

Неинвазивная пренатальная диагностика: истоки, реалии, ближайшие перспективы

Н.П. Веропотвелян, Ю.С. Погуляй

Межобластной центр медицинской генетики и пренатальной диагностики, г. Кривой Рог

Одной из целей современной перинатологии и медицинской генетики является создание безопасной и надежной пренатальной диагностики. Пытаясь решить эту проблему, был предложен альтернативный подход – неинвазивный забор плодного материала (фетальных клеток, а позже фетальной внеклеточной ДНК (cffDNA) из крови матери на ранних сроках беременности). На сегодняшний день такой метод используют для определения резус-статуса, пола плода, выявления некоторых моногенных заболеваний, диагностики хромосомных анеуплоидий (21,18,13,X,Y). Рассматриваются различные подходы применения таких методик для массового скрининга беременных. Развитие данного направления пренатальной диагностики осуществляется двумя путями: расширение спектра выявляемой патологии и повышение диагностической точности исследований.

Ключевые слова: пренатальная диагностика, моногенные заболевания, скрининг беременных, неинвазивные методы.

На сегодняшний день выделяют 4 уровня профилактики врожденной и наследственной патологии плода: прегаметический, презиготический, пренатальный и постнатальный.

Одним из путей снижения частоты встречаемости врожденной и наследственной патологии (ВНП) среди новорожденных является пренатальная диагностика. Современная пренатальная диагностика включает в себя большой арсенал исследований, среди них особое место занимают инвазивные методы (с последующими лабораторными (цитогенетическими, молекулярно-генетическими, биохимическими) исследованиями разного материала плодного происхождения), которые как любое внутриматочное вмешательство сопряжены с определенным риском прерывания беременности (0,5–2%).

Одной из целей современной перинатологии является создание безопасной и надежной пренатальной диагностики.

Пытаясь решить эту проблему, был предложен альтернативный подход – неинвазивный забор плодного материала.

Долгие годы решение данного вопроса было сфокусировано на обнаружении клеток плода в кровотоке матери как источника материала фетального происхождения для проведения неинвазивной пренатальной диагностики (noninvasive prenatal diagnosis (NIPD)). Однако сейчас такой подход не рекомендуют использовать в силу своей ненадежности.

Открытие наличия внеклеточной фетальной ДНК в крови матери (cell-free fetal DNA (cffDNA)) стало новым шагом в развитии этого направления пренатальных исследований.

Несмотря на актуальность, важность, перспективность и быстрое развитие направления неинвазивной пренатальной диагностики, в отечественной литературе информация о данном виде исследований пока не освещена.

КРАТКАЯ ИСТОРИЯ NIPD

В 1893 году Schmoeg впервые предположил, что клетки плода могут быть обнаружены в крови матери. Его предположение базировалось на выявленных им многоядерных ци-

топлазматических фрагментах (которые имели плацентарное происхождение) в крови из легочных сосудов, взятой у женщин, умерших от эклампсии [1, 2].

Это открытие на некоторое время было забыто, поскольку не представляло диагностической ценности при существующих методах исследований.

Некоторые ученые делали попытку подтвердить существование клеток плодного происхождения в крови матери, используя различные методики (цитогенетический анализ [1, 3]; окрашивание акрихином [1, 4]; культивирование [1, 5]; проточная цитометрия (Covone AE., 1984). Однако многие из этих методов были неспецифичными или невоспроизводимыми на других группах [1].

И только с развитием молекулярной биологии было внедрено множество новых и высокочувствительных инструментов для определения и подтверждения содержания клеток плода в материнской крови.

Изначально была сделана попытка использовать Саузерн-блоттинг для определения Y-хромосомы в пробе ДНК, выделенной из периферической крови женщины, которые были беременны плодом мужского пола [6], а также Lo YMD и соавторам с использованием «гнездовой» полимеразной цепной реакции (ПЦР) удалось определить наличие DYZ – локуса в пробе ДНК из периферической крови 19 беременных [7].

Для исследования Y-хромосомы использовали различные участки (DYZ1, DYZ14, ZFY, SRY). В дальнейшем некоторые маркерные фрагменты были выброшены из перечня специфических локусов, пригодных для этих исследований. И уже в 1992 году Као с соавторами сообщил о 92% точности таких методик [1].

В 1993 году Lo YMD с соавторами внедрили определение еще 2 аутосомных генов неинвазивным методом. Первым был ген резус-фактора (RHD), а вторую разработанную систему использовали для диагностики унаследованного от отца Lepore-Boston гена [8, 9].

В дальнейшем большинство исследователей пошли по пути определения аутосомно-доминантных заболеваний, унаследованных от отца.

Поскольку количество клеток плода, циркулирующих в крови беременной, оценивается как крайне незначительное (по наилучшим оценкам 1 клетка на 1 мл материнской крови (10–7 ядерных клеток) [10, 11] проведение исследований было затруднено необходимостью подключения сложных методик обогащения материнского материала клетками плода.

Решение этой проблемы стало возможным в 1997 году после открытия W.K. Rossa и соавторов внеклеточной ДНК плода в материнской плазме (результат апоптоза клеток трофобласта) [12, 13]. Они показали, что фетальная ДНК может составлять около 10% от ДНК материнской плазмы и может анализироваться базовыми молекулярно-генетическими техниками.

Как результат, внеклеточная фетальная ДНК в материнской плазме стала многообещающим источником генетического материала плода для развития NIPD.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОК ДЛЯ NIPD

Состав клеток плода в кровяном русле матери варьирует и представлен элементами собственно крови плода (ядерными эритроцитами, лейкоцитами) и клеточными элементами плаценты [11].

Современная техника выделения клеток плода из крови матери включает методы проточной цитофотометрии, флуоресцентной (FACS) и магнитной активации (MACS), а также градиентное центрифугирование [11, 14].

Предприняты успешные попытки получения воспроизводимых результатов в стандартных лабораторных условиях с использованием ступеньчатого центрифугирования в градиенте плотности фиколла, либо путем отбора таких клеток на предметных стеклах при помощи иглы микроманипулятора после предварительной окраски на выявление фетального гемоглобина. Применение этих методов в широкой практике затруднено по причине их высокой стоимости [11].

Методы FACS и MACS основаны на антигенных различиях клеток и являются наиболее часто используемые для неинвазивной ПД [14].

Краткая характеристика клеток для NIPD Трофобласты

Первыми были обнаружены в кровотоке беременных. Однако при дальнейших исследованиях оказалось, что использование их для NIPD затруднительно по нескольким причинам:

- их выявляют в кровотоке не у всех женщин;
- возможен хромосомный мозаицизм в 1% случаев;
- как многоядерные клетки не могут использоваться для исследования FISH-методом;
- имеет место выработка специфических моноклональных антител против поверхностных антигенов трофобластов в организме матери [1, 14].

Лейкоциты

Первым свойством, которое заинтересовало исследователей по использованию фетальных лейкоцитов, была их способность к пролиферации *in vitro*. Это же свойство и затруднило дальнейшее использование таких клеток для неинвазивной пренатальной диагностики, поскольку пролиферация происходит и в органах материнского организма *in vivo*. Поэтому возникло предположение о невозможности использования лейкоцитов плода для NIPD конкретной беременности, поскольку часть полученных лейкоцитов могут быть «продуктами» от прошлых беременностей.

Опять же ограничением также является выработка антител против лейкоцитов плода в материнском организме [14].

Стволовые клетки и предшественники гемопоэза

Проблему малого количества фетальных клеток в кровотоке матери пытались решить также при помощи стволовых клеток плода в кровотоке матери, используя их пролиферативный потенциал в условиях *in vitro*.

Проведенные эксперименты по культивированию фетальных предшественников клеток крови (Lo et al., Valerio et al., 1994–1996) не увенчались успехом, поскольку полученная культура клеток имела уникальную цитокиновую комбинацию (мать–плод).

Попытки использовать мезенхимные стволовые клетки также не были успешными.

Их высокий потенциал к самовосстановлению и дифференцировке ограничивает их применение в клинической практике, поскольку возможны перекрестные перерождения клеток при прохождении через плаценту или встрече с персистирующими клетками от предыдущих беременностей [14].

Эритробласты

Фетальные эритробласты оказались клетками с наиболее желанными характеристиками.

Они имеют ограниченный срок жизни, характерную морфологию, последовательно присутствуют на протяжении всей беременности и имеют ограниченную пролиферативную способность [1, 14].

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ПЛОДА

Фетальную ДНК в материнской плазме возможно выявить уже на 32-й день гестации, но необходимая для исследования концентрация накапливается только к 7-й неделе (необходимый минимум содержания фетальной ДНК составляет 3-4%) [15]. Так, чувствительность до 7 нед оценивается в 50-77% [16].

В исследовании G. Ashoor с соавторов [17] было показано, что уровень cff-DNA в крови беременной взаимосвязан с 2 основными факторами: массой тела матери и размеров плаценты.

При одноплодной беременности в сроке 11-13 нед доля cff-DNA в плазме матери составляет 10%. Отмечена прямая зависимость этого показателя от уровней f-β-hCG и PAPP-A и обратная зависимость от массы тела матери (при массе тела до 60 кг этот показатель составляет 12%, а при массе тела 120 кг – всего 6%). Не отмечено зависимости уровня cff-DNA от возраста матери, расовой принадлежности, курения, а также КТР, толщины воротникового пространства, пола и кариотипа плода [17].

Согласно данным ультразвуковых исследований, проведенных в режиме 3D, существует корреляция между весом (объемом) плаценты и уровнями β-hCG и PAPP-A, что объясняет линейную зависимость между долей фетальной ДНК и уровнями биохимических маркеров, поскольку источником фетальной cff-DNA является плацента [18].

Также отмечено, что уровень cff-DNA в крови беременной повышен при эклампсии и задержке роста плода. Повышение уровня внеклеточной фракции ДНК плодного происхождения в этом случае можно объяснить гибелью клеток плаценты и/или клеток плода и микроворсин, содержание которых в кровотоке матери возрастает при преэклампсии [19].

Снижение уровня фетальной cff-DNA отмечают при трисомии 18 (что связано с маленьким объемом плаценты при этой анеуплоидии), тогда как при трисомии 21 этот уровень такой же, как при эуплоидных беременностях [20].

Внутренние отличия между фетальной и материнской внеклеточной ДНК используют для повышения относительного количества ДНК плода, включающие отбор коротких фрагментов ДНК и идентификацию универсальных маркеров фетальной ДНК.

Для обогащения образца cff-DNA используют следующие методики:

- экстракция с использованием формальдегида;
- сепарация по размеру фрагментов;
- эпигенетические отличия (метилчувствительная рестрикция, иммунопреципитация (MeDIP)) [21].

Проведенные исследования свидетельствуют, что наличие внеклеточной ДНК плода является хорошим маркером «благополучия» синцитиотрофобласта [22].

В крови матери cff-DNA циркулирует в виде нуклеосом. Также в 2004 году Chan и соавторы сообщили о том, что фрагменты внеклеточной ДНК плода являются очень короткими (не более 313 п.о., а в среднем около 162 п.о.) (в то время как материнские фрагменты ДНК значительно длиннее) и вполне пригодны для различных молекулярно-генетических техник [15, 21].

Для проведения анализа необходимо быстрое очищение cff-DNA из материнской плазмы, поскольку время полураспада ее составляет 16-30 мин, и уже становится неопределя-

емой через 1-2 ч. Хотя отмечено, что при эклампсии ДНК возможно очищать более медленно [15].

Определить плодovou ДНК в материнской крови технически сложно, поскольку материнская внеклеточная ДНК является преобладающей. Также не представляется возможности выделить чистую фетальную ДНК, поэтому все опыты основаны на определении маркеров, которых нет у матери. Первым таким маркером стал маркер, сцепленный с полом – ген SRY.

Метильный профиль фетальной ДНК стал одним из альтернативных эпигенетических маркеров [15].

Сначала таким диагностическим признаком стал плацентарный эпигенетический маркер maspin [SERPINB5]: промотор данного гена сильно метилирован в материнских лейкоцитах и гипометилирован в плаценте. И с помощью SNP (single-nucleotide polymorphism) анализа удается определить гипометилированный ген плаценты, а ген лейкоцитов матери только после обработки бисульфатом [23].

Другим подходом стал SABER-метод (single allele base extension reaction) с последующей масс-спектрометрией. Эта техника используется для определения унаследованных от отца мутантных аллелей [15, 24].

Сейчас проведение непосредственно исследований анеуплоидий основано на двух подходах: MPSS (massively paralleled shotgun sequencing) и DANSR (digital analysis of selected region), основанных на одновременном анализе множества различных маркеров или ограниченного числа маркеров. Однако эти методики подразумевают задействования алгоритмов подсчета риска по результатам теста на основе программного обеспечения (например, FORTE (Fetal fraction Optimized Risk for Trisomy Evaluation)).

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ NIPD

1. RHD-типирование

С 2001 года резус-типирование с использованием cff-DNA применяется при ведении женщин с повышенным риском гемолитической болезни новорожденных до развития угрозы плоду или повышения титра антител [25, 26]. Методика заключается в обнаружении RHD-гена в крови резусотрицательных женщин.

Сейчас происходит внедрение данного подхода как скринирующего для женщин группы риска (по подсчетам риск ложноотрицательного результата составляет 0,2%) [25, 26].

2. Определение пола плода

Исследования проводятся с применением в качестве диагностического маркера генов DYS14 или SRY, расположенных на Y-хромосоме [25].

Чаще всего такие исследования проводят для исключения X-сцепленных заболеваний (часто врожденной гиперплазии коры надпочечников, гемофилии, миопатий) [28].

Ошибка при тестировании после 7 нед беременности составляет 2,2%, а на более ранних сроках еще больше [25].

3. Моногенные заболевания

NIPD применяют для диагностики заболеваний, унаследованных от отца, реже заболеваний, возникших de novo [13, 29].

В основном проводят диагностику следующих аутосомно-доминантных заболеваний: ахондроплазия, миотоническая дистрофия, синдром Хантингтона.

Диагностику аутосомно-рецессивных заболеваний проводят только в случае, если супруги являются носителями разных мутаций в определяемом гене. Такой подход применяют для муковисцидоза, талассемии, метаболических заболеваний, гемоглобинопатий и ретинопатий (табл. 1).

При наличии у родителей одинаковых мутаций применяют подход RMD (relative mutation dosage) [30].

Однако это не отменяет последующие инвазивные вмешательства, а только сокращает группу обследуемых.

Для определения заболеваний de novo диагностическим критерием для отбора пациентов группы риска являются УЗ-маркеры.

4. Диагностика хромосомных анеуплоидий

Определение анеуплоидий происходит посредством детекции количества коротких картированных фрагментов относящихся к той или иной хромосоме.

На рынке уже представлены коммерческие тест-системы для анализа по 5 хромосомам: 21,18,13, X,Y.

Ошибка ложноположительных результатов при таких исследованиях оценивается как 0,1–0,9% (0,1% для трисомии по 21-й хромосоме и 0,9% – для трисомии по 13-й хромосоме) [31].

Меньшая точность определения трисомии 13 обусловлена высоким плацентарным мозаицизмом, особенностью строения ДНК 13-й хромосомы (низким содержанием гуанина и цитозина), а также меньшим содержанием фетальной фракции ДНК в крови матери, чем при трисомии 21 [32].

Однако последние подходы к определению трисомии 13 с помощью NIPT свидетельствуют о возможности повыше-

Таблица 1

Моногенные болезни, которые возможно диагностировать, используя cff-DNA [16]

Болезнь (D – доминантный тип наследования; R – рецессивный; X-X – сцепленный)	Исследователи
Миотоническая дистрофия (D)	Amicucci et al., 2000
Хорея Хантингтона (D)	Gonzalez-Gonzalez et al., 2003, 2008
Ахондроплазия (D)	Chitty et al., 2011, Saito et al., 2000
Дистония с ранним началом (D)	Meany and Norbury, 2009
XLRP (X)	Bustamante – Aragonés et al., 2006
Гемофилия (X)	Tsui et al., 2011
Муковисцидоз (R)	Bustamante – Aragonés et al., 2008; Nasis et al., 2004
α-Талассемия (R)	Tungwiwat et al., 2006
β-Талассемия (R)	Chan et al., 2010
Пропионовая ацидемия (R)	Bustamante – Aragonés et al., 2008
ВГКН (R)	Chiu et al., 2002
Амавроз Лебера (R)	Bustamante – Aragonés et al., 2008

Таблица 2

Соотношение встречаемости T21, T18, T13 в различные сроки беременности

	T18:T21	T13:T21
Замершие беременности	1:1,5 (13:19)	1:1,1 (17:19)
I триместр	1:2,2 (27:60)	1:7,5 (8:60)
II триместр	1:2,6 (83:218)	1:7,8 (28:218)

ния точности диагностики. Так, G. Ashoor и соавторы сообщают о возможности проведения 2-этапных исследований на трисомию 13 [33].

Рассматривается вопрос о целесообразности проведения диагностики относительно трисомии 13. В сроке 11 – 13 нед встречаемость трисомией 18 и 13 относительно трисомии 21 оценивают как 1:3 и 1:7 соответственно, а среди новорожденных как 1:12 и 1:28 соответственно [33]. Приблизительно такое соотношение встречаемости трисомий отмечено в разных популяциях, в том числе в Украине, что позволяет использовать эти расчеты и для нашей страны.

Так, по нашим данным, основанным на исследовании около 1300 замерших беременностей и более 7000 пренатальных исследований в I – II триместрах, проведенных в субпопуляции беременных из Центрального и Юго-Восточного региона Украины в ОКУ "Межобластной центр медицинской генетики и пренатальной диагностики" (г. Кривой Рог), получены следующие данные (табл.2).

Среди новорожденных T18, T13 в регионе, который охватывает ОКУ "МЦМГ и ПД", практически не встречаются, поскольку они выявляются пренатально и своевременно прерываются.

На сегодня The California Technology Assessment Forum (CTAF) включает 5 критериев, которым должны соответствовать NIP-тесты:

- 1.Технология должна быть утверждена соответствующими государственными органами.
- 2.Научные исследования позволяют прийти к заключению об эффективности технологии относительно здоровья общества.
- 3.Технология должна улучшать состояние здоровья общества.
- 4.Технология должна быть полезной в такой же степени, как и альтернативные технологии.
- 5.Должна быть доступной вне исследовательских центров.

Пока этим критериям отвечают только тесты на 21-ю и 18-ю хромосому [32].

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ФЕТАЛЬНАЯ РНК

Альтернативным подходом NIPD также стало определение внеклеточной мРНК-генов, которые экспрессируются только на протяжении внутриутробного развития [15].

Считается, что уровень внеклеточной мРНК может быть сигналом плаценты при анеуплоидиях, структурных аномалиях плода, хронической гипоксии, эклампсии [34].

cffmRNA также возможно определить с 4-й недели гестации, имеет время полужизни, равное 14 мин, ее уровень остается стабильным на протяжении всей беременности.

Определение уровня cffmRNA используют для диагностики преэклампсии и анеуплоидий [15, 35].

С 2004 года для такой диагностики используют подход с использованием микрочипов, разработанных для определения плацентарных маркеров мРНК.

К примеру, синдром Дауна определяют с помощью гена PLAC4, локализованного на 21-й хромосоме [15].

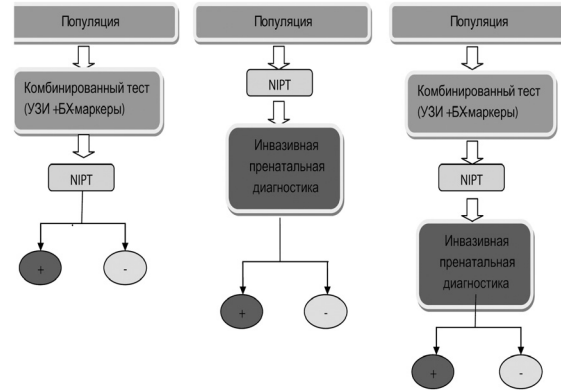


Рис. 1. Подходы к использованию NIPD

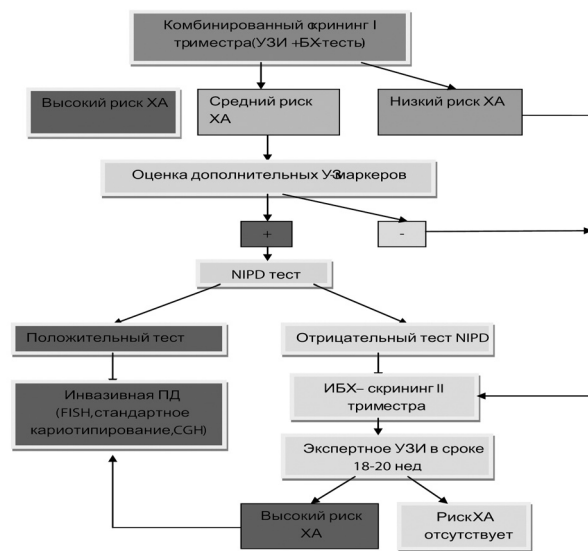


Рис. 2. Алгоритм обследования с использованием NIPD

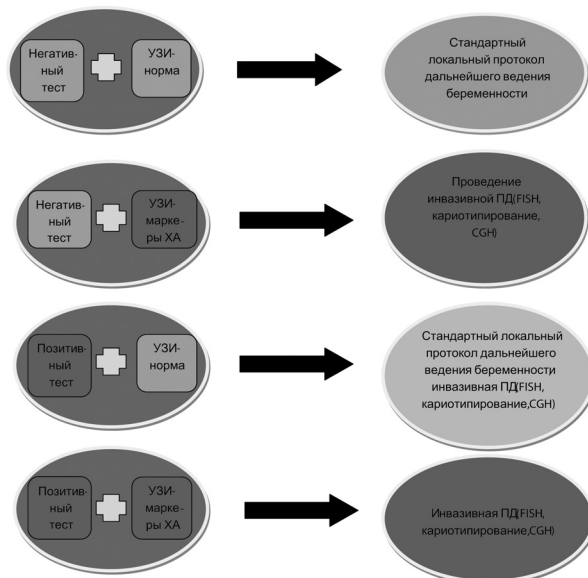


Рис. 3. Оценка результатов NIPD и последующая тактика ведения

ПОДХОДЫ К ПРИМЕНЕНИЮ NIPD

Изначально планировалось, что NIPD постепенно вытеснит и заменит инвазивную пренатальную диагностику. Однако до сих пор этого не произошло.

Кроме того, NIPD со временем стали рассматривать не как диагностику, а как один из диагностических тестов (NIPT), поскольку данный вид диагностики пока не обладает 100% чувствительностью, которую подразумевает определение «диагностика».

Несколько ассоциаций (the California Technology assessment Forum (CTAF), The International Society of Prenatal Diagnosis (ISPD), The United States National Society of Genetic Counselors (NSGC)) не воспринимают NIPT как диагностику и в настоящее время не признают его в качестве "золотого стандарта", как в случае кариотипирования, и как способного его равноценно заменить [32].

Терминологическая дефиниция является крайне важным атрибутом не только клинически, но и методически определяющим статус метода и всего подхода в иерархической цепочке выдачи заключения о результате исследования как окончательного вердикта.

Поэтому, в настоящее время сформировались разные подходы применения NIPD.

1. По результатам комбинированного скрининга в I триместре беременности (УЗИ + ИБХ-скрининг) в группе высокого риска применять неинвазивные пренатальные тесты. Однако такой подход не был использован в самом начале применения NIPD в силу его ненадежности.

2. Применение NIPD в качестве скринирующей программы вместо комбинированного пренатального скрининга (или как вариант вместо биохимического пренатального скрининга) с последующим проведением инвазивной пренатальной диагностики в случае позитивного NIPT (рис. 1).

3. Третьим подходом стало применения NIPT в качестве дополнительного теста по отбору группы риска. Такой подход в настоящее время является наиболее целесообразным по экономическому и медико-генетическому аспектам (рис. 2).

При негативном NIPT-результате (T21, T18, T13, XO, XXU) и наличии УЗ-маркеров ХА показано проведение быстрого кариотипирования FISH; при отрицательном результате последнего целесообразно проведение стандартного кариотипирования (с G/C окраской) для исключения других ХА и/или CGH для диагностики структурных микроаномалий (микроделеции, дупликации и т.д.) (рис. 3).

ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ NIPT ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ СКРИНИНГА ХРОМОСОМНЫХ АНЕУПЛОИДИЙ

Для тестирования на хромосомные анеуплоидии широкое внедрение NIPT пока остается под вопросом, учитывая высокую стоимость исследований (в Европе стоимость проведения одного теста на анеуплоидии оценивается в 1000–2000 дол. США, в России по предварительным оценкам (запуск планировался в конце 2012 года) около 1000 дол. США).

При скринирующем подходе (исключительно с помощью NIPT с последующим проведением ИПД) на выявление 1 случая синдрома Дауна у плода финансовые затраты варьируют от 2 до 15 млн дол. в зависимости от стоимости одного NIPT (аналогичные затраты в результате комбинированного теста/ТВП+PAPP-A, ф-ХГЧ)/(200) с последующим проведением БВХ (1500 дол. США) в группе высокого риска – составляет примерно 250 тыс. дол. США). Однако затраты на предотвращение потери зуплоидной беременности вследствие инвазивной процедуры в три раза превышают затраты на выявление одного случая трисомии 21 [35].

При других подходах с последовательным проведением

комбинированного скрининга в I триместре, а затем NIPT совокупные затраты существенно ниже. Также возможно проведение NIPT после «квадро» теста (АФП, ф-ХГЧ, НЭ, ИА) в 15–19 нед беременности.

При этом также нужно учитывать пропускную способность лабораторий, в которых можно проводить эти исследования. Однако следует отметить, что возможная частота ложноположительных реакций при NIPT оценивается в среднем до 0,5%, в то время как при комбинированном скрининге и различных вариантах его моделей (например, 2-этапном) – 2,5-3% [34]. В то же время при последовательном проведении NIPT после комбинированного теста чувствительность детекции Т+21 возрастает до 96% при ложноположительном результате 0,03% [35].

Однако в последней публикации Karun Hede (февраль 2013) показаны уже другие данные. Основываясь на аналитической модели в этой публикации изложено, что NIPT при использовании его вместо скрининга I триместра и интегрированного скрининга позволит выявлять на 23 – 43% больше трисомий 21, и позволит сократить инвазивную диагностику на 95% [36].

Кроме того, авторы отмечают, что стоимость NIPT на \$382,844,191 меньше, чем стоимость скрининга I триместра, и на \$516,534,401, чем интегрированный скрининг (стоимость указана на примере США).

Такая заявка может представлять удачный маркетинговый ход в лоббировании интересов компаний, предлагающих на рынок NIPT как новый вид современных лабораторных технологий. Мы не считаем, что за этим стоит только коммерческий интерес. Однако это может стать поворотным моментом в пересмотре существующей стратегии организации массовой пренатальной диагностики ХА среди плодов, полностью вытеснив биохимический скрининг как важную составляющую в существующей модели, с переходом от расчета вероятного математического риска ХА до получения однозначных результатов.

Финансирование системы здравоохранения в основном сосредоточивается на финансировании медицинских услуг, оказываемых на индивидуальном уровне, и в меньшей степени на уровне популяционных мероприятий и программ (неонатальный скрининг на тяжелые наследственные болезни, скрининг рака шейки матки, рака грудной железы и др.).

Государственное финансирование массового пренатального ультразвукового скрининга ведут во многих странах, в то время как определение биохимических маркеров по программе скрининга выполняют преимущественно за счет самих пациентов.

Апробация NIPT как массового скринирующего теста реализована на отдельных выборках в Китае (Гонконг, Пекин) и США.

Китайский опыт, предусматривающий преобразование системы здравоохранения на рыночных принципах в контексте более широких экономических изменений, введенных в стране в конце прошлого века, несет определенные уроки для других стран [31].

В странах со средним и низким уровнем доходов финансирование медицинских услуг общественного здравоохранения еще больше страдает от конкурирующего рынка персональных медицинских услуг в условиях жестких бюджетных ограничений, что особенно актуально в период выхода из экономического кризиса.

Поэтому в ближайшие годы NIPT пока еще не может быть широко доступным методом абсолютно для всех контингентов беременных, а только для селективных групп.

ПЕРСПЕКТИВЫ NIPD

За 15-летний период с момента открытия фетальной внеклеточной ДНК в материнской плазме произошел большой прогресс.

На сегодняшний день определение пола (с учетом этических вопросов только для исключения X-сцепленных заболеваний) и резус-статуса плода (для правильного ведения пациентки уже с самого начала беременности), а также анализ унаследованных от отца мутаций реализуется для широкого клинического применения.

Широкое внедрение NIPT происходит в Китае, США, Великобритании, Испании и Германии.

В России и Украине также уже начаты такие исследования (однако пока только по определению резус-статуса плода и пола).

Сейчас появляется много компаний, которые предлагают коммерческие тест-системы для проведения NIPT.

В частности, на последнем 11-м Всемирном конгрессе по медицине плода (Греция, 2012 год) свою продукцию представили компании «Beryu Genomics» (Китай), «Natera» (США), «Life Codexx AG» (Германия), «Sequenom» (США), «Verinata Health» (США), которые предложили свои подходы к NIPT по диагностике анеуплоидий.

Также появляются такие компании и в России (ЗАО «Геноаналитика» (Москва), «Клинический центр клеточных технологий» (Самара)).

В США в настоящее время существуют три компании, которые активно продвигают неинвазивную диагностику анеуплоидий: "Sequenom" (внедрили тест на T21 в октябре 2011г. и тест на T21,18,13 в феврале 2012г.); "Verinata" (тест на T21,18,13, моносомию X в марте 2012г.); "Aria Diagnostics" (май 2012, тест на T21,18,13) [32].

Развитие таких исследований в ближайшем будущем нацелено на решение следующих задач:

- разработка тестов для многоплодных беременностей;
- возможность проведения исследований при мозаичных состояниях (плод, плацента, пациент);
- диагностика субхромосомных аномалий (например, небольшие делеции 11-й хромосомы, дубликации 6-й хромосомы, микроделеции 12-й и 22-й хромосом) [35].
- разработка «панелей» для NIPT-исследований с учетом этногенетических особенностей популяций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дальнейшая реализация и широкое внедрение в клиническую практику NIPT будет определено двумя основными факторами: отработка техники стабильного и более достоверного результата (за счет использования высокоспецифических маркеров фетальной внеклеточной ДНК) при диа-

гностике различных типов генетического статуса плода; уменьшение себестоимости исследований.

Когда будет осуществлено оптимальное взаимодействие этих двух составляющих, этот метод, скорее всего, вытеснит пренатальный биохимический скрининг. Кроме того, за это время расширится и спектр выявляемой патологии, что позволит поставить эффективность NIPT на еще более высокий уровень.

Неінвазивна пренатальна діагностика: витоки, реалії, найближчі перспективи М.П. Веропотвелян, Ю.С. Погуляй

Однією з цілей сучасної перинатології і медичної генетики є створення безпечної і надійної пренатальної діагностики. Намагаючись вирішити цю проблему, був запропонований альтернативний підхід – неінвазивний забір плодового матеріалу (фетальних клітин, а також пізніше фетальної позаклітинної ДНК (cffDNA) із крові матері на ранніх термінах вагітності). На сьогоднішній день такий метод використовують для визначення резус-статусу, статі плода, виявлення деяких моногенних захворювань, діагностики хромосомних анеуплоїдій (21,18,13,X,Y). Розглядаються різноманітні підходи застосування таких методик для масового скринінгу вагітних. Розвиток даного напрямку пренатальної діагностики здійснюється двома шляхами: розширення спектра патології, що виявляється, і підвищення діагностичної точності досліджень.

Ключові слова: пренатальна діагностика, моногенні захворювання, скринінг вагітних, неінвазивні методи.

Noninvasive prenatal diagnosis: origins, realities, immediate prospects M.P. Veropotvelyan, Y.S. Pogulyay

One of the goals of modern perinatology and medical genetics is the creation a safe and reliable prenatal diagnosis. Trying to solve this problem was proposed alternative approach – a non-invasive sampling of fetal material (fetal cells and fetal cell-free DNA (cffDNA) later from maternal blood in early pregnancy). To date, this method is used to determine Rh-status, sex of the fetus, revealing some monogenic diseases, diagnosis of chromosomal aneuploidies (21,18,13, X, Y). We consider various approaches of applying such techniques for mass screening of pregnant women. The development of this direction of prenatal diagnosis performed in two trajectories: the expansion of spectrum of detectable pathology and increase diagnostic accuracy studies.

Keywords: prenatal diagnosis, monogenic diseases, screening of pregnant women, non-invasive methods.

Сведения об авторах

Веропотвелян Николай Петрович – Межобластной центр медицинской генетики и пренатальной диагностики, 50000, г. Кривой Рог, пл. Освобождения, 3-а; тел.: (0564) 92-38-64. E-mail genetika@ukrpost.ua

Погуляй Юлия Сергеевна – Межобластной центр медицинской генетики и пренатальной диагностики, 50000, г. Кривой Рог, пл. Освобождения, 3-а; тел./факс: (0564) 92-49-30; 92-42-73. E-mail genetika@ukrpost.ua

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. YMD Lo. Non-invasive prenatal diagnosis using fetal cells in maternal blood // Clin.Pathol. – 1994, № 47, p. 1060-1065.
2. Atwood HD, Park WW. Embolism to the lungs by trophoblast // Obstet.Gynecol. – 1961, № 68:611-7.
3. Walknowska J. et al. Practical and theoretical implications of fetal /maternal lymphocyte transfer // Lancer, 1969:1119-22.
4. ISchroder J., de la Chapelle A. Fetal lymphocytes in the maternal blood // Blood, 1972;39. 153-61.
5. Selypes A., Lorencz R. A noninvasive method for determination of the sex and karyotype of the fetus from the maternal blood // Hum.Genet., 1988;79:357-9.
6. Ganshirt-Allert D. et al. Ratio of fetal to maternal DNA is less than in 5000 at different gestational ages in maternal blood// Clin.Genet,1990;38:38-43.
7. YMD Lo et al. Prenatal genetic analysis from maternal blood // Lab.med-ica,1991;8:25-7.
8. YMD Lo et al. Prenatal determination of fetal RHD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative women // Lancer,1993;341:1147-8.
9. Camaschella C. et al. Prenatal diagnosis of fetal hemaglobine Lepore-Boston disease on maternal peripheral blood // Blood,1990;75: 2102-6.
10. Price JO., Elias S. Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry // Obstet. Gynecol.,1991;165:1731-7.
11. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней //Под ред. Э.К. Айламазяна, В.С. Баранова. – М., 2006.
12. YMD Lo, Galbezta N. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum // Lancer,1997;350:485-7.
13. Rossa W.K., Chiu, YMD Lo. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma the coming of age // Seminar in fetal&neonatal Medicine 16 (2011) 88-93.

14. SSY Ho et al. Fetal cells in maternal blood: state of the art for non-invasive prenatal diagnosis // *Annals Academy of Medicine*, 2003;32:597-604.
15. Soo Hyun Kim et al. Non-invasive prenatal diagnosis using cell-free nucleic acids in maternal blood // *Journal of women's medicine*; 2010;2:35-41.
16. Bustamante-Aragones A. et al. Non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders from maternal blood // *Gene*, 2012;504:144-149.
17. Ashoor G. et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: affect of maternal and fetal factors // *fetal diagn Ther* 2012;31:237-243.
18. Metznerbauer M. et al. Three-dimensional ultrasound measurement of the placental volume in early pregnancy: method and correlation with biochemical placenta parameters // *Placenta* 2001;22:602-605.
19. Levine RJ. et al. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal circulation in preeclamptic pregnancies // *Br.Obstet Gynecol*, 2004;190:707-640.
20. Wegryn P. et al. Placental volume measured by three-dimensional ultrasound at 11 to 13 +6 weeks of gestation: relation to chromosomal defects // *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2005;26:28-32.
21. Peter A. Benn. Fetal aneuploidy testing from DNA in maternal plasma//по материалам XI Всемирного конгресса по медицине плода (Греция, 2012).
22. Caroline F. Wright. Cell-free fetal DNA and RNA in maternal blood: implications for safer antenatal testing // *BMJ*, 2009; 339:2451.
23. Chim SS., Tong YK., Chiu RW. et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma/ *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102:14753-8.
24. Ding C. et al. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis // *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 2004;101:10762-7.
25. Noninvasive prenatal diagnosis using cell-free DNA in maternal blood // *SAC Opinion*, 2009.
26. Daniels G. et al. Fetal blood group genotyping. Present and future // *Ann NY Acad Sci*, 2006; 1075:88-95.
27. Finning K. et al. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RHD immunoglobulin in RHD negative pregnant women: prospective feasibility study // *BMJ*, 2008;12;336:816-18.
28. Costa JM. et al. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR // *Prenat. Diag.*, 2001;21:1070-4.
29. Saito H. et al. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma // *Lancet*, 2000;356:1170.
30. Lun FMF et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic disease by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008;105:19920-5.
31. Lui X. Mils. Financing reforms of public health services in China: Lessons for other nations // *Social Science and Medicine*, 2002;54:1691-1698.
32. Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidy: charting the course from clinical validity to clinical utility // *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41: 2 – 6 .
33. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome -selective cell-free DNA analysis method// *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:21 – 26.
34. Carl P. Weiner MD. Cell-free plasma RNA in pregnancy complications// по материалам XI Всемирного конгресса по медицине плода (Греция, 2012).
35. H. Cuckle. Established aneuploidy markers in the NIPT era// по материалам XI Всемирного конгресса по медицине плода (Греция, 2012).
36. Веропотвелян Н.П. Выбор оптимальной модели и стратегии пренатального скрининга хромосомных анеуплоидий // *Пренатальная диагностика*. – Т. 11, № 1. – 2012. – С. 12-22.
37. Medscape Medical News. New Down Syndrome DNA Test Effective and Economical. *Karyn Hede*. Feb 01, 2013.
38. Rossa Chiu. Future of noninvasive prenatal diagnosis // По материалам XI Всемирного конгресса по медицине плода (Греция, 2012).

Статья поступила в редакцию 18.12.2012

НОВОСТИ МЕДИЦИНЫ

МЕДЛЕННЫЙ НАБОР ВЕСА РЕБЕНКА В ПЕРВЫЕ МЕСЯЦЫ ЖИЗНИ – НЕ ПОВОД ДЛЯ БЕСПОКОЙСТВА

Если ребёнок медленно набирает вес в первые три месяца жизни - это ещё не повод для беспокойства, доказали учёные из университета в Бристоле, Великобритания. Результаты проведённого обзора были опубликованы в журнале *The Journal of Pediatrics*.

Каждого новорождённого обязательно взвешивают и измеряют его рост. За изменением этих показателей постоянно следят не только педиатры, но и сами родители малышей, а отклонение от нормы сразу вызывает у них беспокойство.

Группа учёных, во главе с профессором Аланом Эмондом, проанализировали данные 11499 де-

тей, принимавших участие в одном из других исследований. Было выявлено, что 507 детей, которые медленно набирали вес в течение первых восьми недель жизни, догоняли своих сверстников к двум годам. Ещё 480 детей медленно росли до девяти месяцев, но к 13 годам они совсем не отличались от ровесников. Разные сроки в этих двух группах объясняются различными причинами медленного увеличения массы тела.

Учёные отметили, что неоправданное беспокойство родителей приводит к тому, что они начинают больше кормить своих детей. Но необходимо помнить, что особенности питания во втором полугодии жизни определя-

ют будущее увеличение веса ребёнка. Поэтому потребление большого количества калорий в младенческом возрасте позже может привести к ожирению.

Если у ребёнка нет симптомов каких-либо заболеваний, а он только медленно набирает вес, это не говорит ни о какой патологии.

Доктор Саймон Ньюэлл, вице-президент Королевского колледжа педиатрии и детского здоровья, отметил: "Если вес и рост вашего ребёнка не подходит под средние показатели для его возраста, они всё равно могут быть совершенно нормальными".

<http://www.gazeta.ru>