

Неинвазивная пренатальная детекция трисомий: обзор методов и сравнение подходов

Суркова Е.И.¹, Никитин А.Г.², Тороповский А.Н.¹

1 — «ТестГен»;

432072, Ульяновск, 44-й проезд Инженерный, д. 9;

2 — Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи

и медицинских технологий Федерального Медико-биологического агентства России;

115682, Москва, Ореховый бульвар, д. 28

Неинвазивное пренатальное тестирование (НИПТ, Non-Invasive Prenatal Testing, NIPT) с целью выявления трисомий в последнее время получило широкое распространение в клинической практике во многих странах, включая Россию. Несмотря на то, что НИПТ не позволяет оценить количество и структуру всех хромосом плода (это возможно только путём кариотипирования), этот анализ обладает хорошими показателями чувствительности и специфичности, а также позволяет устранить риски, сопровождающие инвазивные диагностические процедуры (амниоцентез, кордоцентез, биопсия ворсин хориона и т.д.). Для НИПТ преимущественно используют последовательности внеклеточной фетальной ДНК (cell-free fetal DNA, cffDNA), которые в небольшой концентрации присутствуют в крови беременной женщины и исчезают после беременности. В настоящее время для НИПТ используют методы высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS). В обзоре приведены основные подходы и методы, применяемые для НИПТ с целью обнаружения трисомий: массовое параллельное секвенирование методом дробовика (massive parallel shotgun sequencing, MPSS), таргетное массовое параллельное секвенирование (targeted massive parallel sequencing, t-MPS) и подходы, основанные на изучении однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP), а также произведено сравнение эффективности их использования для выявления трисомий по хромосомам 13, 18 и 21 (синдромов Патау, Эдвардса и Дауна, соответственно). При использовании MPSS анализу подвергаются последовательности всего генома, а при t-MPS — только специфические последовательности. В статье обсуждаются также методы анализа мРНК, эпигенетических маркёров плода и дополнительные методы усиления сигнала (например, DANSR, Digital Analysis of Selected Regions, цифровой анализ выбранных областей). В обзоре приведены основные причины появления ложных (ложноположительных и ложноотрицательных) результатов при НИПТ (мозаицизм, феномен «резорбция двойни», низкий уровень cffDNA и др.). Дано краткое описание современного места НИПТ в клинической практике и перспектив включения НИПТ в схему пренатального скрининга, а также основных трудностей, ограничивающих более широкое применение технологии НИПТ в клинике. Прежде всего эти трудности связаны со спецификой cffDNA (концентрация, индивидуальные отличия и др.), а также с этическими аспектами (генетический детерминизм, информированное согласие пациентов и др.).

Ключевые слова: трисомии, неинвазивное пренатальное тестирование, НИПТ, внеклеточная фетальная ДНК

Для цитирования: Суркова Е.И., Никитин А.Г., Тороповский А.Н. Неинвазивная пренатальная детекция трисомий: обзор методов и сравнение подходов. *Медицинская генетика* 2019; 18(3): 39-46.

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.03.39-46

Автор для корреспонденции: Суркова Екатерина Ивановна; **e-mail:** katerina-u48@mail.ru

Источник финансирования: отсутствует

Конфликт интересов: Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Дата представления рукописи: 04.03.2019

Noninvasive prenatal detection of trisomy: a review of methods and comparison of approaches

Surkova E.I.¹, Nikitin A.G.², Toropovsky A.N.¹

1 — «TestGene»

Ulyanovsk, Russia

2 — Federal Scientific-clinical Center of specialized types of medical care and medical technologies of FMBA of Russia

Moscow, Russia

Non-invasive prenatal testing (NIPT) of trisomy has recently become widespread in clinical practice in many countries, including Russia. Despite the fact that NIPT does not allow to estimate the number and structure of all chromosomes of the fetus (this is possible only when using karyotyping), this analysis has good sensitivity and specificity indicators, and also allows eliminating the risks accompanying invasive diagnostic procedures (amniocentesis, cordocentesis, chorionic villus biopsy, etc.). The sequences of cell-free fetal DNA (cffDNA), which are present in low concentrations in the blood of a pregnant woman and disappear after pregnancy,

are mainly used for NIPT. Currently NIPT uses Next Generation Sequencing methods (NGS). The review presents main approaches and methods used for non-invasive prenatal testing of trisomy: massive parallel sequencing by the shotgun method (MPSS), targeted parallel sequencing (t-MPS) and approaches based on the study of single nucleotide polymorphisms (SNP). In review we also compare efficacy of their use for the detection of trisomy of chromosomes 13, 18 and 21 (Patau syndrome, Edwards syndrome and Down syndrome, respectively). When using MPSS, sequences of the whole genome are analyzed, and with t-MPS, only specific sequences of interest are analyzed. The article also discusses methods for analyzing mRNA, fetal epigenetic markers, and additional signal amplification methods (for example, DANSR, Digital Analysis of Selected Regions). The review presents the main reasons for the appearance of false (false positive and false negative) results in NIPT (mosaicism, the phenomenon of "twin resorption", low levels of fetal DNA, etc.). A brief description of the current place of NIPT in clinical practice and prospects for the inclusion of NIPT in the prenatal screening scheme, as well as the main difficulties that limit the wider use of NIPT technology in the clinic, are given. Primarily, these difficulties are associated with the specificity of cell-free fetal DNA (concentration, individual differences, etc.), as well as ethical issues (genetic determinism, informed patient consent, etc.).

Key words: trisomy, non-invasive prenatal testing, NIPT, extracellular fetal DNA

For citation: Surkova E.I., Nikitin A.G., Toropovsky A.N. Noninvasive prenatal detection of trisomy: a review of methods and comparison of approaches. *Medical genetics* 2019; 18(3): 39-46 [In Rus]

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.03. 39-46

Corresponding author: Surkova Ekaterina; **e-mail:** katerina-u48@mail.ru

Funding. The research had no funding

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 04.03.2019

Трисомии — геномные мутации из группы анеуплоидий, при которых в одной из пар гомологичных хромосом присутствует дополнительная, третья, хромосома. Причинами трисомий являются ошибки расхождения хромосом при оогенезе, и вероятность их возникновения увеличивается с возрастом матери. До сих пор не удалось доказать существенное влияние возраста отца на вероятность возникновения трисомий [1]. Часть трисомий приводит к спонтанным выкидышам (например, трисомия по хромосоме 16), другие — к рождению детей со значительными нарушениями развития. Трисомия по хромосоме 21 приводит к рождению жизнеспособного ребёнка с синдромом Дауна. Значительными нарушениями развития и высоким процентом постнатальной смертности характеризуются две другие распространённые формы трисомий — по хромосомам 13 и 18, приводящие к развитию синдромов Патау и Эдвардса, соответственно.

В связи с тяжестью последствий наличия лишней хромосомы для организма, диагностике трисомий на раннем сроке беременности в настоящее время уделяется большое внимание. Особо остро стоит вопрос разработки эффективного метода неинвазивной пренатальной диагностики генетических аномалий. Прежде всего, такая необходимость связана с высоким риском потери плода при инвазивной диагностике (амниоцентез, кордоцентез, биопсия ворсин хориона и т.д.). По разным оценкам, такой риск может достигать 0,6—2% [2, 3]. Кроме того, есть ряд факторов, которые дополнительно влияют на развитие осложнений и на результаты инвазивной диагностики (возраст женщины, ос-

ложнённый акушерский анамнез, опыт врача, оснащение медицинского учреждения и т.д.).

В большинстве стран мира с целью выявления генетических аномалий у плода сейчас всем беременным женщинам проводят комбинированное скрининговое исследование, включающее ультразвуковое исследование плода и определение нескольких биохимических маркёров в материнской крови. Как правило, такой скрининг проводится один раз в сроке беременности 10—13,6 недель, и, помимо выявления преэклампсии, гибели плода, задержки роста плода и некоторых других нарушений внутриутробного развития, позволяет сформировать группу высокого риска по хромосомным аномалиям у плода. Доля ложноположительных результатов для комбинированного скрининга варьирует от 2 до 7% [4, 5]. Этот метод является косвенным, и при выявлении риска рождения ребёнка с трисомией женщине рекомендуют пройти инвазивное исследование, предполагающее биопсию тканей плода или его оболочек и последующее кариотипирование полученных клеток. Кариотипирование способно подтвердить или опровергнуть это предположение, так как при этом методе есть возможность изучить количество и структуру всех хромосом плода.

НИПТ для выявления трисомий

В настоящее время большие надежды возлагают на метод неинвазивного пренатального тестирования (НИПТ, Non-Invasive Prenatal Testing, NIPT) трисомий — генетический тест, который позволяет неинвазивным методом проанализировать количество отдельных хро-

мосом плода и выявить аномалии. Несмотря на то, что НИПТ не позволяет оценить количество и структуру всех хромосом плода, широкое применение этого метода позволит снизить количество инвазивных процедур, выкидышей и ошибочных прерываний беременности. Есть три возможности включения НИПТ в существующую схему пренатального скрининга: в качестве замены определения биохимических маркёров в сыворотке крови при комбинированном скрининге; как промежуточный этап между комбинированным скринингом и инвазивным исследованием или в качестве замены инвазивного исследования. В ближайшее время наиболее вероятными представляются первые два варианта.

НИПТ для выявления трисомий широко применяется в клинической практике с 2011 г. [6]. Впервые метод появился в Гонконге, в этом же году начал предлагаться коммерческими компаниями в США. Сначала НИПТ использовался лишь для выявления трисомии по хромосоме 21, но постепенно его возможности расширились и в настоящее время такое исследование позволяет обнаружить трисомии по хромосомам 13, 16, 18, 22 и аномалии по половым хромосомам (например, синдром Клайнфельтера – 47,XXY) [7]. В настоящее время НИПТ применяют в более чем 60 странах. Большинство специалистов рекомендуют использовать НИПТ в качестве скринингового, а не диагностического метода, однако высокие показатели чувствительности (частоты истинно положительных результатов) и специфичности (частоты истинно отрицательных результатов) детекции трисомии у плода при таком подходе позволяют рассматривать его как альтернативу инвазивной диагностике. Кроме того, этот метод может быть показан женщинам, которые по тем или иным соображениям отказываются от инвазивного вмешательства. В настоящее время в большинстве стран НИПТ используют для скрининга женщин из группы риска по развитию аномалий плода. К таким факторам риска согласно рекомендациям Американского общества акушеров-гинекологов (ACOG) относят: возраст женщины 35 лет и более; указывающие на повышенный риск анеуплоидии данные УЗИ; наличие предшествующей беременности с трисомией; наличие робертсоновской транслокации (повышает риск появления трисомии по хромосомам 13 или 21 у плода); выявленный при комбинированном скрининге повышенный риск анеуплоидии. Большинство клинических исследований чувствительности и специфичности НИПТ, а также других показателей метода выполнены при анализе образцов ДНК беременных женщин из таких групп риска. Лишь недавно НИПТ стали более широко применять для скрининга женщин из группы низкого риска, и в ближайшие несколько лет ожидается

появление результатов для этой группы беременных, прежде всего показателей чувствительности и специфичности метода. Хотя уже сейчас можно ожидать, что эти результаты окажутся сопоставимыми с уже имеющимися показателями, т.к. способность НИПТ выявлять трисомии зависит от точности анализа и доли фетальной ДНК в образце, а не от распространённости заболевания в популяции.

Характеристики внеклеточной фетальной ДНК

Для НИПТ преимущественно используют последовательности внеклеточной фетальной ДНК (cell-free fetal DNA, cffDNA), которые присутствуют в крови матери. Приблизительно 4–10% всей ДНК в крови матери представлено ДНК плода. Однако в абсолютных значениях эта цифра достаточно мала (меньше 1 мкг на 20 мл крови), что вносит дополнительные трудности в тестирование [8]. cffDNA может быть детектирована в крови матери уже на 5–7-й неделе беременности [9], однако более надёжный результат получается при проведении исследования после 10-й недели, так как количество cffDNA нарастает с течением времени [10]. Так, количество cffDNA увеличивается с 16 геномов плода на мл материнской крови в первом триместре до 80 геномов плода на мл в третьем триместре с резким пиком в последние 8 недель беременности [11]. Однако НИПТ чаще всего проводят на 10-й неделе беременности для раннего выявления возможной анеуплоидии у плода.

Было показано, что концентрация cffDNA и степень её нарастания во время беременности имеют индивидуальные различия [12, 13]. Кроме того, фетальная фракция ДНК сильно зависит от индекса массы тела матери, этнической принадлежности, количества плодов (одно- или многоплодная беременность) [14, 15]. В целом же cffDNA является достаточно стабильной (по крайней мере, в течение 24 часов), что позволяет использовать её для анализа. Кроме того, cffDNA после беременности исчезает из крови матери, поэтому анализ cffDNA можно проводить даже у тех женщин, у которых беременность не является первой (в отличие от фетальных клеток крови, циркулирующих в крови матери и после беременности [16]). Наиболее часто cffDNA выделяют из плазмы крови матери. Это связано с тем, что в сыворотке выше содержание материнской ДНК вследствие выхода в неё ДНК из клеток, разрушающихся в процессе коагуляции. В настоящее время существует много коммерческих наборов, с помощью которых можно эффективно выделить внеклеточную ДНК. Фракция внеклеточной ДНК плазмы крови низкомолекулярная, 40% имеет длину не более 300 п.н., а размер 90% молекул не превышает 1500 п.н. Для получения более обогащённой фракции cffDNA

часто применяют различные методы. Наличие последовательностей Y-хромосомы (в случае мужского пола плода) или возможность сравнения генотипов родителей (обнаружение отцовских аллелей) облегчает процесс анализа. В других случаях можно использовать тот факт, что размер cfDNA плода меньше размера материнской cfDNA: в среднем размер cfDNA не превышает 250 п.н. [17]. Это связано с тем, что механизмы, ответственные за высвобождение материнской и фетальной внеклеточной ДНК в кровотоке беременной женщины, различны. Наиболее широко используемым методом обогащения фетальной фракции cfDNA является полимеразная цепная реакция (ПЦР) в различных вариациях, направленная на выявление определённых последовательностей матери и плода. В последнее время было предложено использовать для выявления фракции cfDNA технологию высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS) [18]. Возможно также проведение НИПТ методом NGS без предварительного разделения фракций материнской и фетальной внеклеточной ДНК, но в таком случае для детекции небольших отклонений в количестве ДНК различных хромосом плода необходимо большое покрытие (число прочтений каждого региона). Однако приблизительно 0,5–7% женщин не получают результата после проведения НИПТ, чаще всего в связи с недостаточной фракцией cfDNA. Низкий уровень cfDNA может также быть причиной ложноотрицательных результатов при НИПТ.

Основные методы и подходы в НИПТ

Существует несколько подходов количественного измерения cfDNA с определением повышения доли ДНК, относящейся к конкретной хромосоме плода. В настоящее время в НИПТ используют методы NGS, т.к. для получения статистически достоверных результатов с путём ПЦР (особенно при низкой фетальной фракции ДНК) требуется проведение большого количества циклов [19]. Основных современных подходов три: массовое параллельное секвенирование методом дробовика (massive parallel shotgun sequencing, MPSS), таргетное массовое параллельное секвенирование (targeted massive parallel sequencing, t-MPS) и подход, основанный на исследовании однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP). Первые два метода основаны на определении методом секвенирования принадлежности cfDNA к той или иной хромосоме на основании сравнения с референсным геномом, при наличии трисомии количество cfDNA этой хромосомы будет больше. Так, обычно 8,5% всех прочитанных последовательностей принад-

лежат хромосоме 1, в то время как к хромосоме 22 относятся только 1,2% всех фрагментов, а к хромосоме 21 – 1,35%. При трисомии у плода в общем содержании cfDNA будет содержаться большее количество генетического материала, соответствующее лишней хромосоме. При использовании MPSS анализу подвергаются последовательности всего генома, а при t-MPS только специфические последовательности интереса. Таким образом, при использовании t-MPS существенно снижено количество ридов (коротких нуклеотидных последовательностей, полученных в результате секвенирования) в связи с нацеленностью анализа только на клинически значимые хромосомы (21, 18, 13 и т.д.) или хромосомы интереса. Это, в свою очередь, приводит к снижению длительности и стоимости исследования, что делает его более доступным для широких слоёв населения. Также дополнительно в качестве шага усиления сигнала может применяться цифровой метод DANSR (Digital Analysis of Selected Regions, цифровой анализ выбранных областей), при этом выбранные непалиморфные локусы на хромосомах интереса анализируются количественно. DANSR за счёт селективного секвенирования позволяет увеличить производительность и снизить стоимость исследования. Метод, основанный на исследовании SNP, определяет число копий хромосом на основании поиска аллельных различий. Все три метода обладают схожими аналитическими показателями и могут быть использованы в клинической практике.

Ограничения широкого применения НИПТ

Основная трудность применения НИПТ в клинической практике связана с тем, что исследуемая фетальная ДНК выделяется в кровь матери преимущественно в результате апоптоза цитотрофобласта ворсинок хориона и может не соответствовать кариотипу плода. Это может быть объяснено особенностями формирования слоя цитотрофобласта во время эмбриогенеза: цитотрофобласт формируется из трофобласта бластоцисты, а плод – из внутренней клеточной массы (эмбриобласта). С этим может быть связана часть ложноположительных и ложноотрицательных результатов при использовании для диагностики трисомий cfDNA. В недавнем исследовании было показано, что в 3,7% (14/404) случаев образцы кратковременной культуры ворсин хориона имели нормальный или мозаичный (частота клонов клеток с анеуплоидией менее 30%) кариотип при наличии трисомии у плода. Таким образом, анеуплоидия также может быть не выявлена при НИПТ. В пересчёте на общее количество исследованных в этой работе образцов (около 6 000), риск ложноотрицательного результата при использовании НИПТ составляет 0,2% [20].

Согласно крупномасштабному исследованию, в среднем процент мозаицизма составляет 0,8% [21]. Показано, что выявление мозаицизма при трисомии хромосом 13 и 18 происходит в большем проценте случаев по сравнению с трисомией по хромосоме 21 [22]. Мозаицизм может быть плацентарный и истинный, фетальный. В первом случае клетки с аномальным кариотипом располагаются во внезародышевых тканях (чаще всего, в плаценте), во втором случае — в тканях плода. Так как при НИПТ исследуют ДНК внезародышевых тканей, то в случае наличия как плацентарного, так и фетального мозаицизма, может быть получен ложный результат [23]. Кроме мозаицизма, к ложному результату также могут приводить низкий уровень cfDNA в крови матери, хромосомные аномалии матери, злокачественные новообразования. Также феномен под названием “резорбция двойни” ответственен за ряд ложноположительных результатов. В 30% случаев при многоплодной беременности происходит потеря одного или более эмбрионов, которые оставляют в крови матери свою ДНК. Так как в большинстве случаев гибель эмбриона происходит из-за генетической аномалии, то циркулирующая в крови матери cfDNA исчезнувшего близнеца может приводить к ложноположительному результату при НИПТ. В силу перечисленных причин при выявлении высокого риска трисомии при НИПТ для подтверждения диагноза рекомендуют проводить консультацию с врачом-генетиком и инвазивное исследование.

Наилучшие показатели чувствительности и специфичности НИПТ наблюдаются для детекции трисомии по хромосомам 13, 18, 21 [7]. Это объясняется тем, что перечисленные трисомии являются наиболее частыми анеуплоидиями плода и обуславливают известные синдромы: Дауна (трисомия по хромосоме 21), Эдвардса (трисомия по хромосоме 18) и Патау (трисомия по хромосоме 13). Так, средняя прогностическая значимость НИПТ для этих трисомий составляет 83,5% [24]. Чувствительность и доля ложноположительных результатов НИПТ для выявления трисомий по хромосомам 21 и 18 составляют >99% и <0,2%, соответственно [25], тогда как чувствительность для трисомии по хромосоме 13 составляет 78,6—94,4%, а доля ложноположительных результатов выше 1% [26]. Таким образом, при трисомии по хромосоме 21 у плода наблюдается наиболее высокая степень выявляемости с помощью НИПТ, которая несколько ниже при трисомии по хромосоме 18 и наименьшая — при трисомии по хромосоме 13 [27]. Однако, в последнем исследовании 146 958 беременных женщин были показаны следующие показатели чувствительности и специфичности НИПТ: для трисомии по хромосоме 21 — 99,17% и 99,95%, соответственно; для трисомии по хромосоме 18 — 98,24% и 99,95%; для три-

сомии по хромосоме 13 — 100% и 99,96% [28]. Также в этом исследовании было выявлено отсутствие статистически значимых различий по чувствительности и специфичности между группами женщин с высоким и низким риском анеуплоидии у плода. В ряде таких исследований с улучшенными показателями неинвазивного тестирования для трисомий по хромосомам 13 и 18 такого эффекта удалось достичь количественной биоинформатической коррекцией смещения состава GC [29]. Дело в том, что в хромосомах 13 и 18 содержание GC меньше, чем в хромосоме 21, что влияет на результаты анализа, и коррекция позволяет минимизировать это влияние. Кроме того, в настоящее время разработано несколько алгоритмов обработки, позволяющих на стадии анализа данных увеличить показатели чувствительности и специфичности НИПТ [30].

Риск ложноположительных и ложноотрицательных результатов при НИПТ по данным разных исследований составляет 0,02—0,13 и 0,02—0,26%, соответственно [20, 31]. Ложноположительные результаты могут привести к прерыванию развития здорового эмбриона, а ложноотрицательные — к рождению ребёнка с хромосомной аномалией. При ложноотрицательных результатах НИПТ маркеры хромосомной аномалии могут быть обнаружены у плода на более позднем сроке беременности при ультразвуковом исследовании или беременность может закончиться внутриутробной гибелью плода. Риск ложных результатов при НИПТ приводит к снижению общей эффективности метода и требует проведения инвазивного тестирования для подтверждения результата. Однако улучшение методики НИПТ может привести к существенному снижению показателей ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Существует лишь небольшое количество исследований, в которых анализировали показатели надёжности НИПТ в случае многоплодных беременностей [32, 33]. Это связано, прежде всего, с небольшим количеством лабораторий в мире, проводящих такой анализ. В случае однойяйцевых близнецов трудности неинвазивного тестирования не отличаются от таковых при одноплодной беременности. Для разнояйцевых же близнецов и беременностей с более чем двумя плодами проведение НИПТ является достаточно сложной задачей. Связано это как с маленькой фракцией cfDNA каждого плода, так и с техническими ограничениями анализа [34, 35].

Менее распространённым вариантом является использование для НИПТ мРНК плода, циркулирующей в крови матери [36, 37]. Достаточно длительное время уже разрабатывается несколько тест-систем для неинвазивного выявления трисомий с использованием мРНК. Основным подходом в таких системах является анализ SNP-

маркёров фетальной РНК, но ни одна из методик пока не применяется в клинической практике [38]. Также для НИПТ с целью выявления трисомий могут быть использованы эпигенетические методы, основанные на определении степени метилирования в сочетании с генетическими маркёрами ДНК плода (например, гена *ZFY* на Y-хромосоме) [39, 40]. Однако, эта методика также пока не получила клинического применения.

Различные компании в настоящее время выпускают коммерческие наборы для НИПТ, при этом существуют тесты и платформы с использованием каждого из трёх описанных выше методов анализа (MPSS, t-MPS, SNP). Технологии секвенирования, используемые для НИПТ, также могут быть разными: пиросеквенирование (454 Life Sciences, Roche), секвенирование синтезом (Illumina Genome Analyzer, Illumina), секвенирование лигированием (SOliD, Life Technologies Thermo Fisher Scientific). Теоретически, высокопроизводительное секвенирование может выявлять трисомии любых хромосом, однако коммерческие тест-наборы чаще всего выпускаются для выявления наиболее распространённых анеуплоидий по хромосомам 13, 16, 18, 21, 22, а также X и Y хромосомам. В последнее время стали появляться наборы для выявления путём НИПТ аномалий в отдельных регионах хромосом, что значительно расширяет возможности метода (например, 1p, 5p, 15q, 22q, 11q, 8q, 4p).

Заключение

НИПТ в настоящее время всё шире начинает применяться в клинической практике, особенно для тестирования женщин, относящихся к группе риска по генетическим аномалиям. Дальнейшее развитие этой технологии приведёт не только к её повсеместному включению в клиническую практику, но и к расширению её диагностических возможностей, в частности, к расширению спектра генетических аномалий плода, которые можно выявлять неинвазивным методом (например, мутации отдельных генов или небольших регионов). Основным ограничивающим фактором для более широкого применения этой технологии на сегодняшний день является высокая стоимость исследования, обусловленная применением современных дорогостоящих оборудования и реагентов, а также ряд этических проблем (генетический детерминизм, информированное согласие пациентов и др.). Но с развитием технологий выделения и анализа cfDNA предполагается, что стоимость исследования будет значительно снижена и НИПТ может стать рутинным скрининговым, а в дальнейшем и диагностическим тестом для всех беременных женщин. Кроме того, предполагается, что усовершенствование метода значительно

но снизит количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов при НИПТ. Но уже сейчас этот метод может оказаться полезным для принятия решения о применении инвазивной диагностики в группах беременных высоким или промежуточным риском анеуплоидий у плода, сформированных по результатам комбинированного скрининга.

Список литературы

1. Fisch H., Hyun G., Golden R., Hensle T.W., Olsson C.A., Liberson G.L. The influence of paternal age on down syndrome. *J Urol* 2003; 169(6): 2275–2278.
2. Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Вахарловский В.Г. Пренатальная диагностика в акушерстве: современное состояние, методы, перспективы: методическое пособие. СПб.: Н-Л, 2002. 64с.
3. Mujezinovic F., Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2007; 110(3): 687–694.
4. Shamshiraz A.A., Benn P., Egan J.F. The role of second-trimester serum screening in the post-first-trimester screening era. *Clin Lab Med* 2010; 30(3): 667–676. doi: 10.1016/j.clm.2010.04.013.
5. Russo M.L., Blakemore K.J. A historical and practical review of first trimester aneuploidy screening. *Semin Fetal Neonatal Med* 2014; 19(3): 183–187. doi: 10.1016/j.siny.2013.11.013.
6. Lau T.K., Chan M.K., Lo P.S., Chan H.Y., Chan W.S., Koo T.Y. et al. Clinical utility of noninvasive fetal trisomy (NIFTY) test – early experience. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(10): 1856–1859. doi: 10.3109/14767058.2012.678442.
7. Pergament E., Cuckle H., Zimmermann B., Banjevic M., Sigurjonsson S., Ryan A. et al. Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort. *Obstet Gynecol* 2014; 124(2 Pt 1): 210–218. doi: 10.1097/AOG.0000000000000363.
8. Ariga H., Ohto H., Busch M.P., Imamura S., Watson R., Reed W. et al. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 2001; 41: 1524–1530.
9. 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; 15(1): 139–151. doi: 10.1093/humupd/dmn047.
10. Chiu R.W., Lo Y.M. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011; 16(2): 88–93. doi: 10.1016/j.siny.2010.10.003.
11. Dey M., Sharma S., Aggarwal S. Prenatal screening methods for aneuploidies. *N Am J Med Sci* 2013; 5(3): 182–190. doi: 10.4103/1947-2714.109180.
12. Fan H.C., Blumenfeld Y.J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S.R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105 (42): 16266–16271. doi: 10.1073/pnas.0808319105.
13. Palomaki G.E., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M., Haddow J.E., Neveux L.M., Ehrlich M. et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 2011; 13(11): 913–920. doi: 10.1097/GIM.0b013e3182368a0e.
14. Bianchi D., Parker R.L., Wentworth J., Madankumar R., Saffer C., Das A.F. et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *NEJM* 2014; 370(9): 799–808. doi: 10.1056/NEJMoa1311037.
15. Ashoor G., Syngelaki A., Wang E., Struble C., Oliphant A., Song K. et al. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41(1): 21–25. doi: 10.1002/uog.12299.

16. Bianchi D.W., Zickwolf G.K., Weil G.J., Sylvester S., DeMaria M.A. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(2): 705-708.
17. Chan K.C., Zhang J., Hui A.B., Wong N., Lau T.K., Leung T.N. et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; 50(1): 88-92.
18. Kang X., Xia J., Wang Y., Xu H., Jiang H., Xie W. et al. An advanced model to precisely estimate the cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma. *PLoS One* 2016; 11(9): e0161928. doi: 10.1371/journal.pone.0161928.
19. Voelkerding K.V., Lyon E. Digital fetal aneuploidy diagnosis by next-generation sequencing. *Clin Chem* 2010; 56(3): 336-338. doi: 10.1373/clinchem.2009.141267.
20. Van Opstal D., Srebniak M.I., Polak J., de Vries F., Govaerts L.C., Joosten M. et al. False negative NIPT results: risk figures for chromosomes 13, 18 and 21 based on chorionic villi results in 5967 cases and literature review. *PLoS One* 2016; 11(1): e0146794. doi: 10.1371/journal.pone.0146794.
21. Ledbetter D.H., Zachary J.M., Simpson J.L., Golbus M.S., Pergament E., Jackson L. et al. Cytogenetic results from the U.S. Collaborative Study on CVS. *Prenat Diagn* 1992; 12(5): 317-345.
22. Hahnemann J.M., Vejerslev L.O. European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC)—fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. *Am J Med Genet* 1997; 70(2): 179-187.
23. Yang J., Qi Y., Guo F., Hou Y., Peng H., Wang D. et al. A case of placental trisomy 18 mosaicism causing a false negative NIPT result. *Mol Cytogenet* 2017; 10: 40. doi: 10.1186/s13039-017-0341-5.
24. Taneja P.A., Snyder H.L., de Feo E., Kruglyak K.M., Halks-Miller M., Curnow K.J. et al. Noninvasive prenatal testing in the general obstetric population: clinical performance and counseling considerations in over 85000 cases. *Prenat Diagn* 2016; 36(3): 237-243. doi: 10.1002/pd.4766.
25. Benn P., Cuckle H., Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 42(1): 15-33. doi: 10.1002/uog.12513.
26. Ashoor G., Syngelaki A., Wagner M., Birdir C., Nicolaides K.H. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206(4): 322. e1-e5. doi: 10.1016/j.ajog.2012.01.029.
27. Palomaki G.E., Deciu C., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M., Haddow J.E., Neveux L.M. et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* 2012; 14: 296-305. doi: 10.1038/gim.2011.73.
28. Zhang H., Gao Y., Jiang F., Fu M., Yuan Y., Guo Y. et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146,958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 45(5): 530-538. doi: 10.1002/uog.14792.
29. Chen E.Z., Chiu R.W., Sun H., Akolekar R., Chan K.C., Leung T.Y. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One* 2011; 6(7): e21791. doi: 10.1371/journal.pone.0021791.
30. Johansson L.F., de Boer E.N., de Weerd H.A., van Dijk F., Elferink M.G., Schuring-Blom G.H. et al. Novel Algorithms for Improved Sensitivity in Non-Invasive Prenatal Testing. *Sci Rep* 2017; 7(1): 1838. doi: 10.1038/s41598-017-02031-5.
31. Yu B., Lu B.Y., Zhang B., Zhang X.Q., Chen Y.P., Zhou Q. et al. Overall evaluation of the clinical value of prenatal screening for fetal-free DNA in maternal blood. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(27): e7114. doi: 10.1097/MD.00000000000007114.
32. Canick J.A., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M., Haddow J.E., Ehrlich M., van den Boom D. et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn* 2012; 32(8): 730-734. doi: 10.1002/pd.3892.
33. Huang X., Zheng J., Chen M., Zhao Y., Zhang C., Liu L. et al. Non-invasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2014; 34(4): 335-340. doi: 10.1002/pd.4303.
34. Srinivasan A., Bianchi D., Liao W., Sehnert A., Rava R. Maternal plasma DNA sequencing: Effects of multiple gestation on aneuploidy detection and the relative cell-free fetal DNA (cffDNA) per fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2013; 208(1), S31. doi: https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.10.226.
35. Struble C.A., Syngelaki A., Oliphant A., Song K., Nicolaides K.H. Fetal fraction estimate in twin pregnancies using directed cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther* 2013; 35(3): 199-203. doi: 10.1159/000355653.
36. Lo Y.M., Tsui N.B., Chiu R.W., Lau T.K., Leung T.N., Heung M.M. et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat. Med* 2007; 13: 218-223.
37. Tsui N.B., Akolekar R., Chiu R.W., Chow K.C., Leung T.Y., Lau T.K. 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; 56(1): 73-81. doi: 10.1373/clinchem.2009.132662.
38. Tsui N.B.Y., Wong B.C.K., Leung T.Y., Lau T.K., Chiu R.W., Lo Y.M. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. *Prenat Diagn* 2009; 29(11): 1031-1037. doi: 10.1002/pd.2340.
39. Tong Y.K., Ding C., Chiu R.W., Gerovassili A., Chim S.S., Leung T.Y. et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. *Clin Chem* 2006; 52(12): 2194-2202.
40. Papageorgiou E.A., Fiegler H., Rakan V., Beck S., Hulten M., Lamnissou K. et al. Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Pathol* 2009; 174(5): 1609-1618. doi: 10.2353/ajpath.2009.081038.

References

1. Fisch H., Hyun G., Golden R., Hensle T.W., Olsson C.A., Liberson G.L. The influence of paternal age on down syndrome. *J Urol* 2003; 169(6): 2275-2278.
2. Baranov V.S., Kuznetsova T.V., Vakharlovskiy V.G. Prenatal'naya diagnostika v akusherstve: sovremennoe sostoyanie, metody, perspektivy: metodicheskoe posobie [Prenatal diagnosis in obstetrics: current state, methods, perspectives: a methodological guide]. SPb.: N-L, 2002. 64s. (In Russ.)
3. Mujezinovic F., Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2007; 110(3): 687-694.
4. Shamshirsaz A.A., Benn P., Egan J.F. The role of second-trimester serum screening in the post-first-trimester screening era. *Clin Lab Med* 2010; 30(3): 667-676. doi: 10.1016/j.cl.2010.04.013.
5. Russo M.L., Blakemore K.J. A historical and practical review of first trimester aneuploidy screening. *Semin Fetal Neonatal Med* 2014; 19(3): 183-187. doi: 10.1016/j.siny.2013.11.013.
6. Lau T.K., Chan M.K., Lo P.S., Chan H.Y., Chan W.S., Koo T.Y. et al. Clinical utility of noninvasive fetal trisomy (NIFTY) test – early experience. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(10): 1856-1859. doi: 10.3109/14767058.2012.678442.
7. Pergament E., Cuckle H., Zimmermann B., Banjevic M., Sigurjónsson S., Ryan A. et al. Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort. *Obstet Gynecol* 2014; 124(2 Pt 1): 210-218. doi: 10.1097/AOG.0000000000000363.
8. Ariga H., Ohto H., Busch M.P., Imamura S., Watson R., Reed W. et al. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 2001; 41: 1524-1530.

9. 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; 15(1): 139–151. doi: 10.1093/humupd/dmn047.
10. Chiu R.W., Lo Y.M. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011; 16(2): 88–93. doi: 10.1016/j.siny.2010.10.003.
11. Dey M., Sharma S., Aggarwal S. Prenatal screening methods for aneuploidies. *N Am J Med Sci* 2013; 5(3): 182–190. doi: 10.4103/1947-2714.109180.
12. Fan H.C., Blumenfeld Y.J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S.R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105 (42): 16266–16271. doi: 10.1073/pnas.0808319105.
13. Palomaki G.E., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M., Haddow J.E., Neveux L.M., Ehrich M. et. al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med*. 2011; 13(11): 913–920. doi: 10.1097/GIM.0b013e3182368a0e.
14. Bianchi D., Parker R.L., Wentworth J., Madankumar R., Saffer C., Das A.F. et. al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *NEJM* 2014; 370(9): 799–808. doi: 10.1056/NEJMoa1311037.
15. Ashoor G., Syngelaki A., Wang E., Struble C., Oliphant A., Song K. et. al. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41(1): 21–25. doi: 10.1002/uog.12299.
16. Bianchi D.W., Zickwolf G.K., Weil G.J., Sylvester S., DeMaria M.A. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(2): 705–708.
17. Chan K.C., Zhang J., Hui A.B., Wong N., Lau T.K., Leung T.N. et. al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; 50(1): 88–92.
18. Kang X., Xia J., Wang Y., Xu H., Jiang H., Xie W. et. al. An advanced model to precisely estimate the cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma. *PLoS One* 2016; 11(9): e0161928. doi: 10.1371/journal.pone.0161928.
19. Voelkerding K.V., Lyon E. Digital fetal aneuploidy diagnosis by next-generation sequencing. *Clin Chem* 2010; 56(3): 336–338. doi: 10.1373/clinchem.2009.141267.
20. Van Opstal D., Srebniak M.I., Polak J., de Vries F., Govaerts L.C., Joosten M. et. al. False negative NIPT results: risk figures for chromosomes 13, 18 and 21 based on chorionic villi results in 5967 cases and literature review. *PLoS One* 2016; 11(1): e0146794. doi: 10.1371/journal.pone.0146794.
21. Ledbetter D.H., Zachary J.M., Simpson J.L., Golbus M.S., Pergament E., Jackson L. et. al. Cytogenetic results from the U.S. Collaborative Study on CVS. *Prenat Diagn* 1992; 12(5): 317–345.
22. Hahnemann J.M., Vejerslev L.O. European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC)—fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. *Am J Med Genet* 1997; 70(2): 179–187.
23. Yang J., Qi Y., Guo F., Hou Y., Peng H., Wang D. et. al. A case of placental trisomy 18 mosaicism causing a false negative NIPT result. *Mol Cytogenet* 2017; 10: 40. doi: 10.1186/s13039-017-0341-5.
24. Taneja P.A., Snyder H.L., de Feo E., Kruglyak K.M., Halks-Miller M., Curmow K.J. et. al. Noninvasive prenatal testing in the general obstetric population: clinical performance and counseling considerations in over 85000 cases. *Prenat Diagn* 2016; 36(3): 237–243. doi: 10.1002/pd.4766.
25. Benn P., Cuckle H., Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 42(1): 15–33. doi: 10.1002/uog.12513.
26. Ashoor G., Syngelaki A., Wagner M., Birdir C., Nicolaides K.H. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206(4): 322. e1–e5. doi: 10.1016/j.ajog.2012.01.029.
27. Palomaki G.E., Deciu C., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M., Haddow J.E., Neveux L.M. et. al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* 2012; 14: 296–305. doi: 10.1038/gim.2011.73.
28. Zhang H., Gao Y., Jiang F., Fu M., Yuan Y., Guo Y. et. al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146,958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 45(5): 530–538. doi: 10.1002/uog.14792.
29. Chen E.Z., Chiu R.W., Sun H., Akolekar R., Chan K.C., Leung T.Y. et. al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One* 2011; 6(7): e21791. doi: 10.1371/journal.pone.0021791.
30. Johansson L.F., de Boer E.N., de Weerd H.A., van Dijk F., Elferink M.G., Schuring-Blom G.H. et. al. Novel Algorithms for Improved Sensitivity in Non-Invasive Prenatal Testing. *Sci Rep* 2017; 7(1): 1838. doi: 10.1038/s41598-017-02031-5.
31. Yu B., Lu B.Y., Zhang B., Zhang X.Q., Chen Y.P., Zhou Q. et. al. Overall evaluation of the clinical value of prenatal screening for fetal-free DNA in maternal blood. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(27): e7114. doi: 10.1097/MD.0000000000007114.
32. Canick J.A., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M., Haddow J.E., Ehrich M., van den Boom D. et. al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn* 2012; 32(8): 730–734. doi: 10.1002/pd.3892.
33. Huang X., Zheng J., Chen M., Zhao Y., Zhang C., Liu L. et. al. Non-invasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2014; 34(4): 335–340. doi: 10.1002/pd.4303.
34. Srinivasan A., Bianchi D., Liao W., Sehnert A., Rava R. Maternal plasma DNA sequencing: Effects of multiple gestation on aneuploidy detection and the relative cell-free fetal DNA (cffDNA) per fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2013; 208(1), S31. doi: https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.10.226.
35. Struble C.A., Syngelaki A., Oliphant A., Song K., Nicolaides K.H. Fetal fraction estimate in twin pregnancies using directed cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther* 2013; 35(3): 199–203. doi: 10.1159/000355653.
36. Lo Y.M., Tsui N.B., Chiu R.W., Lau T.K., Leung T.N., Heung M.M. et. al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat. Med* 2007; 13: 218–223.
37. Tsui N.B., Akolekar R., Chiu R.W., Chow K.C., Leung T.Y., Lau T.K. 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; 56(1): 73–81. doi: 10.1373/clinchem.2009.132662.
38. Tsui N.B.Y., Wong B.C.K., Leung T.Y., Lau T.K., Chiu R.W., Lo Y.M. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. *Prenat Diagn* 2009; 29(11): 1031–1037. doi: 10.1002/pd.2340.
39. Tong Y.K., Ding C., Chiu R.W., Gerovassili A., Chim S.S., Leung T.Y. et. al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. *Clin Chem* 2006; 52(12): 2194–2202.
40. Papageorgiou E.A., Fiegler H., Rakyan V., Beck S., Hulten M., Lamnissou K. et. al. Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Pathol* 2009; 174(5): 1609–1618. doi: 10.2353/ajpath.2009.081038.