

**БАРКОВ ИЛЬЯ ЮРЬЕВИЧ**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ПРЕНАТАЛЬНОГО  
СКРИНИНГА АНЕУПЛОИДИЙ ПЛОДА НА ОСНОВЕ  
АНАЛИЗА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК КРОВИ МАТЕРИ**

03.02.07 - Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук

**Каретникова Наталия Александровна**

доктор биологических наук,  
профессор РАН

**Трофимов Дмитрий Юрьевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор **Петрин Александр Николаевич**  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярно-биологических исследований отдела фундаментальных исследований, ведущий научный сотрудник

доктор медицинских наук

**Черных Вячеслав Борисович**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр", лаборатория генетики нарушений репродукции, заведующий лабораторией

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов"

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.072.16 на базе ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1 и на сайте [www.rsmu.ru](http://www.rsmu.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук, доцент

**Ларина Вера Николаевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Одно из ведущих мест в структуре причин репродуктивных потерь, неонатальной смертности и детской инвалидности занимают хромосомные анеуплоидии (ХА). Они являются основной причиной неразвивающихся беременностей и выкидышей, а у новорожденных встречаются с частотой до 1:300. Наиболее частыми ХА у родившихся детей являются трисомии по 21, 18 и 13 хромосомам. Анеуплоидии по другим аутосомам обычно не встречаются у родившихся детей, т.к. приводят к прерыванию беременности на ранних сроках. В целях профилактики наследственных и врожденных заболеваний у детей, предупреждения детской инвалидности, в России внедрено обязательное пренатальное обследование беременных, включающее два этапа. На первом проводится выявление беременных женщин группы риска с применением анализа биохимических маркеров и ультразвукового обследования (комбинированный скрининг). В случае установления высокого риска ХА у плода, на втором этапе осуществляется проведение инвазивных диагностических процедур. Как правило, это биопсия хориона или амниоцентез с последующим определением кариотипа плода. При массовом скрининге с целью выявления ХА во II триместре беременности, который осуществляется в соответствии с Приказом МЗ РФ от 28.12.2000 №457, в группу риска попадает много женщин, вынашивающих здоровый плод. Комбинированный скрининг беременных I триместра осуществляется в соответствии с Приказом МЗ РФ от 01.11.2012г № 572н и также базируется на косвенных признаках - результатах УЗИ, биохимических показателях. С его помощью, даже четко соблюдая сроки обследования, удастся отнести в группу риска для последующего проведения инвазивной диагностики лишь около 80% беременностей плодами с трисомией по хромосоме 21. При этом трисомия хромосомы 21 подтверждается только в 1 случае на 6 инвазивных процедур, в то время как процедурозвязанный риск потери беременности после инвазивных вмешательств составляет от 0,5-2% у женщин без отягощенного анамнеза до 5% у женщин с невынашиванием в анамнезе. Это приводит к снижению доверия к результатам скрининга у пациентов и, как следствие, к значительному количеству отказов от верификации методами инвазивной диагностики.

В ряде клинических ситуаций снижение числа инвазивных процедур имеет особое значение. Необходимо максимально использовать неинвазивные методы оценки состояния плода, минимизировать инвазивные вмешательства женщинам с отягощенным акушерским анамнезом, при беременности, протекающей на фоне угрозы выкидыша. Крайне важно избегать процедур, повышающих риск инфицирования плода, беременным с ВИЧ-инфекцией.

Таким образом, имеется необходимость в разработке и внедрении в практическое здравоохранение более современных неинвазивных методов, позволяющих с более высокой точностью выявлять беременных с риском хромосомных нарушений. Наиболее перспективным в данном направлении является неинвазивный метод пренатального скрининга анеуплоидий, основанный на анализе внеклеточной ДНК плода в крови матери (далее - ДНК-скрининг, НИПС).

## **Цель исследования**

Целью работы являлась оценка возможности использования неинвазивного анализа внеклеточной ДНК крови матери для совершенствования системы пренатального скрининга анеуплоидий плода.

## **Задачи исследования**

1. Провести валидацию неинвазивного ДНК-скрининга анеуплоидий по крови матери на выборке образцов с известными результатами инвазивной пренатальной диагностики или исходами беременности для оценки его чувствительности и специфичности по сравнению с применяемыми в настоящее время стандартными комбинированными скринингами.

2. Оценить возможность использования ДНК-скрининга в качестве уточняющего риск скринингового исследования.

3. Установить ограничения для проведения ДНК-скрининга.

4. Определить оптимальные способы проведения подтверждающей диагностики при выявлении высокого риска хромосомной патологии плода по результатам ДНК-скрининга.

5. Оценить возможности полногеномного ДНК-скрининга анеуплоидий плода по сравнению с другими видами скрининга, в т.ч. при многоплодной беременности.

6. Разработать и валидировать способ оценки доли плодовой ДНК, не зависящий от пола плода.

7. Оценить влияние различных факторов, таких как срок беременности, индекс массы тела, вес беременной, условия транспортировки биологического материала в лабораторию, на долю плодовой ДНК и результаты ДНК-скрининга.

## **Научная новизна**

Впервые в России проведена лабораторная валидация ДНК-скрининга на контрольной выборке с известными результатами пренатальной инвазивной диагностики. Доказано, что при соответствующих условиях образцы крови, подлежащие анализу, могут транспортироваться, сохраняться значительное время, что имеет значение для отсроченного исследования.

Разработаны и апробированы подходы, позволяющие оценивать долю плодовой ДНК независимо от присутствия Y-хромосомы, посредством использования однонуклеотидных полиморфизмов. Проведены подбор и применение конкретных однонуклеотидных полиморфизмов для установления доли плодовой ДНК.

Определены факторы, которые влияют на результаты ДНК-скрининга анеуплоидий: ложноположительные результаты могут быть обусловлены особенностями кариотипа женщины, мозаицизмом плаценты и плода; ложноотрицательные результаты - мозаицизмом плода, снижением доли плодовой ДНК; высокий ИМТ не является ограничением к проведению исследования при определении в процессе исследования доли плодовой ДНК. Риск наличия плацентарного мозаицизма и мозаицизма плода следует учитывать при выработке тактики ведения беременности: профилактика плацентарной недостаточности, инвазивная пренатальная диагностика при отсутствии противопоказаний (соответственно).

Разработаны методические подходы, позволяющие различать мозаицизм плодового и материнского происхождения, а, следовательно, минимизировать количество ложноположительных результатов ДНК-скрининга.

Продемонстрировано отсутствие значимой корреляции доли плодовой ДНК со сроком беременности в рекомендованный для проведения НИПС период с 11 по 18 неделю беременности.

Установлено, что ДНК-скрининг можно применять при многоплодной беременности.

Показана возможность применения ДНК-скрининга с использованием полногеномного подхода для выявления клинически значимых редких и частичных анеуплоидий.

### **Достоверность и обоснованность научных результатов**

Степень достоверности и обоснованности научных результатов определяется достаточным количеством исследованных образцов (1918 образцов плазмы крови беременных с внеклеточной ДНК плода), из них 137 с анеуплоидиями по 21, 18, 13 и половым хромосомам, современными методами исследования и верификации полученных результатов, корректными методами статистической обработки.

### **Практическая значимость работы**

Установлено, что неинвазивный пренатальный скрининг анеуплоидий плода на основе анализа внеклеточной ДНК крови матери на сегодняшний день обладает большей чувствительностью и специфичностью по сравнению с комбинированным скринингом. Клиническая значимость полногеномного высокопроизводительного секвенирования заключается как в возможности выявления высокого риска анеуплоидий, в т.ч. частичных, так и в выявлении факторов риска осложнения беременности, что позволяет определять индивидуальную тактику ведения беременности. Определены факторы, влияющие на результаты ДНК-скрининга. Разработаны методические подходы, позволяющие определять долю плодовой ДНК вне зависимости от пола плода, что важно для предотвращения ложноотрицательных результатов. Предложены способы, позволяющие различать мозаицизм плодового и материнского происхождения и тем самым минимизировать количество ложноположительных результатов ДНК-скрининга.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. ДНК-скрининг может быть рекомендован беременным с низким риском по результатам комбинированного скрининга I и II триместров. ДНК-скрининг может рассматриваться в качестве уточняющего риск скринингового исследования перед инвазивной диагностикой для беременных с высоким риском по результатам комбинированного скрининга, что особенно актуально для пациентов с отягощенным акушерским анамнезом.

2. ДНК-скрининг является значительно более чувствительным и специфичным способом выявления анеуплоидий у плода по сравнению со стандартными скринингами I и II триместров, однако его эффективность не может достигать 100% из-за биологических ограничений. В случае выявления высокого риска анеуплоидий по результатам ДНК-скрининга и при отсутствии врожденных аномалий (пороков

развития) по результатам УЗИ, показана инвазивная пренатальная диагностика, которую желательно проводить с применением методов цитогенетического или молекулярного кариотипирования амниотической жидкости, также допустимо использование QF-PCR или FISH.

3. Полногеномное высокопроизводительное секвенирование позволяет получать информацию не только об анеуплоидиях по 13, 18, 21 и половым хромосомам плода, но также о клинически значимых полных и частичных анеуплоидиях по другим хромосомам плода, плаценты и самой матери, в том числе связанных с осложнениями течения беременности.

4. При разработке нормативных документов, регламентирующих проведение ДНК-скрининга, следует учитывать отсутствие значимой корреляции доли плодовой ДНК со сроком беременности в рекомендованный для проведения НИПС период с 11 по 18 неделю беременности, при этом высокий ИМТ не является ограничением для исследования. Доля плодовой ДНК является крайне важным критерием и её определение должно быть регламентировано в обязательном порядке.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты исследования одобрены Ученым Советом ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова” Минздрава России и применяются в практической работе Института репродуктивной генетики, в работе 2-го акушерского отделения патологии беременности, а также используются в учебном процессе на кафедре акушерства и гинекологии департамента профессионального образования ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова” Минздрава России и в научно-производственной деятельности ООО “НПО ДНК-Технология”. Опубликованы методические рекомендации по применению ДНК-скрининга, утвержденные Российским обществом акушеров-гинекологов:

DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2016.6.recomendations>

Получен патент "Способ определения источника анеуплоидных клеток по крови беременной женщины" (RU 2 674 700 C2).

### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены и обсуждены на 8 российских и 3 международных конференциях: IX Всероссийском научном форуме "Мать и дитя" (Москва, 2-5 октября 2007); XXV Юбилейной конференции РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня и завтра" (Сочи, 9-12 сентября 2015); международном форуме "Controversies in preconception, preimplantation and prenatal genetic diagnosis" (Барселона, Испания, 22-24 сентября 2016); XVII Всероссийском научно-образовательном форуме "Мать и дитя - 2016" (Москва, 27-30 сентября 2016); международной конференции "Prenatal Molecular Diagnostics Europe" (Лиссабон, Португалия, 10-14 апреля 2017); конференции "NGS в медицинской генетике" (Суздаль, 26-28 апреля 2017); 2-ой Всероссийской научно-практической конференции "Новые технологии диагностики наследственных болезней" (Москва, 27-28 октября 2017); II съезде Ассоциации специалистов медицины плода (Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2017); конференции "NGS в медицинской генетике" (Суздаль, 25-27 апреля 2018); международной конференции "22nd International Conference on Prenatal

Diagnosis and Therapy” (Антверпен, Бельгия, 8-11 июля 2018); “Всероссийской цитогенетической конференции” (Москва, 29-31 августа 2018).

Апробация диссертации состоялась на заседании апробационной комиссии ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова” Минздрава России 24 сентября 2018 года, протокол №10.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано **19** работ, из них **8** статей в рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК, **10** тезисов докладов в сборниках трудов конференций, получен **1** патент.

### **Личный вклад автора**

Автором проведена систематизация литературных данных по теме диссертации, самостоятельно разработаны дизайн и программа исследования, диссертант принимал участие в обследовании, консультировании, диагностике, ретроспективном и проспективном анализе результатов исследования пациентов, включенных в работу. Автором осуществлялись: получение, подготовка, хранение биологического материала на преаналитическом этапе, участие в молекулярно-генетических исследованиях. Анализ, статистическая обработка полученных данных проведены автором самостоятельно в соответствии с правилами и обеспечивают достоверность результатов и сформулированных выводов. Описание и публикация результатов клинических и лабораторных исследований выполнены автором лично.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на **150** страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы, **9** приложений. Работа иллюстрирована **8** таблицами и **32** рисунками. Указатель литературы содержит **155** библиографических источников, в том числе **7** отечественных и **148** иностранных публикаций.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Для анализа внеклеточной ДНК крови матери в работе исследовались **1918** образцов плазмы крови беременных женщин. Помимо этого, в работе анализировались периферическая жидкая кровь новорожденных, замороженная плазма крови, материал биопсии ворсин хориона, амниотическая жидкость, биоптаты плаценты. Все исследования выполнялось добровольно, по желанию женщины, после подписания соответствующих форм информированного согласия. С целью валидации метода, а также определения возможности транспортировки образцов ретроспективно проведено исследование двух групп беременных женщин с применением высокопроизводительного секвенирования внеклеточной ДНК.

Первую ретроспективную группу составили **286** образцов плазмы крови беременных женщин, которые наблюдались в ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова” Минздрава России. Образцы первой ретроспективной группы были получены у женщин, направленных на пренатальную инвазивную диагностику с целью проведения кариотипирования плода. Получение материала для неинвазивного ДНК-

скрининга осуществлялось в пробирки с ЭДТА объемом 9-10 мл на сроке беременности 10-20 недель, медиана составила 14 недель. Обследование также включало: скрининг I–II триместра беременности (УЗИ, определение содержания сывороточных маркеров, компьютерный анализ); цитогенетическое исследование; инвазивные процедуры. Внутриматочные вмешательства с целью получения хориона, плаценты, амниотической жидкости выполняли в 11-14 недель или в 17-20 недель в связи с противопоказаниями к проведению в ранние сроки беременности или поздним обращением женщины. У всех женщин было получено информированное согласие на инвазивную пренатальную диагностику (биопсия ворсин хориона, плаценты, амниоцентез). Во всех 286 наблюдениях пациентов первой ретроспективной группы в образцах тканей плодового происхождения (хорион, плацента, амниотическая жидкость) был определен кариотип плода с помощью стандартного цитогенетического метода, а периферическая кровь женщин была исследована на наличие анеуплоидий и Y-хромосомы у плода с помощью ДНК-скрининга анеуплоидий по крови матери. Все беременные имели высокий риск хромосомной патологии плода, обусловленный возрастом, изменениями в уровнях сывороточных маркеров, особенностями фенотипа плода. Подсчет рисков осуществлялся с помощью компьютерных программ Astraia и Prisca.

Вторая ретроспективная группа состояла из 477 образцов беременных женщин в сроке от 8 до 20 недель гестации, которые обследовались в условиях медико-генетической консультации ФГБУ "ИвНИИ МиД им. В.Н.Городкова" Минздрава России (г.Иваново). 63 из 477 образцов использовались при валидации выявления анеуплоидий с помощью ДНК-скрининга, в этой подгруппе 22 образца имели установленную цитогенетически хромосомную патологию. Все 477 образцов второй ретроспективной группы исследовались для определения сохранности внеклеточной ДНК при транспортировке в ФГБУ "НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова" Минздрава России. Забор крови осуществлялся как в пробирки с ЭДТА объемом 9-10 мл, с получением плазмы и её заморозкой по месту получения материала, так и в пробирки Cell-Free DNA BCT (Streck, США) объемом 10 мл, которые не подвергались заморозке и доставлялись на исследование не позднее 14 дней после забора крови. Пробирки хранились и транспортировались машиной-рефрижератором в соответствии с рекомендациями производителя при температуре не ниже +6С.

В рамках проспективного исследования было проанализировано 1155 образцов женщин, которые проходили медико-генетическое консультирование в ФГБУ "НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова" Минздрава России. В это число входили женщины в т.ч. и с высоким риском ХА (риск выше 1:100 по данным комбинированного скрининга), которые отказались от предложенной инвазивной диагностики. Всем женщинам были разъяснены ограничения ДНК-скрининга. Забор крови производился в количестве 9 мл в пробирки с ЭДТА, на сроке 11-17 (медиана 14) недель беременности. Все пациенты подписали информированное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования. При высоком риске анеуплоидий по данным ДНК-скрининга пациентам рекомендовалось проведение инвазивной пренатальной диагностики.

Забор крови для ХМА и QF-PCR проводили в пробирки с ЭДТА объемом 2,5 мл, в которые аспирировали по 2 мл крови. Для проведения стандартного



кариотипирования с применением цитогенетических методов исследования в качестве антикоагулянта применяли гепарин, забор крови осуществлялся в объеме 1-2 мл.

Получение плазмы из цельной крови для выделения внеклеточной ДНК проводили с помощью двух последовательных центрифугирований. Сначала 20 минут при низком центробежном ускорении (1600g), затем 15 минут при высоком центробежном ускорении (не менее 12000g). Плазму получали в виде двух аликвот. Рабочую аликвоту использовали для исследования, вторую (контрольную) помещали на длительное хранение при температуре -20С. В случае, если выделение ДНК происходило не сразу после центрифугирования, рабочую аликвоту также помещали на хранение при температуре -20С. Выделение внеклеточной ДНК проводили из 1-2 мл плазмы с помощью набора реагентов MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Контроль качества полученной внеклеточной ДНК проводили на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent, США) с использованием набора High Sensitivity DNA Kit (Agilent, США).

Проведение инвазивной пренатальной диагностики осуществлялось в отделении клинической генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Забор материала осуществлялся с применением ультразвукового контроля. Пробоподготовка при работе с плацентой производилась в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Материал плаценты для дальнейшего исследования молекулярно-цитогенетическими методами получали из 4-х разных частей.

Цитогенетическое исследование проводили с применением методики дифференциального окрашивания метафазных хромосом (G-окраска). Выявление анеуплоидий с применением метода FISH проводили с использованием соответствующих зондов Vysis Fish Probes (Abbott Molecular, США) на хромосомы 21, 18, 13; для исследования половых хромосом применяли зонды Vysis CEPX/Y. Проведение QF-PCR осуществляли с применением набора реагентов для детекции трисомий по 13, 18, 21 и половым хромосомам Aneufast QF-PCR Kit (Genomed Biotech Ltd, Великобритания).

Для определения доли плодовой ДНК осуществлялась амплификация локусов ДНК с однонуклеотидными полиморфизмами, оба аллеля которых встречаются примерно с равной частотой. Амплификация проводилась мультиплексно, т.е. все локусы ДНК амплифицировались одновременно в одной пробирке, с применением 53-х специфичных пар олигонуклеотидов (праймеров). В качестве субстрата для амплификации служила внеклеточная ДНК, выделенная из плазмы.

Секвенирование проводили на приборах Ion Proton или Ion S5 (Thermo Fisher Scientific, США). Для каждого образца готовили 2 варианта библиотек для секвенирования: библиотеки для секвенирования внеклеточной ДНК и библиотеки для таргетного секвенирования частотных однонуклеотидных полиморфизмов. Приготовление библиотек для высокопроизводительного секвенирования ДНК проводили без этапа разрушения (шеринга) первоначальной ДНК, поскольку свободноциркулирующая ДНК в значительной степени фрагментирована.

Подсчет рисков комбинированного скрининга осуществлялся с помощью компьютерных программ Astraia и Prisca. Для анализа данных секвенирования использовался разработанный в лаборатории программный пакет НИПС.

Статистический анализ данных проводили с использованием программных пакетов R (версия 3.2.2, R Core Team, 2012) и MS Excel (Microsoft Office 2010). Статистическую значимость относительного изменения доли плодовой ДНК определяли с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой на непрерывность. Статистическую значимость разницы частоты встречаемости мозаичной формы моносомии определяли при помощи критерия Хи-квадрат с поправкой Йетса. Статистически значимыми считали различия при  $p$  менее 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Разработка и валидация

Важнейшим параметром при проведении ДНК-скрининга является доля плодовой ДНК в материнском кровотоке. В проведенном нами исследовании среднее содержание доли плодовой ДНК в 1918 образцах составило 11,6% (90% доверительный интервал составил от 6,6% до 17,5%). В пяти образцах в 1-й группе валидации уровень плодовой ДНК был менее 4%, в связи с чем они были исключены из дальнейших расчетов диагностических характеристик ДНК-скрининга. При этом в двух образцах с низкой долей плодовой ДНК не были выявлены трисомии по 21 хромосоме (ложноотрицательный результат), что подтвердило важность оценки доли плодовой ДНК для получения валидных результатов ДНК-скрининга. Результаты биоинформатического анализа данных ДНК-скрининга в 1-й группе валидации представлены на рисунке 1. Зеленым цветом обозначены образцы с нормальным количеством хромосом, красным - с наличием анеуплоидии по 21, 18 и 13 хромосомам.

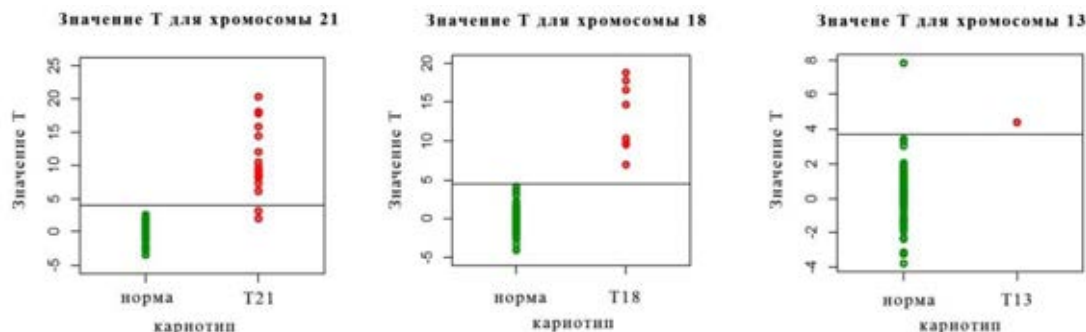


Рисунок 1. Результаты биоинформатического анализа данных ДНК-скрининга.

Данные исследования первой ретроспективной группы представлены в таблице 1. Исключены 5 образцов с низкой долей плодовой ДНК.

Таблица 1. Результаты выявления анеуплоидий для первой ретроспективной группы (N=281).

Вид анеуплоидии	Результаты НИПС	Подтверждено кариотипом	Ложно-положительные	Ложно-негативные
Трисомия 21	44	44	0	0
Трисомия 18	19	19	0	0
Трисомия 13	3	2	1	0
По половым хромосомам (X, Y)	16	15	1	0

При исследовании первой ретроспективной группы, сопоставление полученных обоими методами результатов показало, что в 279 из 281 (99%) случаях данные цитогенетического исследования совпадают с результатами ДНК-скрининга. Всего с помощью ДНК-скрининга высокий риск анеуплоидий по 21, 18, 13 и половым хромосомам был установлен в 82 случаях, из них трисомия 21 - 44 наблюдения, трисомия по 18 хромосоме – 19 наблюдений, трисомия по 13 хромосоме – 3 наблюдения, нарушения по половым хромосомам – 16 наблюдений. Получен один ложноположительный результат по хромосоме 13 и один положительный результат при выявлении моносомии хромосомы X.

При исследовании второй ретроспективной подгруппы, сопоставление полученных обоими методами результатов показало, что во всех 63 случаях (100%) данные цитогенетического исследования совпадают с результатами ДНК-скрининга (таблица 2). Всего с помощью НИПС высокий риск по 21, 18, 13 и половым хромосомам был установлен в 22 случаях.

Таблица 2. Результаты выявления анеуплоидий для второй ретроспективной подгруппы (N=63).

Вид анеуплоидии	Результаты НИПС	Подтверждено кариотипом	Ложно-положительные	Ложно-негативные
Трисомия 21	15	15	0	0
Трисомия 18	6	6	0	0
Трисомия 13	0	0	0	0
По половым хромосомам (X, Y)	1	1	0	0

Результаты исследования проспективной группы представлены в таблице 3. Исключены 10 образцов с низкой долей плодовой ДНК.

Таблица 3. Результаты выявления анеуплоидий для проспективной группы (N=1145).

Вид анеуплоидии	Результаты НИПС	Подтверждено кариотипом	Ложно-положительные	Ложно-негативные
Трисомия 21	13	14	0	1
Трисомия 18	0	0	0	0
Трисомия 13	4	4	0	0
По половым хромосомам (X, Y)	16	9	7	0

При проведении проспективного исследования при уровне плодовой ДНК менее 4% производился повторный забор крови. Уровень плодовой ДНК ниже 4% после перезабора крови наблюдался в 10 случаях (0,87%). Это могло быть связано как с осложненным течением беременности, так и с приемом женщиной лекарственных препаратов. Например, устойчиво низкий уровень плодовой ДНК наблюдался нами в случае приема женщиной преднизолона и метипреда после операции тимэктомии.

При исследовании проспективной группы, сопоставление полученных с помощью НИПС и цитогенетическим методом результатов показало, что в 1137 из 1145 (99%)

случаях данные цитогенетического исследования совпадают с результатами ДНК-скрининга. В результате проспективного исследования было обнаружено 13 образцов с высоким риском трисомии по хромосоме 21, 4 образца с риском трисомии по хромосоме 13, 8 образцов с риском моносомии X, 1 образец с риском трисомии по хромосоме X. Все трисомии по аутосомам были подтверждены инвазивной диагностикой. Моносомия по хромосоме X была подтверждена в 3-х случаях, в одном из них ребенок имел мозаичный кариотип. В одном случае в результате инвазивной диагностики у плода был обнаружен мозаичный кариотип 47,XXX/46,XX при высоком риске моносомии X по данным ДНК-скрининга, это может быть объяснено ошибками на этапе митоза и образованием 3-х клонов клеток. В случае с высоким риском трисомии по хромосоме X, была подтверждена трисомия по хромосоме X у матери, исследование кариотипа плода не проводили. Ложноотрицательный результат, полученный при выявлении трисомии 21, связан с мозаицизмом у плода, характеризующимся наличием трех клонов клеток: моносомного, нормального (дисомного) и трисомного. При исследовании новорожденного методом FISH для хромосомы 21 было обнаружено 77 (76%) ядер с 3 сигналами, 18 ядер (18%) с 2 сигналами и 6 (6%) ядер с 1 сигналом.

Обобщенные результаты выявления анеуплоидий с помощью ДНК-скрининга для ретроспективных и проспективной групп представлены в таблице 4.

Таблица 4. Обобщенные результаты по всем группам (N=1489).

Вид анеуплоидии	Рез-ты НИПС	Подгв. кариот.	Ложн. позит.	Ложн. негат.	Чувствительность, %	Специфичность, %	Положительн. предиктивная оценка (PPV)	Отрицательн. предиктивная оценка (NPV)
Трисомия 21	72	73	0	1	98,6 (92,6-100)	100 (99,7-100)	100 (95-100)	100 (99,6-100)
Трисомия 18	25	25	0	0	100 (86,3-100)	100 (99,8-100)	100 (86,3-100)	100 (99,8-100)
Трисомия 13	7	6	1	0	100 (59-100)	99,9 (99,6-100)	87,5 (47,4-99,7)	100 (99,8-100)
45X	25	18	7	0	100 (78,2-100)	99,5 (99-99,8)	72 (45,1-86,1)	100 (99,8-100)
По половым хромосомам (X, Y)	33	25	8	0	100 (86,3-100)	99,5 (98,9-99,8)	75,8 (57,7-88,9)	100 (99,8-100)

Всего с помощью ДНК-скрининга высокий риск анеуплоидий по 21, 18, 13 и половым хромосомам был установлен в 137 случаях, из них трисомия 21 - 72 наблюдения (совпадает с кариотипом во всех наблюдениях), трисомия по 18 хромосоме – 25 наблюдений (также совпадает с кариотипом во всех наблюдениях), трисомия по 13 хромосоме – 7 наблюдений (один случай ложноположительный), риск нарушений по половым хромосомам был установлен в 33 случаях, подтвержден кариотипом в 25 случаях. При анализе половых хромосом все образцы, в которых определялась Y-хромосома, были отнесены к мужскому полу. Все отрицательные по Y-хромосоме образцы рассматривались как относящиеся к женскому полу. Моносомия хромосомы X была определена в 23 наблюдениях и подтверждена данными цитогенетического анализа в 18. В семи случаях был получен результат, трактуемый как моносомия хромосомы X при наличии у плода нормального женского кариотипа 46,XX.

Таким образом, ложноположительные результаты наблюдались при выявлении по данным ДНК-скрининга высокого риска моносомии хромосомы X, а также высокого риска трисомии по хромосоме 13. Поэтому, несмотря на высокую чувствительность ДНК-скрининга при выявлении анеуплоидий по 13 и половым хромосомам, специфичность диагностики ниже, чем для 21 и 18 хромосом. Возможно, что это объясняется ограниченным плацентарным мозаицизмом, т.к. анеуплоидии по этим хромосомам могут быть менее критичны для функционирования плаценты.

Отсроченное исследование 70 контрольных аликвот плазмы, проведенное через год после первоначального исследования, продемонстрировало полное совпадение результатов.

### **Определение происхождения анеуплоидий при ДНК-скрининге**

Материнские анеуплоидии являются частой причиной ложноположительных результатов ДНК-скрининга. В настоящей работе ими были обусловлены 4 из 9 (44%) ложноположительных результатов исследования, в первую очередь с вовлечением хромосомы X. После введения разработанного нами алгоритма анализа, позволяющего различать материнское и плодовое происхождение анеуплоидий по половым хромосомам, количество ложноположительных случаев резко сократилось. В случае, если анеуплоидными являются все клетки матери, их выявление обычно не представляет сложности из-за аномально высокого изменения в покрытии хромосомы. Однако, зачастую моносомии по X хромосоме наблюдаются в мозаичной форме, в таких случаях изменения в покрытии X хромосомы могут быть сопоставимыми с анеуплоидиями плодового происхождения. Распределение длин плодовой и материнской ДНК отличаются между собой - фрагменты ДНК плодового происхождения обычно короче, чем материнские. Как правило, фрагменты свободноциркулирующей ДНК имеют размер менее 200 п.н. При этом возможная длина прочтения для полупроводникового секвенатора достигает 400 п.н. Поскольку в процессе приготовления библиотек для секвенирования внеклеточной ДНК не требуется этап её фрагментации и отбора по длине, то логично предположить, что распределение прочтений по длине отражает реальные длины анализируемых фрагментов. Распределение значений доли плодовой ДНК для X хромосомы при анализе фрагментов разной длины свидетельствует о том, что при отборе для анализа фрагментов ДНК меньшей длины «эффективная» доля плодовой ДНК возрастает для анеуплоидии плодового происхождения. Если же анеуплоидия в исследуемом образце материнского происхождения, то доля плодовой ДНК остается неизменной. Алгоритм дополнительного анализа для случаев высокого риска моносомии по хромосоме X по предварительным данным ДНК-скрининга представлен на рисунке 2.

Проведение дополнительного этапа анализа позволяет выявить случаи, когда результаты ДНК-скрининга обусловлены особенностями кариотипа матери и значительно увеличить положительное предсказательное значение исследования.



Рисунок 2. Алгоритм дополнительного анализа в случае выявления высокого риска моносомии хромосомы X по предварительным результатам НИПС.

### Определение доли плодовой ДНК

В ходе валидации было продемонстрировано, что при низкой доле плодовой ДНК в образце возможны ложноотрицательные результаты. Определение доли плодовой ДНК просто осуществить в случае с беременностью плодом мужского пола, с этой целью применяют сравнение покрытия Y хромосомы с покрытием остальных аутосом. Если же плод женского пола, то оценка представленности плодовых фрагментов становится сложной задачей. Для определения доли плодовой ДНК был выбран подход, основанный на поиске однонуклеотидных полиморфизмов, которые находятся в гомозиготном состоянии у матери и в гетерозиготном у плода. Были отобраны 85 полиморфных локусов с частотой встречаемости гетерозиготного генотипа 49-51% для европейской популяции и 45-55% для африканской, китайской и японской популяций. Данные полиморфизмы располагаются на расстоянии не менее 20 млн. п.н. на 1-12 хромосомах. Специфичные праймеры для амплификации каждого из выбранных фрагментов были подобраны таким образом, чтобы длина амплификата не превышала 110 п.н. Часть локусов исключили из дальнейшего исследования в ходе предварительных испытаний в связи с отсутствием продукта амплификации на геле-электрофорезе, отличием длины фрагмента от ожидаемой, либо если было более одного продукта амплификации. Оценку доли плодовой ДНК проводили с помощью секвенирования 53 полиморфных локусов. После выравнивания на референсный геном, для позиций на геноме, соответствующих выбранным локусам, подсчитывали количество прочтений для каждого из аллелей. Для анализа использовали только фрагменты с качеством выравнивания не менее 30 и с длиной не менее 80% от ожидаемой длины фрагмента.

Определение доли плодовой ДНК проводили с использованием полиморфных локусов с покрытием не менее 1000 прочтений, для которых представленность одного аллеля была 80-99,5%. Сравнение результатов определения доли плодовой ДНК с

применением однонуклеотидных полиморфизмов и по Y хромосоме проводилось посредством исследования 158 образцов крови от беременных плодов мужского пола. Среднее количество полиморфных локусов, для которых у матери был гомозиготный генотип, составило при секвенировании 27 (24-29), при этом около половины из них были информативными. При сравнении доли плодовой ДНК, установленной с помощью SNP и по данным, полученным при исследовании хромосомы Y установлена корреляция  $r=0,7$ . Медиана абсолютной разницы значения доли плодовой ДНК, определенной с использованием SNP и Y хромосомы, составила 1,8% (0,8-2,8%), для образцов с долей плодовой ДНК ниже 6% - 1,1% (0,5-1,8%).

### Зависимость доли плодовой ДНК от массы тела и от ИМТ

На рисунке 3 представлен график зависимости доли плодовой ДНК от массы тела беременной женщины. Наблюдается снижение доли ДНК плода с ростом массы тела, однако коэффициент корреляции равен всего лишь  $-0,2$ .

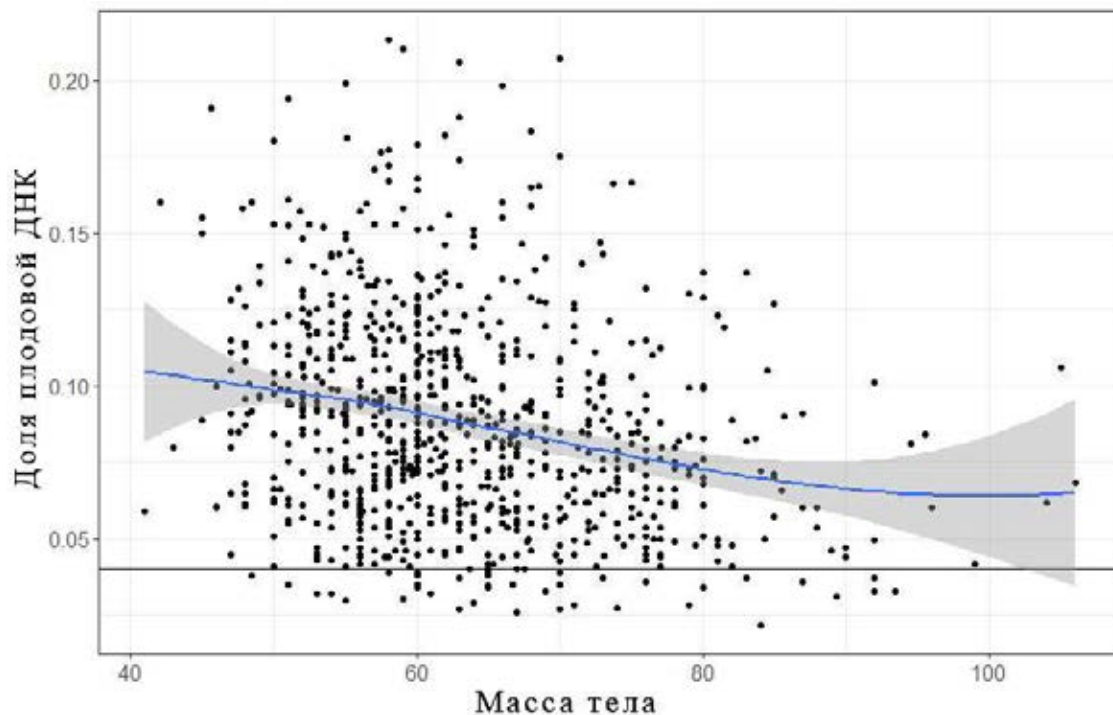


Рисунок 3. Зависимость доли плодовой ДНК от массы тела.

На рисунке 4 представлен график зависимости доли плодовой ДНК от ИМТ беременной женщины, наблюдается снижение доли ДНК плода с ростом ИМТ, коэффициент корреляции  $-0,18$ . Несмотря на то, что при увеличении массы тела и ИМТ доля ДНК плода снижается, образцы для которых доля ДНК плода была ниже необходимого минимума наблюдалась среди женщин с различной массой тела. При проведении исследования нами не выявлено значимых различий между женщинами с разным ИМТ, т.е. высокий ИМТ не является противопоказанием к проведению исследования при определении в процессе исследования доли плодовой ДНК.



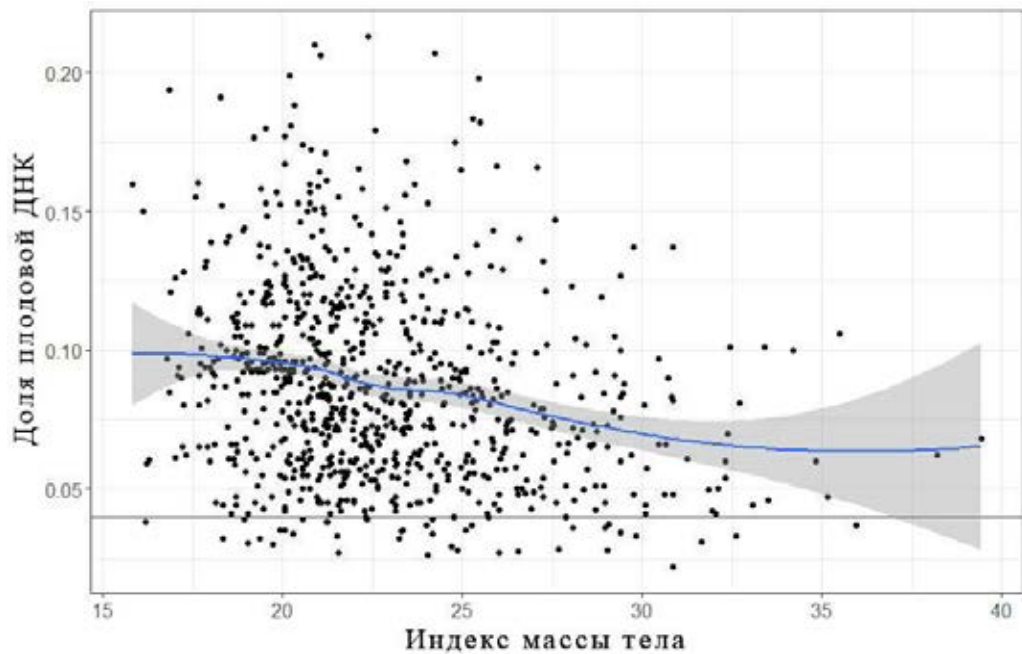


Рисунок 4. Зависимость доли плодовой ДНК от ИМТ.

#### Зависимость доли плодовой ДНК от срока беременности

На рисунке 5 представлен график зависимости доли плодовой ДНК от срока беременности. С ростом срока беременности не наблюдается роста доли плодовой ДНК, коэффициент корреляции 0, что отличается от данных, представленных в литературе. По данным литературы, на сроках беременности 10 - 21 неделя доля ДНК плода растет примерно на 0,1% в неделю. Вероятно, это обусловлено тем, что большая часть исследований была проведена в сроках 11-15 недель, для более поздних сроков беременности проведено небольшое количество исследований.

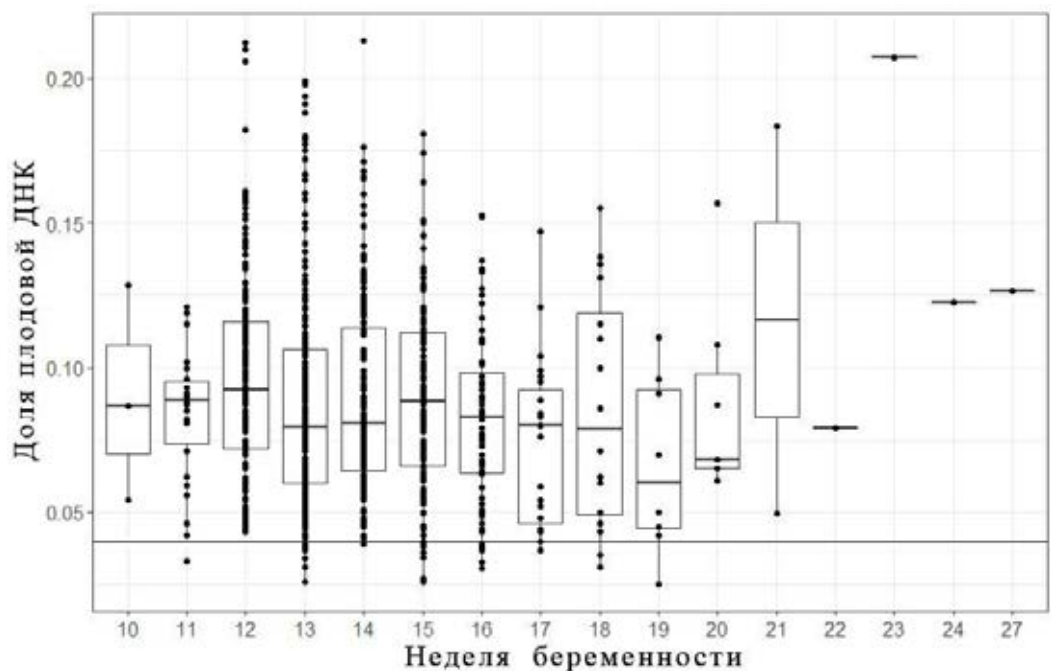


Рисунок 5. Зависимость доли плодовой ДНК от срока беременности.



### Транспортировка материала для исследования

Проведен анализ возможности ДНК-скрининга образцов, доставленных из ФГБУ "ИвНИИ МиД им. В.Н.Городкова" Минздрава России (г.Иваново). Проводился сравнительный анализ образцов, забранных в пробирки с EDTA, прошедших процедуру отделения плазмы по месту забора крови и её замораживание с образцами крови, забор которых осуществлялся в пробирки Cell-Free DNA BCT (Streck, США). При анализе сравнивалась концентрация выделенной ДНК для разных пробирок и доля плодовой ДНК.

Медиана доли плодовой ДНК для пробирок с EDTA составила 10,4%, для пробирок Cell-free DNA BCT 10,2%. Медианы концентрации выделенной ДНК составили 0,113 нг/мкл и 0,108 нг/мкл соответственно. Результаты сравнения распределения доли плодовой ДНК для образцов, забранных в пробирки с EDTA и Cell-free DNA BCT приведены на рисунке 6. Сравнение распределения концентрации выделенной ДНК для образцов, забранных в пробирки с EDTA и Cell-free DNA BCT приведено на рисунке 7. В обоих случаях значимых различий не наблюдалось.

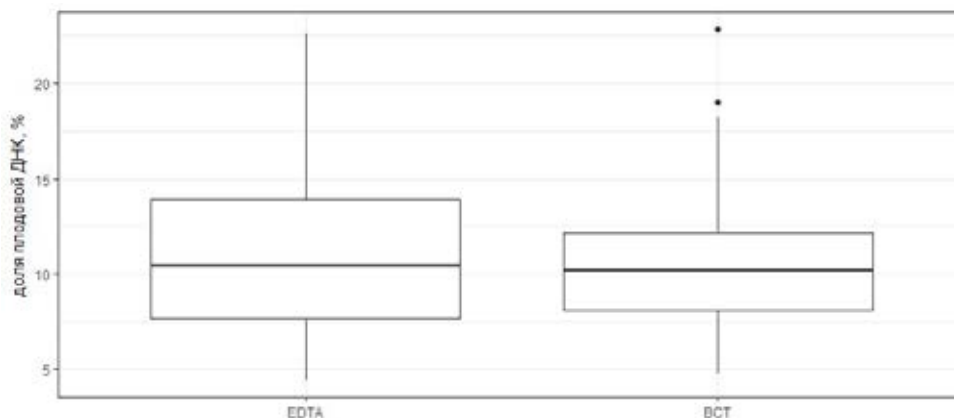


Рисунок 6. Сравнение распределения доли плодовой ДНК для образцов, забранных в пробирки с EDTA и Cell-free DNA BCT.

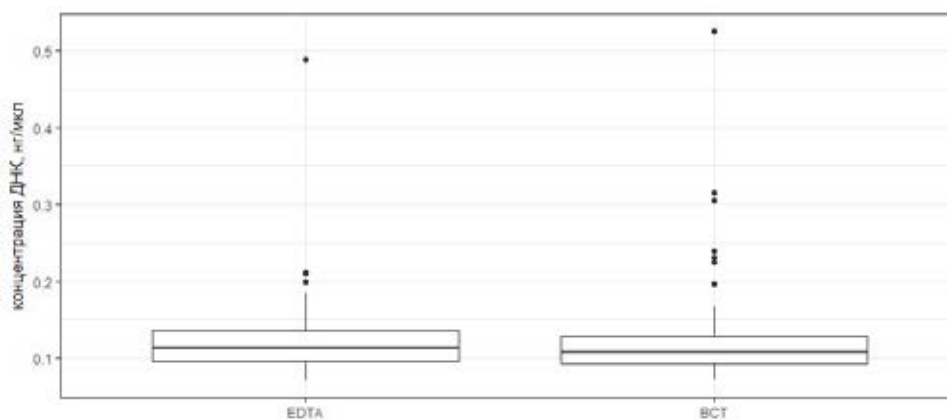


Рисунок 7. Сравнение распределения концентрации выделенной ДНК для образцов, забранных в пробирки с EDTA и Cell-free DNA BCT.

## Пренатальная диагностика с применением микроматричного анализа

Как правило, у пациентов с высоким риском хромосомной патологии по результатам ДНК-скрининга исследование с применением микроматричного анализа осуществлялось в качестве альтернативы стандартному цитогенетическому кариотипированию на больших сроках беременности (выше 20 недель). Этот метод не требует этапа культивирования и результаты могут быть получены значительно быстрее (как правило, за 5-10 дней). Исследование с применением молекулярного кариотипирования (микроматричного анализа) при проведении подтверждающей пренатальной диагностики было обязательным при выявленном при ДНК-скрининге риске делеций и дупликаций (частичных анеуплоидиях). В ходе выполнения данной работы в 64 случаях выявления при ДНК-скрининге пациентов с высоким риском анеуплоидий плода в дополнение к цитогенетическому исследованию был проведен микроматричный анализ, результаты определения анеуплоидий совпали.

## Пренатальная диагностика с применением метода QF-PCR

При проведении подтверждающей инвазивной пренатальной диагностики при выявленном на основании результатов ДНК-скрининга высоком риске трисомий 21, 18, 13, а также по половым хромосомам, помимо цитогенетического и молекулярного кариотипирования, нами широко применялся метод QF-PCR. Данным методом удалось провести исследование во всех случаях, включая 2 пренатальных исследования образцов амниотической жидкости, когда исследование не удалось провести ни с помощью стандартного кариотипирования (отсутствие роста культуры), ни с помощью молекулярного кариотипирования (недостаточное количество материала, плохое качество образца). Образец получаемых при применении метода QF-PCR результатов представлен на рисунке 8.

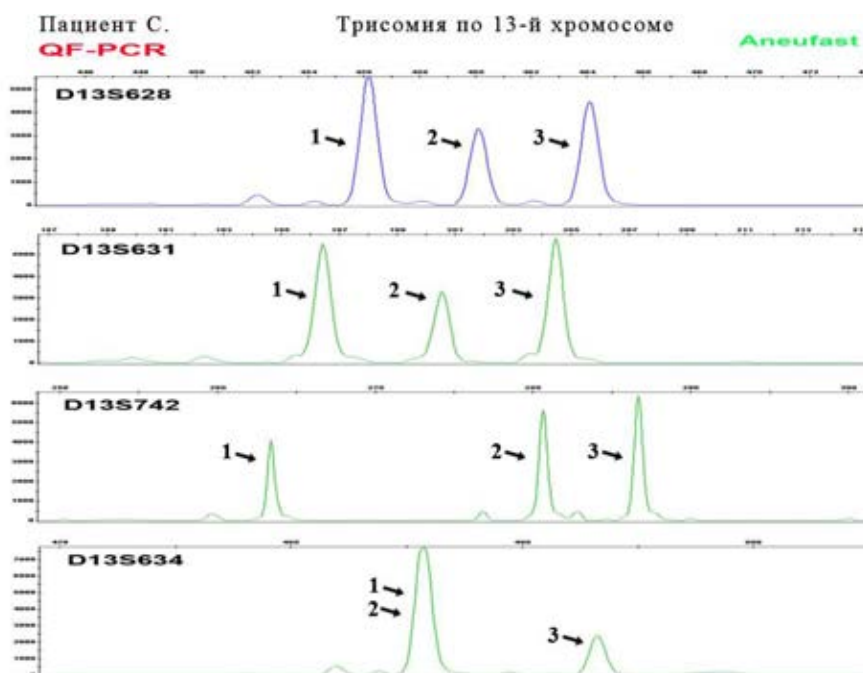


Рисунок 8. Применение метода QF-PCR при проведении исследования амниотической жидкости пациента С., с высоким риском у плода трисомии 13 по результатам ДНК-скрининга.

Трисомия 13 подтверждается по 4-м независимым маркерам: наблюдается наличие 3-х пиков при исследовании STR-маркеров 13-й хромосомы D13628, D13S631, D13S742, а также значительное различие в высоте у двух пиков, наблюдаемых при исследовании STR-маркера 13-й хромосомы D13S634.

### Анализ причин ложноположительных и ложноотрицательных результатов

В таблице 5 представлен обобщенный анализ причин полученных ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Таблица 5. Анализ причин ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

ID образца	Результат кариотипирования	Результат НИПС	Доля плодовой ДНК	Анализ причин
<b>Ложноотрицательный результат</b>				
4295ABR	Трисомия 21	норма	10%	мозаицизм у ребенка обнаружено 3 клона клеток (T21 - 77 клеток (76%) M21 - 6 клеток (6%) D21 - 18 клеток (18%))
<b>Ложноотрицательный/ложноположительный результат</b>				
3021GOL	47,XXX/46,XX	45,X		мозаицизм плода и плаценты
<b>Ложноположительные результаты</b>				
3249ROM	46,XX	45,X	17,3%	мозаицизм матери
K101	46,XX	45,X	23,8%	мозаицизм матери
GA96	46,XX	45,X	9,2%	мозаицизм матери
6254PAN	46,XX	47,XXX	>90%	трисомия у матери
8984BEL	46,XX	45,X	4,2%	не установлена, вероятно плацентарный мозаицизм
4081SHA	46,XX	45,X	4,7%	не установлена, вероятно плацентарный мозаицизм
3574VAS	46,XX	45,X	13%	не установлена, вероятно плацентарный мозаицизм
IGR43	46,XX	45,X	3,9%	не установлена, вероятно плацентарный мозаицизм
K163	46,XX	T13	15%	не установлена, вероятно плацентарный мозаицизм
5434	46,XY	T7	11%	не установлена, вероятно плацентарный мозаицизм
7143MIN	46,XX	T7	8%	мозаицизм плаценты (подтверженный FISH)
5179SIV	фенотипически норма, девочка	T10	12,2%	вероятно лимфоангиома у матери

### Выявление анеуплоидий при многоплодной беременности

При беременности однойцевыми близнецами применение ДНК-скрининга, по сути, ничем не отличается от проведения исследования при одноплодной беременности. Проведенные нами тестовые исследования 9 пациентов после программ ВРТ не выявили каких-либо затруднений при ДНК-скрининге, проводимом при беременности монозиготными близнецами. Беременность монозиготными близнецами обычно возникает в случае переноса одного эмбриона с дальнейшим установлением наличия многоплодной беременности. Однако, далеко не всегда имеется возможность заранее с высокой степенью достоверности установить вид многоплодной беременности у обратившейся на ДНК-скрининг беременной – монозиготными близнецами или дизиготными. Дизиготная беременность наступает при оплодотворении двух разных ооцитов и генетически близнецы в этом случае различаются между собой как обычные братья и сестры. Возникновение дизиготных близнецов связывают с повышенным содержанием в крови матери ФСГ (фолликулостимулирующего гормона), с наследственностью, с возрастом, количеством родов и другими факторами. С целью валидации ДНК-скрининга при исследовании близнецов, нами произведен ДНК-скрининг у 5 пациентов с дизиготной беременностью, для которых ранее уже было установлено наличие трисомии по 21-й хромосоме только у одного из двух плодов (т.е. имелась заведомо сложная для проведения ДНК-скрининга ситуация). Также нами проведено исследование у одного пациента с наличием многоплодной беременности тройней с разнояйцевыми близнецами, только один из плодов при этом имел трисомию по 21-й хромосоме. Во всех случаях ДНК-скрининг позволил выявить наличие высокого риска трисомии 21.

### Выявление редких и частичных анеуплоидий

Полногеномный подход при проведении ДНК-скрининга позволяет не только устанавливать риск нарушений по 21, 18, 13 и половым хромосомам, но также и выявлять риск других, редких и частичных анеуплоидий (делеций и дупликаций). В нашей работе было 10 подобных наблюдений, их общая частота составила 0,7%. Они были представлены: анеуплоидиями по 7-й хромосоме в 4-х случаях; трисомиями по 8-й хромосоме в 2-х; трисомией по 10-й хромосоме – в 1-м случае; делециями и дупликациями – в 3-х наблюдениях.

В качестве примера можно привести исследование пациентки П., 30 лет, ИМТ = 17,6 кг/м<sup>2</sup>, у которой по результатам ДНК-скрининга выявлен высокий риск частичной делеции 4-й хромосомы и частичной дупликации 12-й хромосомы. Результаты были подтверждены микроматричным анализом амниотической жидкости. Установленный в ходе исследования амниотической жидкости молекулярный кариотип плода:

arr[hg19] 4p16.3(68,345-35,195,686)x1 - делеция короткого плеча 4 й хромосомы размером 35 млн. п.н. Делеция соответствует Wolf-Hirschhorn syndrome (OMIM 194190); arr[hg19] 12p13.33p11.22(173,786-28,183,286)x3 - дупликация короткого плеча 12 хромосомы размером 28 млн п.н. Дупликация в данном регионе описана как Pallister-Killian syndrome (OMIM 601803).

Обнаруженные у плода делеция и дупликация – патогенные, в связи с чем было рекомендовано прерывание беременности. Беременность была прервана на сроке 18 недель. Также рекомендовано кариотипирование самих супругов. При проведении

кариотипирования у матери выявлена сбалансированная транслокация с вовлечением 4-й и 12-й хромосом, которая и была причиной появления нарушений у плода.

### Сравнение с опытом применения ДНК-скрининга в мировой практике

Впервые в клинической практике НИПС начал применяться в 2011 году в США. По данным проводимых исследований, было установлено, что ДНК-скрининг обладает высокими диагностическими характеристиками, которые могут различаться для разных хромосом (см. таблицу 6). Диагностические характеристики ДНК-скрининга для различных хромосом приведены с 95% доверительным интервалом, рассчитанным по обобщенным данным.

Таблица 6. Диагностические характеристики ДНК-скрининга.

Хромосома	Число исследований	Чувствительность, %	Специфичность, %	Положительная предиктивная оценка (PPV), %	Отрицательная предиктивная оценка (NPV), %
21	77 308	99,17 (98,48-99,6)	99,94 (99,92-99,95)	96,07 (94,84-97,08)	99,99 (99,98-99,99)
18	77 308	97,80 (95,7-99,04)	99,94 (99,92-99,96)	88,97 (85,48-91,87)	99,99 (99,98-100)
13	69 572	95,74 (89,46-98,83)	99,93 (99,91-99,95)	65,75 (56,2-72,66)	99,99 (99,99-100)
X/Y	22 237	92,75 (83,89-97,61)	99,88 (99,91-99,94)	76,19 (65,65-84,81)	99,98 (99,95-99,99)

Приводимые выше данные демонстрируют высокую предсказательную ценность отрицательного результата ДНК-скрининга, который с высокой вероятностью позволяет исключить наличие анеуплоидий по 21, 18, 13 и половым хромосомам. Сообщается, что в ряде клиник применение НИПС позволило сократить число инвазивных процедур на 30%. В опубликованных в 2012 г. рекомендациях Американского общества акушеров гинекологов (ACOG) применение НИПС считается показанным для группы женщин с высоким риском. В рекомендациях ACOG от 2015 г. применение ДНК-скрининга признано целесообразным уже для всех беременных женщин, вне зависимости от группы риска.

Несмотря на высокие диагностические характеристики, заявляемые зарубежными авторами, следует признать, что большинство работ проводится заинтересованными фирмами. Поэтому нет ничего удивительного, что указанные в исследованиях цифры являются явно завышенными и опровергаются конкретными клиническими примерами, полученными в нашей работе, демонстрирующими совершенно не редкие биологические ограничения, накладываемые на эффективность метода, которая по этой причине вряд ли превышает 99%. Также на текущий момент представляется совершенно необоснованным отказ от комбинированного скрининга I триместра, т.к. в нашей работе продемонстрировано, что эти подходы во многом взаимодополняют друг друга.

В настоящее время в ряде стран проведение НИПС осуществляется бесплатно беременным женщинам с высоким риском ХА (т.е. покрывается медицинской страховкой), при этом в Нидерландах с апреля 2017 года ДНК-скрининг проводится бесплатно всем беременным женщинам. При этом, как правило, проводится исследование только на трисомии по 21, 18 и 13 хромосомам. Это объясняется тем, что исследование нарушений по половым хромосомам на практике связано со

значительным числом ложноположительных результатов, а исследование на другие аутосомы ограничено применением таргентного подхода.

## **ВЫВОДЫ**

1. В ходе проведенного исследования продемонстрировано, что ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери обладает значительно более высокими чувствительностью и специфичностью по сравнению с применяемыми в настоящее время стандартными комбинированными скринингами первого и второго триместров беременности. Это позволяет рекомендовать применение ДНК-скрининга беременным женщинам с низким риском по результатам комбинированного скрининга I и II триместров.

2. Благодаря более высокой специфичности ДНК-скрининг может рассматриваться в качестве уточняющего риск скринингового исследования перед инвазивной диагностикой для беременных с высоким риском по результатам комбинированного скрининга. Это позволит снизить число проводимых инвазивных процедур, что особенно актуально для женщин с отягощенным акушерским анамнезом, а также при ведении беременных с ВИЧ-инфекцией.

3. Несмотря на то, что ДНК-скрининг является высокочувствительным и высокоспецифичным способом выявления анеуплоидий, его эффективность не может достигать 100% из-за биологических ограничений: мозаицизм матери, плода и плаценты.

4. В случае выявления высокого риска анеуплоидий по результатам ДНК-скрининга, при отсутствии врожденных аномалий (пороков развития) по результатам УЗИ, необходима подтверждающая инвазивная пренатальная диагностика, которую желательно проводить по амниотической жидкости с применением методов цитогенетического или молекулярного кариотипирования, также допустимо использование QF-PCR или FISH.

5. Полногеномное высокопроизводительное секвенирование позволяет получать информацию не только об анеуплоидиях по 13, 18, 21 и половым хромосомам плода, но клинически значимых полных и частичных анеуплоидиях по другим хромосомам плода, плаценты и самой матери, в том числе связанных с осложнениями течения беременности. Продемонстрирована возможность проведения ДНК-скрининга при многоплодной беременности.

6. При разработке нормативных документов, регламентирующих проведение ДНК-скрининга, следует учитывать, что отсутствует значимая корреляция доли плодовой ДНК со сроком беременности в рекомендованный для проведения НИПС период с 11 по 18 неделю беременности, при этом высокий ИМТ не является важным ограничением к проведению исследования. Доля плодовой ДНК является крайне важным критерием валидности ДНК-скрининга и её определение должно быть регламентировано в обязательном порядке.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Проведение ДНК-скрининга может быть рекомендовано всем беременным, в т.ч. женщинам с низким риском по результатам комбинированного скрининга.
2. Высокий индекс массы тела не является ограничением для исследования.

3. При выявлении высокого риска по результатам ДНК-скрининга показана инвазивная пренатальная диагностика, которую желателно проводить с применением методов кариотипирования амниотической жидкости, допустимо также использование QF-PCR или FISH.

4. ДНК-скрининг желателно проводить с применением полногеномного подхода, что позволяет получать информацию не только об анеуплоидиях по 13, 18, 21 и половым хромосомам плода, но клинически значимым полным и частичным анеуплоидиям по другим хромосомам плода, плаценты и самой матери, в том числе связанным с осложнениями течения беременности.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. При применяемых в настоящий момент подходах, пренатальная диагностика завершается в сроки, когда редукция большого плода при многоплодной беременности уже невозможна, т.к. она влечет гибель также и здоровых плодов. В связи с этим, необходима разработка технологий, позволяющих завершить диагностические мероприятия на более ранних сроках беременности.

2. Необходима дальнейшая работа по оценке клинической значимости выявляемых при полногеномном ДНК-скрининге редких и частичных анеуплоидий, делеций и дупликаций, различного происхождения (плодового, материнского, плацентарного).

3. Требуется дальнейшей разработки нормативная база.

### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Барков, И.Ю.** Плацентарный мозаицизм по хромосоме 7, выявленный по результатам полногеномного неинвазивного ДНК-скрининга анеуплоидий плода по крови матери. / **И.Ю. Барков**, Е. Шубина, О.К. Ступко и др. // Акушерство и гинекология. - 2018. - № 10 - с.59-63.

2. **Барков, И.Ю.** Определение доли плодовой ДНК в плазме крови беременной женщины с помощью высокопроизводительного секвенирования набора частотных однонуклеотидных полиморфизмов. / Е. Шубина, Т. Янкевич, А.Ю. Гольцов, И.С. Мукосей, Т.О. Кочеткова, А.А. Быстрицкий, **И.Ю. Барков**, Н.К. Тетрашвили, Л.В. Ким, Д.Ю. Трофимов // Вестник РГМУ. - 2018. - № 3 - с.30-34.

3. **Барков, И.Ю.** Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг методом высокопроизводительного секвенирования у беременных с привычным выкидышем. / Г.Т. Сухих, Н.К. Тетрашвили, Л.В. Ким., Д.Ю. Трофимов, **И.Ю. Барков**, Е.С. Шубина, Н.Г. Парсаданян, Н.И. Федорова, А.Ю. Гольцов // Акушерство и гинекология. - 2018. - №8 - с.48-55.

4. **Барков, И.Ю.** Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг методом высокопроизводительного секвенирования у беременных с акушерской патологией. / Г.Т. Сухих, Д.Ю. Трофимов, Н.К. Тетрашвили, Л.В. Ким, **И.Ю. Барков**, Е.С. Шубина, Н.Г. Парсаданян, Н.И. Федорова, А.Ю. Гольцов, Н.В. Александрова // Доктор.Ру. - 2017. - Т.132 - № 3 - с.11-15.

5. **Барков, И.Ю.** Неинвазивный пренатальный ДНК-тест в качестве скрининговой методики у женщин различных групп риска: взгляд на проблему. / Н.К. Тетрашвили, Л.В. Ким, Н.Г. Парсаданян, Н.И. Федорова, **И.Ю. Барков**, Е.С. Шубина, Д.Ю. Трофимов. // Акушерство и гинекология. - 2016. - № 8 - С. 24-28.

6. **Барков, И.Ю.** Новые подходы к проведению пренатального скрининга

хромосомной патологии: ДНК-скрининг по крови матери. / Г.Т. Сухих, Д.Ю. Трофимов, **И.Ю. Барков** и др. // Акушерство и гинекология. - 2016. - № 8. - с.72-78.

7. **Барков, И.Ю.** Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери методом высокопроизводительного секвенирования. Клинические рекомендации. / Г.Т. Сухих, Д.Ю. Трофимов, **И.Ю. Барков** и др. // Акушерство и гинекология. - 2016. - № 6 - с.1-22.

8. **Барков, И.Ю.** Значимость высокого риска наличия редких анеуплоидий при использовании неинвазивного пренатального ДНК-скрининга. / Е. Шубина, **И.Ю. Барков**, Л.В. Ким и др. // NGS в медицинской генетике, Суздаль 25-27 апреля 2018.

9. **Барков, И.Ю.** Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий (НИПС) по крови матери: особенности и ограничения метода. / Е. Шубина, **И.Ю. Барков**, Л.В. Ким и др. // NGS в медицинской генетике, Суздаль 26-28 апреля 2017.

10. **Барков, И.Ю.** Клинические рекомендации "Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери методом высокопроизводительного секвенирования". / Д.Ю. Трофимов, Н.К. Тетруашвили, **И.Ю. Барков**, Е.С. Шубина. // XVII Всероссийский научно-образовательный форум "Мать и дитя – 2016", Москва, 27-30 сентября 2016.

11. **Барков, И.Ю.** "Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий (по крови матери): результаты валидации и рекомендации по применению". / И.Ю. Барков // XXV Юбилейная конференция РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня и завтра", Сочи, 9-12 сентября 2015.

12. **Барков, И.Ю.** Неинвазивная пренатальная ДНК-диагностика пола плода. / **И.Ю. Барков**, Н.А. Каретникова, В.И. Федченко и др. Материалы IX Всероссийского научного форума "Мать и дитя", Москва, 2-5 октября 2007, с.20.

13. **Барков, И.Ю.** Способ определения источника анеуплоидных клеток по крови беременной женщины // Патент России № 2674700. 2018. Бюл. №35. / Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю., Шубина Е.С., Тетруашвили Н.К., **Барков И.Ю.**

14. **Barkov, I.Y.** In silico size-selection is effective in reducing false positive NIPS cases of Monosomy X that are due to maternal mosaic Monosomy X. / J. Shubina, D.Y. Trofimov, **I.Y. Barkov**, et al. // Prenatal Diagnosis. - 2017. - Т.37 - №13 – с.1305-1310.

15. **Barkov, I.** Detection of partial 4-th chromosome deletion and 12-th chromosome duplication with noninvasive prenatal DNA screening. / **I. Barkov**, J. Shubina, M. Kuznetsova, et al. // 22nd International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, 8-11 July 2018, Antwerp-Belgium. // Prenat. Diagn. – 2018. - №38 - S.1 - P2-25 – с.75-76.

16. **Barkov, I.** J. Reduction of false positive sex chromosome aneuploidy NIPS calls caused by maternal monosomy X. / J. Shubina, **I. Barkov**, O. Stupko, et al. // 22nd International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, 8-11 July 2018, Antwerp-Belgium. // Prenat. Diagn. – 2018. - №38, S.1 - P2-24 – с.75.

17. **Barkov, I.** False Negative Trisomy 21 Noninvasive Prenatal Screening Result Due to Fetal Mosaicism. / D. Trofimov, **I. Barkov**, J. Shubina, et al. // Prenatal Molecular Diagnostics Europe, Lisbon 10-14 April 2017.

18. **Barkov, I.** Maternal Aneuploidy as a Cause of False Positive Noninvasive Prenatal DNA Screening Results. / J. Shubina, **I. Barkov**; L. Kim; et al. // Prenatal Molecular Diagnostics Europe, Lisbon 10-14 April 2017.

19. **Barkov, I.Y.** Fetal fraction estimation for noninvasive prenatal screening (NIPS). / J.S. Shubina, **I.Y. Barkov**, A.Y. Golcov, et al. // Controversies in preconception, preimplantation and prenatal genetic diagnosis, Barcelona 22-24 September 2016.