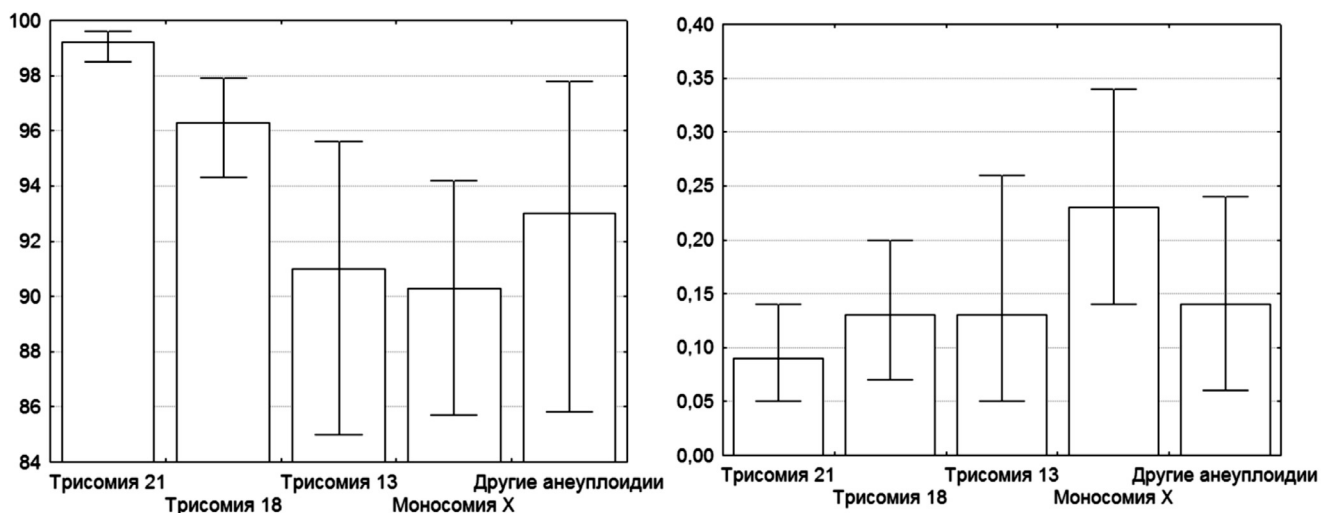


Рис. 2. Результаты метаанализа 37 исследований по использованию внеклеточной ДНК плода для диагностики анеуплоидий плода при одноплодной беременности [21]. Слева — частота обнаружения различных типов анеуплоидий. Справа — частота ложноположительных результатов при анализе анеуплоидий.

### Другие молекулярно-генетические методы неинвазивной пренатальной диагностики

Альтернативой MPSS и DANSR является метод, предложенный G.J. Liao с соавторами [29]. Он основан на анализе SNP и включает в себя таргетную амплификацию и анализ 11 000 или 19 488 SNPs на хромосомах 21, 18, 13, X, и Y в одной реакции. Первоначально было проанализировано этим методом лишь 2906 полиморфных локусов, затем B. Zimmermann с соавторами провели анализ 11 000 SNP, однако позже появилась возможность увеличить количество анализируемых однонуклеотидных полиморфизмов до 19 488 [29, 39, 57]. Использование SNP может уменьшить вариабельность амплификации от хромосомы к хромосоме, но при этом существует необходимость наличия эталонной хромосомы [26, 57].

K.H. Nicolaides с соавторами поставили перед собой цель — оценить возможности метода, основанного на исследовании SNP в сочетании с алгоритмом, называемым NATUS (Next-generation Aneuploidy Test Using SNPs), для обнаружения трисомии хромосом 21, 18 и 13, анеуплоидий половых хромосом и триплоидии в образцах материнской крови [39].

Алгоритм NATUS имеет ряд отличительных черт. В нем используется информация о материнском генотипе и частоте рекомбинации для построения *in silico* миллиардов возможных генотипов плода, после чего каждая из полученных гипотез сравнивается с фактическими измерениями и, таким образом, вычисляется относительная вероятность каждой гипотезы. В связи с тем, что данный метод позволяет проанализировать аллельное распределение и не требует использования дисомной референсной хромосомы, ожидается, что он однозначно будет способен обнаруживать триплоидии.

Другой метод подразумевает дополнительный анализ родительской ДНК. При этом наблюдаемое распределение аллелей после секвенирования полиморфных локусов хромосом, представляющих клинический интерес, сопоставляется с ожидаемым распределением аллелей на основании родительских генотипов [57]. С учетом хорошо известных эпигенетических различий между материнской и плодной ДНК, было проведено определение дозы хромосом плода [42].

В настоящее время активно ведутся работы по усовершенствованию молекулярно-генетических методов, используемых для НПД. Последние методические разработки в этой области и хорошее лабораторное оснащение большого числа клиник по всему миру делают генетическую НПД более качественной и эффективной.

### Детекция РНК-транскриптов, специфичных для определенных трисомий

В работе A.T. Go с соавторами приводится достаточно полный обзор исследований, касающихся внеклеточной РНК плода, присутствующей в крови матери [25]. Уровень экспрессии и циркуляции молекул РНК намного выше, чем у плодной ДНК, но концентрация

различается для отдельных генов. Однако выделение РНК представляется технически более сложным процессом. Существуют также и тканеспецифичные различия в экспрессии того или иного гена, формирующие характерный профиль мРНК. Плодная мРНК может быть потенциальным биомаркером для неинвазивного обнаружения анеуплоидий во время беременности.

Впервые доказательство присутствия мРНК плода было продемонстрировано L.L. Roop с соавторами с помощью мРНК белка цинкового пальца (ген картирован на Y-хромосоме) [43]. Впоследствии было показано присутствие мРНК плода в крови всех беременных женщин при анализе плаценто-специфической мРНК человеческого плацентарного лактогена (hPL) и мРНК  $\beta$ -субъединицы человеческого плацентарного хорионического гонадотропина ( $\beta$ -hCG) [37]. Продемонстрирована стабильность присутствия плацентарной мРНК в плазме матери. Были проведены исследования профилей экспрессии генов в плацентарных тканях и крови матери в первом и третьем триместре с помощью олигонуклеотидных микрочипов с последующим применением количественной ПЦР в режиме реального времени. В исследовании N.B. Tsiu с соавторами отмечено 6 генов, транскрипты которых обнаруживаются в плаценте: *hPL*, *b-hCG*, *CRH*, *TFP12*, *KISS1* и *PLAC1* [50]. А в работе A.T. Go показано различие в присутствии в плазме крови у беременных и небеременных женщин транскриптов еще для ряда генов: *GCM1*, *ZDHHC1*, *PAPPA*, *PSG9*, *PLAC1*, *b-hCG* и *LOC90625* [22].

В настоящее время проводится поиск специфичных маркеров для обнаружения трисомии 21 с использованием внеклеточной мРНК. В 2003 г. впервые была описана специфическая для хромосомы 21 мРНК под названием *LOC90625* (*C21orf105*), присутствующая в плазме крови матери [40]. Однако использование данной мРНК в качестве маркера трисомии 21 оказалось невозможным в связи с низким уровнем её экспрессии и большой индивидуальной вариабельностью [24]. Тем не менее был разработан другой подход неинвазивной детекции трисомии 21, заключающийся в определении дозы однонуклеотидного полиморфизма ряда генов хромосомы 21, которые не экспрессируются в материнских клетках крови, а только в плацентарных тканях. Такими генами стали *PLAC4* и *SERPINB2* [16]. Ограничение SNP-зависимых подходов заключается в том, что они применимы только для плода, гетерозиготного по изучаемому SNP. Кроме того, иногда необходимы дополнительные условия, например, если мать гомо- либо гетерозиготна. Поиск других удобных генов привел к обнаружению плацентарной мРНК с потенциально различными SNPs [23]. Помимо гена *PLAC4* было выявлено еще 6 генов: *COL6A1*, *BTG3*, *ADAMTS1*, *C21orf105*, *APP*, — которые потенциально можно использовать для НПД. Все описанные SNP-маркеры были обнаружены у женщин первого триместра беременности и отсутствовали у небеременных женщин.

Использование SNP в мРНК, кодируемой геном *PLAC4*, показывает высокую информативность и чувствительность для определения трисомии 21 у плода в первом триместре. Были созданы диагностические тесты для анализа аллельного соотношения РНК-SNP гетерозиготных образцов с применением масс-спектрометрии (MS) и цифровой ПЦР [51]. Одним из преимуществ цифровой ПЦР является возможность ее использования при низких концентрациях мРНК. Для гомозиготных образцов применялись количественная ПЦР в реальном времени и количественная цифровая ПЦР. При использовании масс-спектрометрии и цифровой ПЦР были достигнуты высокие показатели диагностической чувствительности (100%) и специфичности (89,7%). Стоит отметить, что данный скрининг-тест еще не готов к использованию в клинической диагностике, так как вероятность ложноположительных результатов составляет примерно 17%. Также для подобных анализов необходимо специализированное оборудование, что затрудняет внедрение стратегии РНК-SNP в практику.

#### Эпигенетические методы в неинвазивной пренатальной диагностике

Эпигенетический анализ также является перспективным способом оценки количества внеклеточной ДНК плода. Результаты такого анализа показывают активность определенных генов, но при этом не дают информации о первичной структуре ДНК. В эпигенетических исследованиях используется широкий спектр методов молекулярной биологии. Достаточно часто для эпигенетического анализа используют чувствительные к метилированию рестриктазы.

К первым работам в данной области стоит отнести исследование L.L. Roop с соавторами. Они показали, что для специфического определения ДНК плода в материнской плазме можно использовать эпигенетические маркеры [44]. Для исследования были выбраны локус *IGF2-H19* и однонуклеотидный полиморфизм в этом регионе. Отцовский аллель гена *H19* метилирован, а материнский аллель остается неметилированным. В исследовании приняло участие 39 женщин, у 16 из которых были проведены дальнейшие исследования в связи с тем, что они оказались гетерозиготами по анализируемому однонуклеотидному полиморфизму. В результате методом прямого секвенирования было показано, что в 55% (11 из 16) случаев обнаруживается метилированная ДНК плода, которая наследовалась по отцовской линии. Таким образом, появилась возможность на основании дифференциального статуса метилирования аллелей обнаруживать ДНК плода в кровотоке матери.

Масштабные исследования различий метилирования между материнским и плодным геномами привели к идентификации дифференциально метилированных регионов (Differentially methylated regions / DMRs). Было выявлено большое количество сайтов, различным образом метилированных у матери и плода. Стоит отметить,

что первым геном, который был идентифицирован как гипометилированный в крови матери, оказался *SERPINB5*. Дополнительные исследования были сосредоточены на промоторном регионе гена или CpG-островках на хромосоме 21 [12].

В 2009 г. обнаружена чувствительность к метилированию рестриктазы BstUI для селективного гидролиза гиперметилированного у матери гена *RASSF1A* [3]. П. Гореловым с соавторами был проведен анализ концентрации плодной внеклеточной ДНК методом ПЦР в режиме реального времени. Эффективность реакции ПЦР составила 91%. Показано, что у двух женщин с пятикратным превышением внеклеточной ДНК плода, по сравнению с группой женщин с нормально протекающей беременностью, развилось осложнение беременности в виде гестоза.

Y.K. Tong с соавторами предложили новый метод детекции трисомии 21, который сочетает в себе специфические для плода эпигенетические и генетические маркеры [49]. Для того, чтобы найти маркеры внеклеточной ДНК плода на хромосоме 21, которая была по-разному метилирована в плаценте и в клетках крови матери, использовали рестрикцию чувствительными к метилированию эндонуклеазами, а затем в процессе анализа методом цифровой капельной ПЦР выявляли маркеры. Анализ числа копий хромосом проводили путем сравнения дозы эпигенетического маркера с таковой гена *ZFY*, расположенного на Y-хромосоме. В результате предполагаемый промотор гена *HLCS* оказался гиперметилирован в плаценте и гипометилирован в клетках крови матери. Сравнение числа копий гиперметилированного *HLCS* и локуса *ZFY* позволило разделить образцы с трисомией 21 и эуплоидную плацентарную ДНК. Проанализировали 24 образца плазмы женщин с эуплоидными беременностями и 5 образцов плазмы женщин, у плодов которых была диагностирована трисомия 21. Все, кроме одной эуплоидной пробы, были корректно классифицированы. Авторы считают, что эпигенетическая часть анализа универсальна и применима ко всем беременностям, в то время как генетическая часть должна использовать наследуемые по отцовской линии генетические маркеры плода, которые в избытке имеются в геноме.

Е.А. Papageorgiou с соавторами предложили стратегию использования иммунопреципитации метилированной ДНК в сочетании с количественной ПЦР в режиме реального времени (MeDiP — Methylated DNA immunoprecipitation) для исследования метилирования паттернов ДНК хромосом 13, 18, 21, X и Y [42]. В данной методике для захвата метилированных участков и, следовательно, обогащения плодоспецифической метилированной ДНК используются специфичные к 5-метилцитозину антитела. Такое обогащение ДНК служит ключевым моментом в данном методе. Затем проводилась количественная ПЦР. Исследователи предположили, что вполне возможно после проведенных процедур выявить трисомию 21 путем сравнения полученных значений для нормальных плодов и плодов с синдромом Дауна.

С применением вышеописанного подхода был проведен анализ 80 случаев (40 известных и 40 «слепых») [42]. Конкретное соотношение метилирования плодной ДНК и дальнейший статистический анализ показали, что комбинация 8 DMRs позволила правильно поставить диагноз во всех случаях. Результаты, полученные в данном исследовании, показали высокую диагностическую чувствительность (100%) и специфичность (100%). Использование эпигенетического анализа можно считать достаточно эффективным для генетической ННПД. Однако его внедрение в клиническую практику в настоящий момент еще обсуждается.

Подобное исследование для определения трисомии 21 было проведено группой Y.M.D. Lo и R.W.K. Chiu [34]. С помощью специфической ПЦР обнаруживали гиперметилированный *HLCS* и, соответственно, определяли ДНК плода. В работе было нормализовано количество гиперметилированного *HLCS* для конкретного генетического локуса плода, например количество ДНК Y-хромосомы при беременности плодом мужского пола или количество уникальных полиморфных аллелей. На основании отношения эпигенетических и генетических показателей было обнаружено повышение дозы хромосомы 21 в крови матери.

У современных подходов, разработанных с использованием внеклеточной ДНК плода, есть ряд ограничений. Основными из них являются использование чувствительных к метилированию ферментов рестрикции и использование бисульфита натрия. В первом случае необходимость наличия сайта рестрикции у дифференциально метилированных регионов ограничивает количество локусов для тестирования, а во втором — использование бисульфита натрия может приводить к деградации ДНК.

#### Рынок услуг по неинвазивной пренатальной диагностике

На данный момент коммерческая неинвазивная ДНК диагностика трисомии 21 с помощью MPS стала доступна для беременных женщин, входящих в группу риска. Мно-

гие клиники по всему миру уже предлагают женщинам услуги по проведению ННПД. Существует ряд наиболее широко используемых коммерческих тестов, например *MaterniT21™ PLUS test* от Sequenom (<http://www.laboratories.sequenom.com>), *PrenaTest* от LifeCodexx (<http://www.lifecodexx.com>), *Verify test* от Verinata (<http://www.verinata.com>) и *Harmony™ prenatal test* от Ariosa (<http://www.ariosadx.com>). На официальных сайтах этих компаний представлена информация о том, что точность тестов генетической ННПД приближается к 100% (99,8—99,9%), что не противоречит представленным в обзоре данным (таблица).

В настоящий момент в нашей стране также появились клиники, которые предлагают услуги ННПД. Стоит сказать, что в России предлагается так называемый ДОТ-тест (Диагностика Основных Трисомий) (<http://dot-test.ru>). Он дает информацию о пяти хромосомах (21, 18, 13, X, Y), изменение числа которых вызывает ряд известных синдромов. ДОТ-тест основан на секвенировании ДНК плода. Еще одно предложение на отечественном рынке — *Panorama-тест* (<http://panoramatest.ru>), основанный на использовании технологии NATUS, которая была описана в данном обзоре. Такой тест позволяет получить информацию о копийности 5 хромосом (21, 18, 13, X и Y), а также о некоторых микроделеционных синдромах. В различных клиниках цены на проведение ННПД анеуплоидий колеблются в зависимости от количества анализируемых хромосом и в среднем составляют 35—55 тыс. руб. Цены на диагностику резус-фактора варьируют от 5 до 15 тысяч рублей, а на неинвазивное определение пола плода составляют от 10 до 15 тыс. руб.

#### Неинвазивная преимплантационная диагностика

Помимо неинвазивного пренатального генетического тестирования в настоящее время изучается возможность неинвазивной преимплантационной генетической диагностики. Применение такого подхода позволило бы исключить вероятность повреждения эмбриона, а также

Таблица

#### Чувствительность и специфичность методов неинвазивной пренатальной генетической диагностики

| Диагностика     | Метод                                                                                            | Объем выборки | Чувствительность | Специфичность | Исследования |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------|---------------|--------------|
| Пол             | ПЦР                                                                                              | 43            | 100%             | 92%           | [5]          |
| Пол             | ПЦР                                                                                              | 201           | 100%             | 100%          | [46]         |
| Пол             | ПЦР                                                                                              | 100           | 100%             | 100%          | [6]          |
| Резус-фактор    | ПЦР                                                                                              | 72            | 100%             | 96,6%         | [45]         |
| Трисомия 21     | MeDiP                                                                                            | 80            | 100%             | 100%          | [42]         |
| Трисомия 21     | Масс-спектрометрия и цифровая ПЦР мРНК                                                           | 153           | 100%             | 89,7%         | [51]         |
| Трисомия 21, 18 | MPS                                                                                              | 190           | 100%             | 99,86%        | [14]         |
| Трисомия 21     | Метаанализ 37 исследований по секвенированию внеклеточной ДНК плода при одноплодной беременности | 22 659        | 99,2%            | 99,91%        | [21]         |
| Трисомия 18     |                                                                                                  | 21 695        | 96,3%            | 87,0%         |              |
| Трисомия 13     |                                                                                                  | 18 198        | 91,0%            | 87,0%         |              |
| Моносомия X     |                                                                                                  | 9256          | 90,3%            | 77%           |              |

решило бы проблему диагностики хромосомного мозаицизма. Уже существует ряд предпосылок для разработки неинвазивной преимплантационной генетической диагностики. Так, S. Palini с соавторами в 2013 г. обнаружили внеклеточную ДНК во внутриматочной жидкости бластоцисты. Количество ДНК оказалось достаточно для проведения полногеномной амплификации и ПЦР [41]. После этого открытия L. Gianaroli с соавторами провели пилотные исследования внутриматочной жидкости бластоцисты [20]. Они сопоставили результаты анализа внеклеточной ДНК с данными кариотипирования полярных телец, клеток трофобластической оболочки или целого эмбриона. Исследование проводилось при участии 17 пар, проходящих преимплантационный генетический скрининг с использованием агау-СГН. Результаты работы оказались впечатляющими. ДНК была обнаружена в 39 образцах внутриматочной жидкости бластоцисты (76,5%). В пересчете на одну хромосому процент соответствия результатов анализа внутриматочной жидкости бластоцисты и клеток эмбрионального происхождения составил 96,6% (904/936). Таким образом, можно заметить, что частота обнаружения ДНК во внутриматочной жидкости бластоцисты достаточно велика, к тому же степень соответствия кариотипов, получаемых на основании анализа внеклеточной ДНК, и кариотипов самих клеток эмбрионов в целом высока. Однако необходима еще методическая доработка полногеномной амплификации ДНК из внутриматочной жидкости бластоцист, что увеличит частоту ее обнаружения и, соответственно, вероятность анализа в дальнейшем. Помимо этого, необходимо проведение масштабных фундаментальных исследований в данной области. Так, например, в работе L. Gianaroli с соавторами не сопоставлялись кариотипы клеток трофобластической оболочки, внутренней клеточной массы и состава внеклеточной ДНК в полости бластоцисты, что важно для ответа на вопрос о происхождении фракции внеклеточной ДНК в полости бластоцисты и для повышения эффективности диагностики хромосомного мозаицизма.

В лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики нами также был проведен анализ двух бластоцист и внутриматочной жидкости из них [8]. Первая бластоциста по морфологии относилась к категории 3АА, а вторая — к категории 3СС. Для обоих парных образцов была проведена полногеномная амплификация ДНК. В результате были получены амплификаты ДНК обеих бластоцист и ДНК из жидкости только первой бластоцисты. Методом сравнительной геномной гибридизации (СГН) были установлены молекулярные кариотипы трех образцов. Кариотипы клеток первой бластоцисты и молекулярный состав фрагментов ДНК из ее полости совпали. В этих двух образцах была обнаружена моносомия хромосомы 19. Для бластоцисты качества 3СС результаты СГН показали наличие моносомий по хромосомам 16, 17, 19 и 20. Однако результаты сравнительной геномной гибридизации сами по себе не позволяют сделать однозначного заключения о том, присутствовали

ли эти моносомии в каждом из бластомеров бластоцисты или в бластоцисте находились клетки с различными комбинациями этих анеуплоидий. Очевидно, что для того чтобы оценить перспективы генетической НПД, необходимо проведение дальнейших исследований.

### Заключение

Несомненно, генетическая НПД имеет ряд преимуществ. Возможность провести диагностику неинвазивными методами привлекает женщин, которые опасаются инвазивного вмешательства. Также при подобном подходе исключается нанесение вреда здоровью матери и плода. Точность описанных в статье генетических тестов гораздо выше, чем у биохимического скрининга, так как на результат не оказывают влияния особенности течения беременности, принимаемые препараты и соматические заболевания женщины. Немаловажным преимуществом является тот факт, что проводить неинвазивный генетический тест можно на ранних сроках беременности, начиная уже с 10 недель. В настоящий момент уже разработан ряд тестов с высокой чувствительностью и специфичностью, позволяющих осуществлять неинвазивную диагностику пола, резус-фактора, анеуплоидий во многих клиниках по всему миру. На фоне большого числа исследований и публикаций по данной теме за последние годы в ближайшее время можно ожидать появления новых высокоточных диагностических методов и внедрения их в клиническую практику.

### Список литературы

1. Баранов В.С. Проблемы пренатальной диагностики наследственных болезней и возможные пути их коррекции // Биополимеры и клетка. — 1990. — Т. 6, № 1. — С. 46.
2. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Пренатальная диагностика в акушерстве: современное состояние, методы, перспективы. — СПб.: Изд-во Н-Л (ООО), 2003.
3. Горелов П., Балацкий А. Количественное определение ДНК в кровотоке матери на амплификаторе qtower 2.2. // Методология (аналитика). — 2013. — Т. 8, № 1. — С. 6—8.
4. Золотухина Т.В., Шилова Н.В. Использование бессортировочных методов сепарации клеток плода из крови беременных женщин в целях неинвазивной пренатальной диагностики хромосомных болезней. Информационное письмо № 17. — 2001. — НПЦ ЭМП, тираж 100 экз.
5. Малышева О.В., Баранов В.С. Неинвазивная пренатальная диагностика. Проблемы, подходы и перспективы // Журнал акушерства и женских болезней. — 2012. — Т. LXI, № 3. — С. 83—93.
6. Маркелова А.Н., Тюмина О.В., Тороповский А.Н. Новый подход к ведению беременных женщин с резус-отрицательной кровью с ранних сроков беременности // Medical sciences. — 2011. — № 11. — С. 330—332.
7. Михайлов А.В. Внутриматочные вмешательства под ультразвуковым контролем во время беременности // Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике. — М.: ВИДАР, 1996. — Т. 2. — С. 280—302.
8. Скрябин Н.А., Лебедев И.Н., Артюхова В.Г. и др. Молекулярное кариотипирование по внеклеточной ДНК из жидкости бластоцисты как основа неинвазивного преимплантационного генетического скрининга анеуплоидий // Генетика. — В печати.

9. Токарева А.Г., Лебедев И.Н., Назаренко С.А. Концентрация циркулирующей и связанной с клеточной поверхностью внеклеточной ДНК матери и плода в крови беременных женщин // Медицинская генетика. — 2007. — Т. 6, № 8. — С. 24–29.
10. Bianchi D.W., Platt L.D., Goldberg J.D. et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing // *Obstet. Gynecol.* — 2012. — Vol. 119, № 5. — P. 890–901.
11. Chan L.Y.S., Leung T.N., Allen Chan K.C. et al. Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy // *Clin. Chem.* — 2003. — Vol. 49. — P. 678–680.
12. Chim S.S., Jin S., Lee T.Y. et al. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21 // *Clin. Chem.* — 2008. — Vol. 54, № 3. — P. 500–511.
13. Chiu R.W.K., Lo Y.M.D. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age // *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* — 2011. — Vol. 16, № 2. — P. 88–93.
14. Dan S., Wang W., Ren J. et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11 105 pregnancies with mixed risk factors // *Prenat. Diagn.* — 2012. — Vol. 32, № 13. — P. 1225–1232.
15. Daniels G., Kirstin F., Martin P. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects // *Prenat. Diagn.* — 2009. — Vol. 9, № 2. — P. 101–107.
16. Deng Y.H., Yin A.H., He Q. et al. Non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 2011. — Vol. 49, № 4. — P. 641–646.
17. Devaney S.A., Palomaki G.E., Scott J.A. et al. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis // *JAMA.* — 2011. — Vol. 306, № 6. — P. 627–636.
18. Fan H.C., Blumenfeld Y.J., Chitkara U. et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2008. — Vol. 105, № 42. — P. 16266–16271.
19. Farina A., LeShane E. S., Romero R. et al. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 2005. — Vol. 193, № 2. — P. 421–425.
20. Gianaroli L., Magli M. C., Pomante A. et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study // *Fertil. Steril.* — 2014. — Vol. 102, № 6. — P. 1692–1699.
21. Gil M.M., Akolekar R., Quezada M.S. et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis // *Ultrasound. Obstet. Gynecol.* — 2015. — Vol. 45, № 3. — P. 249–266.
22. Go A.T., Visser A., Mulder M.A. et al. Detection of placental transcription factor mRNA in maternal plasma // *Clin. Chem.* — 2004. — Vol. 50, № 8. — P. 1413–1414.
23. Go A.T., Visser A., Mulder M.A. et al. 44 single-nucleotide polymorphisms expressed by placental RNA: assessment for use in noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21 // *Clin. Chem.* — 2007. — Vol. 53, № 12. — P. 2223–2224.
24. Go A.T., Visser A., Mulder M.A. et al. C21ORF105, A chromosome 21-encoded mRNA, is not a discriminative marker gene for prediction of Down syndrome in maternal plasma // *Prenat. Diagn.* — 2007. — Vol. 27, № 2. — P. 146–149.
25. Go A.T., van Vugt J.M.G., Oudejans C.B.M. Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: recent progress and future possibilities // *Hum. Reprod. Update.* — 2010. — Vol. 17, № 3. — P. 1–12.
26. Hall M. P., Hill M., Zimmermann B. et al. Non-invasive prenatal detection of trisomy 13 using a single nucleotide polymorphism-and informatics-based approach // *PloS one.* — 2014. — Vol. 9, № 5. — P. e96677.
27. Hill M., Finning K., Martin P. et al. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice // *Clin. Genet.* — 2011. — Vol. 80, № 1. — P. 68–75.
28. Kitzman J.O., Snyder M.W., Ventura M. et al. Non-invasive whole genome sequencing of a human fetus // *Sci. Transl. Med.* — 2012. — Vol. 4, № 137. — P. 137ra76.
29. Liao G.J., Chan K.C., Jiang P. et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targets massively parallel sequencing of maternal plasma DNA // *PLoS ONE.* — 2012. — Vol. 7, № 5. — P. e38154.
30. Lo Y.M.D., Corbetta N., Chamberlain P.F. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum // *The Lancet.* — 1997. — Vol. 350, № 9076. — P. 485–487.
31. Lo Y.M.D., Tein M.S., Lau T.K. et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis // *Am. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 62, № 4. — P. 768–775.
32. Lo Y.M.D., Lau T.K., Zhang J. et al. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21 // *Clin. Chem.* — 1999. — Vol. 45, № 10. — P. 1747–1751.
33. Lo Y.M.D., Chan K.C., Sun H. et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus // *Sci. Transl. Med.* — 2010. — Vol. 2, № 61. — P. 61ra91.
34. Lo Y.M.D., Chiu R.W.K. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* — 2012. — Vol. 13. — P. 285–306.
35. Lun F.M., Chiu R.W., Chan K.A. et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma // *Clin. Chem.* — 2008. — Vol. 54, № 10. — P. 1664–1672.
36. Mujezinovic F., Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review // *Obstet. Gynecol.* — 2007. — Vol. 110, № 3. — P. 687–694.
37. Ng E.K.O., Tsui N.B.Y., Lau T.K. et al. From the Cover Medical Sciences mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100, № 8. — P. 4748–4753.
38. Nicolaides K.H., Syngelaki A., Ashoor G. et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 2012. — Vol. 207, № 5. — P. 374:e1–e6.
39. Nicolaides K.H., Syngelaki A., Gil M., Atanasova V., Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y // *Prenat. Diagn.* — 2013. — № 33. — P. 575–579.
40. Oudejans C.B.M., Go A.T., Visser A. et al. Detection of chromosome 21-encoded mRNA of placental origin in maternal plasma // *Clin. Chem.* — 2003. — Vol. 49, № 9. — P. 1445–1449.
41. Palini S., Galluzzi L., De Stefani S. et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid // *Reprod. Biomed. Online.* — 2013. — Vol. 26, № 6. — P. 603–610.
42. Papageorgiou E.A., Karagrigoriou A., Tsaliki E. et al. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21 // *Nature.* — 2011. — Vol. 17, № 4. — P. 510–514.
43. Poon L.L., Leung T.N., Lau T.K. et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma // *Clin. Chem.* — 2000. — Vol. 46, № 11. — P. 1832–1834.
44. Poon L.L., Leung T.N., Lau T.K. et al. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma // *Clinical chemistry.* — 2002. — Vol. 48, № 1. — P. 35–41.

45. Rijnders R.J., Christiaens G.C., Bossers B. et al. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma // *Obst. Gynecol.* — 2004. — Vol. 103, № 1. — P. 157–164.
46. Scheffer P.G., van der Schoot C.E., Page-Christiaens G.C. et al. Reliability of Fetal Sex Determination Using Maternal Plasma // *Obstet. Gynecol.* — 2010. — Vol. 115, № 1. — P. 117–126.
47. Sekizawa A., Jimbo M., Saito H. et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta // *Clin. Chem.* — 2002. — Vol. 48, № 2. — P. 353–354.
48. Sparks A.B., Struble C.A., Wang E.T. et al. Non-invasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18 // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 2012. — Vol. 206, № 4. — P. 319. e1–9.
49. Tong Y.K., Jin S., Chiu R.W. et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach // *Clin. Chem.* — 2010. — Vol. 56, № 1. — P. 90–98.
50. Tsui N.B., Chim S.S., Chiu R.W. et al. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling // *J. Med. Genet.* — 2004. — Vol. 41, № 6. — P. 461–467.
51. Tsui N.B., Akolekar R., Chiu R.W. et al. Synergy of total PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single-nucleotide polymorphism allelic ratio for the noninvasive prenatal detection of trisomy 21 // *Clin. Chem.* — 2010. — Vol. 56, № 1. — P. 73–81.
52. Vlasov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. Extracellular nucleic acids // *Bioessays.* — 2007. — Vol. 29, № 7. — P. 654–667.
53. Wataganara T., LeShane E.S., Farina A. et al. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18 // *Hum. Genet.* — 2003. — Vol. 112, № 2. — P. 204–208.
54. Wright C.F., Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis // *Hum. Reprod. Update.* — 2009. — Vol. 15, № 1. — P. 139–151.
55. Zhong X.Y., Holzgreve W., Hahn S. Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma // *Swiss Med. Wkly.* — 2001. — Vol. 131, № 5–6. — P. 70–74.
56. Zhong X.Y., Holzgreve W., Hahn S. The levels of circulatory fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of pre-eclampsia // *Hypertension in Pregnancy.* — 2002. — Vol. 21, № 1. — P. 77–83.
57. Zimmermann B., Hill M., Gemelos G. et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y using targeted sequencing of polymorphic loci // *Prenat. Diag.* — 2012. — Vol. 32, № 13. — P. 1233–1241.
58. Zolotukhina T.V., Shilova N.V., Voskoboeva E.Y. Analysis of cell-free fetal DNA in plasma and serum of pregnant women // *J. Histochem. Cytochem.* — 2005. — Vol. 53, № 3. — P. 297–299.

## Noninvasive DNA diagnostics in reproductive medicine

Zhigalina D.I.<sup>1</sup>, Skryabin N.A.<sup>1,2</sup>, Lebedev I.N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> — National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050; e-mail: darya.zhigalina@medgenetics.ru

<sup>2</sup> — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, 634050

Currently, diagnostic procedures that do not require invasive intervention, are very popular. As a part of modern prenatal diagnosis these methods allow to eliminate the risk for the mother's and fetus health. The current molecular genetic methods in the field of non-invasive prenatal diagnosis are discussed in the review. Special attention is paid to the possibility of using the developed methods in clinical practice now and in the near future.

**Keywords:** cell-free DNA, non-invasive prenatal genetic diagnosis, non-invasive preimplantation genetic diagnosis, fetal sex determination, rhesus D, aneuploidy

*This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant № 15-04-08265, The Tomsk State University Academic D.I. Mendeleev Fund Program in 2015 and grant of the President of the Russian Federation for the State Support of Leading Scientific Schools of the Russian Federation № 14.120.14.5096.*