

АКУШЕРСТВО І ГІНЕКОЛОГІЯ

© В.М. БАДЮК, Є.І. ПАРПАЛЕЙ, 2013
В.М. Бадюк², Є.І. Парпалей¹

НОВИЙ НЕІНВАЗИВНИЙ МЕТОД ПРЕНАТАЛЬНОГО ТЕСТУВАННЯ – ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНОЇ ДНК ПЛОДА У КРОВІ ВАГІТНОЇ

¹ Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л. Шупика,

² Медичний центр ТОВ «Клініка генетики репродукції «Вікторія»

Мета. Теоретичний аналіз та узагальнення даних наукової літератури, які стосуються молекулярно-генетичного аналізу вільної фетальної ДНК (вфДНК) в крові вагітної з метою виявлення плодів з трисомією хромосом 21, 18 та 13.

Результати. Аналіз даних наукової літератури стосовно молекулярно-генетичного аналізу вфДНК в крові показав, що основною перевагою запропонованого методу є детекція >99% випадків трисомії хромосом 21 та 18 у плода з частотою хибно-позитивних результатів <1%, що значно ефективніше за інші існуючі протоколи скринінгу вагітних. Для трисомії хромосоми 13, частота якої у популяції у 30 разів менша за трисомію 21, відсоток детекції до 80% при частці хибно-позитивних результатів 0,05%.

Висновки. Метод неінвазивного пренатального тестування є безперечно найефективнішим з існуючих скринінгових тестів для одноплідних вагітностей з високою специфічністю і в більшості випадків в теперішній час застосовується вже при виявленому ризику хромосомної аномалії плода.

Ключові слова: пренатальний скринінг, неінвазивна пренатальна діагностика, трисомія 21, синдром Дауна, синдром Патау, синдром Едвардса, молекулярно-генетичний аналіз, вільна фетальна ДНК.

ВСТУП

Пренатальна діагностика хромосомних аномалій є єдиним засобом надання родині обґрунтованої інформації щодо можливості народження дитини із вітальним синдромом (Дауна), сублетальним (синдроми Патау, Едвардса), а також іншими хромосомними аномаліями. Народження дитини з хромосомним синдромом додає родині значних морально-етичних проблем, потребує матеріальних затрат, впливає на якість життя родини та створює певний економічний тиск на державу. Окрім цього, анеуплоїдії є однією з основних причин перинатальної смертності та займають вагомe місце серед причин дитячої інвалідності.

Причиною появи ембріона з хромосомною аномалією у переважній більшості є спорадичні мутації у гаметах батьків, тому кожну вагітність потрібно розглядати як таку,

що має певний ризик. Для того, щоб визначити ступінь ризику для конкретного плода, протягом чітко регламентованих термінів вагітності проводять його обстеження, які у більшості випадків є неінвазивними (УЗО, біохімічні маркери крові вагітної). Формування групи високого ризику тільки на основі анамнезу або віку вагітної є неефективним, адже 70% дітей з хромосомними аномаліями народжують жінки з необтяженим анамнезом та молодші за 35 років [1].

Як відомо, на сьогодні проведення пренатального скринінгу з розрахунком ризику для кожної вагітної регламентовано діючими наказами МОЗ України. Але, навіть за умов дотримання якості на всіх етапах, при проведенні скринінгу неможливо досягнути ефективності 90%, а у більшості випадків ефективність не досягає і 70% з великою кількістю хибно-позитивних результатів. Іншою проблемою проведення пренатального скринінгу є звернення жінки у неінформативні терміни вагітності [2]. На жаль, комплексні пренатальні програми, які включають масовий біохімічний та ультразвуковий скринінги, працюють не у всіх регіонах України, а більшість їх виконують приватні структури різного рівня, що унеможлиблює контроль та впровадження єдиних уніфікованих стандартів на всій території [3].

З іншого боку, інвазивні діагностичні процедури потребують обґрунтованого призначення, оскільки будь-які хірургічні втручання поєднані з певним ризиком ускладнень, навіть якщо і незначних. Тому виникла потреба у запровадженні нового неінвазивного методу тестування, результат якого забезпечував би високу ефективність виявлення анеуплоїдних плодів, зменшення частоти проведення необґрунтованих інвазивних втручань та, як результат, підвищення ефективності пренатальної діагностики та зменшення генетичного вантажу популяції.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Теоретичний аналіз та узагальнення даних наукової літератури, які стосуються молекулярно-генетичного аналізу вільної фетальної ДНК (вфДНК) в крові вагітної з метою виявлення плодів з трисомією хромосом 21, 18 та 13.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нещодавно на ринку медичних послуг України з'явився метод неінвазивного пренатального тестування (НІПТ) на основні можливі трисомії у плода (21, 18 та 13 хромосом), при якому аналізують вфДНК у крові вагітної за допомогою сучасних молекулярно-генетичних методик (ідентифікація та обчислення мільйонів фрагментів ДНК). Залежно від лабораторії, можуть бути використані різні методи з різною чутливістю та відсотком хибно-позитивних результатів [4].

Неінвазивна діагностика фетальних анеуплоїдій була впроваджена у практику завдяки використанню вфДНК у материнській плазмі, що була відкрита у 1997 році [5] та надала можливість неінвазивно досліджувати генетичний матеріал фетального походження. Було встановлено, що джерелом циркулюючої вфДНК у плазмі материнської крові є плацента, а саме клітини трофобласту [6]. Для тестування анеуплоїдій використовують той факт, що при трисомії хромосоми 21 у плода кількість фрагментів цієї хромосоми у крові матері пропорційно більший, ніж контрольних хромосом (співвідношення 3:2), при чутливості та специфічності 99% [7, 8].

Випробування та вивчення ефекту від застосування нового методу відбувалось коштом гранту the Fetal Medicine Foundation (United Kingdom) з використанням

плазми крові вагітних, яким проводили комбіноване просвіне дослідження у 11-13 тижнів вагітності та надали письмову інформовану згоду на використання зразку їх біоматеріалу у науковому дослідженні [9]. Зразки плазми вагітних аналізували з використанням набору Harmony Prenatal Test (цифровий аналіз обраних регіонів хромосом, Ariosa Diagnostics Inc) [10, 11]. Відповідно до рекомендацій виробників набору, результат дослідження підлягає статистичній обробці, остаточно має виражатися у відсотках ймовірності трисомії у плода від <0,01% до >99% та має межу високого ризику 1%. Даному випробуванню передувала валідація методу НІПТ у кількох клінічних дослідженнях з використанням технології сиквенсу ДНК останнього покоління [12, 13, 14, 15, 16, 17]. З дослідження були виключені зразки плазми крові вагітних, у яких мали місце переривання вагітності, мертвонародження, не було відомо результату пологів або каріотипу плода після інвазивної процедури, а також випадки, де каріотип плода мав аномалію, відмінну від трисомії 21 або 18 (моносомії хромосоми X, делеції, додаткові маркерні хромосоми, мозаїцизм тощо). За таких умов рівень детекції трисомії 21 та 18 серед 1949 вагітних склав 100% (8 випадків трисомії 21 та 3 випадки трисомії 18) при частоті хибно-позитивних результатів 0,1%, тобто 99,9% плодів з нормальним каріотипом отримали ризик трисомії <1% [9]. У двох випадках вагітні з еуплоїдним плодом отримали ризик трисомії 18 близько 10%, що можна пояснити можливим впливом обмеженого плацентарного мозаїцизму, оскільки вфДНК має походження з клітин трофобласту [18]

В іншому дослідженні плазму крові вагітних відбирали для НІПТ перед проведенням біопсії хоріону та тестували 300 euploidних вагітностей, 50 – з трисомією 21 та 50 вагітностей - з трисомією 18 у плода. В результаті НІПТ було виявлено всі плоди з трисомією 21 та 98% плодів з трисомією 18 з частотою хибно-позитивних результатів 0%. Зазначено, що у 1% не вдалось отримати результат тестування з технічних причин [19]

Основною перевагою запропонованого методу є детекція >99% випадків трисомії хромосом 21 та 18 у плода з частотою хибно-позитивних результатів <1%, що значно ефективніше за інші існуючі протоколи скринингу вагітних [20, 21]. Для трисомії хромосоми 13, частота якої у популяції у 30 разів менша за трисомію 21, було визначено значно менший відсоток детекції (36%) [13]. Але після модифікації алгоритму іншими дослідниками відсоток детекції збільшено до 80% при частці хибно-позитивних результатів 0,05% [22]

Jensen T. та співав. у своєму дослідженні додали до молекулярно-генетичних методи біоінформатики для створення бібліотеки вфДНК, що дозволило збільшити рівень детекції трисомій 21, 18 та 13 до 100% з частотою хибно-позитивних результатів 0,09%, 0,01% та 0,08% відповідно [23]

НІПТ може застосовуватись під час першого візиту жінки з приводу вагітності у терміні 11-13 тижнів, відповідно до нового погляду на процес спостереження вагітності [20, 24]. Для тестування використовують плазму крові вагітної, яку попередньо тестують на вміст у ній вфДНК, що має бути не менше 4% від всієї вільної ДНК. Для виявлення вфДНК використовують хромосоמו-специфічний селективний сиквенс неполіморфних та поліморфних локусів, за якими фетальні алелі відрізняються від материнських. В середньому, фетальна фракція у плазмі крові матері становить 10%

(7,8-13,0%). Якщо вміст вфДНК менший за 4%, різниця між трисомними та дисомними вагітностями може бути не виявлена. [15, 25]. Вміст вфДНК збільшується із наростанням плацентарної маси і обернено пропорційний до ваги та зросту вагітної, тому ожиріння вагітної є проблемою для проведення даного тесту [26]. Але є й інші характеристики плода і вагітної, що впливають на вміст вфДНК у крові вагітної, а саме: вміст вфДНК збільшується із збільшенням РАРР-А, вільного в-ХГЛ, паління вагітної, при трисомії 21 у плода та у представників Європейської раси порівняно з Африканською. Інші характеристики плода та вагітної показали недостовірні зміни (вік вагітної, метод зачаття, стать плода, при трисомії 18 та варіації розміру комірцевого простору) [25].

Nicolaides КН та співав. зазначають, що метод НІПТ не може розглядатись як альтернатива ультразвуковому обстеженню плода у 11-13 тижнів, оскільки сканування плода дозволяє виявити дефекти розвитку, які не пов'язані з трисоміями 21 та 18, спрогнозувати можливі ускладнення перебігу вагітності (пreeкламсія, передчасне народження) [9] Крім того, інвазивна пренатальна діагностика має бути застосована при негативному результаті НІПТ, але наявності розширеного комірцевого простору, інших ультразвукових маркерів та структурних дефектів плода [27]

ВИСНОВКИ

На сьогодні метод НІПТ є безперечно найефективнішим з існуючих скринінгових тестів для одноплодних вагітностей, хоча й не вирішує всі завдання пренатальної діагностики і в більшості випадків застосовується вже при виявленому ризику хромосомної аномалії плода, відтермінуючи виконання інвазивного втручання на 1-2 тижні. Безперечною перевагою методу НІПТ є можливість застосування з 12 тижня вагітності, незалежність результату тестування від віку вагітної, кваліфікації лікаря УЗД та станів, що зазвичай впливають на розрахунок індивідуального ризику для вагітної на основі відхилення біохімічних маркерів. Основним технічним обмеженням методу є виявлення ризику тільки тих трисомії, на які здійснювали тестування. Слід розуміти, що будь-яке неінвазивне тестування не є альтернативою пренатальній діагностиці із застосуванням стандартних інвазивних методів, хоча при адекватному застосуванні значно підвищує її ефективність. Потенційно, метод НІПТ може бути використаний для універсального скринінга на трисомії 21, 18 та 13 всіх вагітних, але за умови зменшення його вартості.

Література

1. Бадюк В. М., Нікітчина Т. В. Комбінований генетичний скринінг вагітних як неінвазивний метод пренатальної діагностики (огляд літератури). Перинатологія і педіатрія. 2008, 4 (36): 25»28.
2. Галаган В. О. Медико-генетичне консультування в системі генетичного моніторингу населення : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук : спец. 03.00.15 „генетика”. К. 2004.
3. Гордієнко І.Ю., Моїсеєнко Р.О. Актуальні проблеми організації пренатальної діагностики вродженої та спадкової патології в Україні. Перинатологія і педіатрія. 2009, 2 (38): 6-11.

4. Evans M., Wright D., Pergament E., Cuckle H., Nicolaides K.H. Digital PCR for noninvasive detection of aneuploidy: power analysis equations for feasibility. *Fetal Diagn. Ther.* 2012, 31: 244-247.
5. Lo Y.M.D., Corbetta N., Chamberlain P.F., et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997, 350: 485-487.
6. Alberry M., Maddocks D., Jones M., et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn.* 2007, 27: 415-418.
7. Lo Y.M.D. Noninvasive prenatal detection of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis: a review of the current state of the art. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 2009, 116: 152-157.
8. Chiu R., Lo Y.M.D. Noninvasive prenatal diagnosis empowered by high-throughput sequencing. *Prenat. Diagn.* 2012, 32 (4): 401-406.
9. Nikolaides K.H., Syngelaki A., Ashoor G., et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2012, 207: 374.e1-4.
10. Sparks A.B., Struble C.A., Wange E.T., et al. Non-invasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2012, 206: 319.e1-9.
11. Sparks A., Wang E., Struble C., et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn.* 2012, 32: 1-7.
12. Chiu R.W., Akolekar R., Zheg Y.W.L., et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large-scale validity study. *BMJ.* 2011, 342.
13. Chen E.Z., Chiu R.W., Sun H., Akolekar R. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One.* 2011, 6: e21791.
14. Ehrich M., Deciu C., Zwiefelholter T., et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011, 204: 205.e1-11.
15. Palomaki G.E., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M. et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. *Genet. Med.* 2011, 13: 913-920.
16. Sehnert A.J., Rhess B., Comstock D., et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem* 2011, 57: 1042-1049.
17. Norton M.E., Brar H., Weiss J., et al. Non-invasive chromosomal evaluation (NICE) study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obstet Gynecol.* 2012, 207: 137.e1-8.
18. Wirtz A., Gloning K.P., Murken J. Trisomy 18 in chorionic villus sampling: problems and consequences. *Prenat Diagn.* 1991, 11: 563-567.
19. Ashoor G., Syngelaki A., Wagner M., Birdir C., Nicolaides K.H. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obstet Gynecol.* 2012, 206: 322.e1-5.
20. Nikolaides K.H. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011, 31: 7-15.

21. Chitayat D., Langlois S., Wilson R.D. et al. Prenatal screening for fetal aneuploidy in singleton pregnancies. *J Obstet Gynaecol Can.* 2011, 33 (7): 736-750.

22. Ashoor G., Syngelaki A., Wang E., Struble C., et al. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013, 41: 21-25.

23. Jensen T., Zwiefelhofer T., Tim R., Dzakula Z., et al. High-throughput massively parallel sequencing for fetal aneuploidy detection from maternal plasma. *PLOS one.* 2013, 8 (3): e57381.

24. Nicolaides K.H. Turning the pyramid of prenatal care. *Fetal Diagn Ther.* 2011, 29: 183-196.

25. Ashoor G., Syngelaki A., Poon L., Resende J., Nicolaides K.H. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013, 41: 26-32.

26. Ashoor G., Poon L., Syngelaki A., Mosimann B., Nicolaides K.N. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors. *Fetal Diagn Ther.* 2012, 31: 237-243.

27. Nicolaides K.H. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am. J. Obstet Gynecol.* 2004, 191: 45-67.

В.М. Бадюк, Е.І. Парпалей

Новый неинвазивный метод пренатального тестирования - определение свободной ДНК плода в крови беременной

Национальная медицинская академия последипломного образования
имени П.Л.Шупика,

Медицинский центр ООО «Клиника генетики репродукции «Виктория»»

Цель. Теоретический анализ и обобщение данных научной литературы относительно молекулярно-генетического анализа свободной фетальной ДНК (фДНК) в крови беременной с целью выявления плодов с трисомией хромосом 21, 18 и 13.

Результаты. Анализ данных научной литературы относительно молекулярно-генетического анализа фДНК в крови показал, что основным преимуществом предложенного метода является детекция >99% случаев трисомий хромосом 21 и 18 у плода с частотой ложно-положительных результатов < 1%, что значительно эффективнее других протоколов скрининга беременных. Для трисомии хромосомы 13, частота которой в популяции в 30 раз меньше трисомии 21, частота выявления достигает 80%, при частоте ложно-положительных результатов 0,05%

Выводы. Метод неинвазивной пренатальной диагностики является самым эффективным из существующих скрининговых тестов для одноплодных беременностей с высокой специфичностью и в большинстве случаев в настоящее время используется уже при выявленном риске хромосомных аномалий плода.

Ключевые слова: пренатальный скрининг, неинвазивная пренатальная диагностика, трисомия 21, синдром Дауна, синдром Патау, синдром Едвардса, молекулярно-генетический анализ, свободная фетальная ДНК.

V.Badiuk, E.Parpalei

New noninvasive prenatal testing is an identification of free fetal dna in the blood of pregnant women.

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education,
Medical Center "The Reproductive Genetics Clinic "Victoria"

Aim. A review of scientific literature on the molecular-genetic analysis of free fetal DNA in the blood of pregnant women in order to identify fetuses with trisomy 21, 18 and 13.

Results. Review of the scientific literature regarding the molecular genetic analysis of free fetal DNA showed that the main advantage of the method is the detection of > 99% of trisomies 21 and 18 in a fetus with a false-positive rate < 1%, which is significantly more effective than other screening protocols. For trisomy 13, which frequency in the population is 30 times less than trisomy 21, the detection rate is up to 80% with a false-positive rate of 0.05%.

Conclusions. The method of non-invasive prenatal diagnosis is the most efficient of the existing screening tests for singleton pregnancies with high specificity and in most cases is used when the risk of chromosomal abnormalities is already defined.

Key words: prenatal screening, non-invasive prenatal diagnosis, trisomy 21, Down syndrome, Patau syndrome, Edwards syndrome, molecular genetic analysis, free fetal DNA.

© Н.Ю. ВОРОНЕНКО, 2013

Н.Ю. Вороненко

ПРО-ЗАПАЛЬНИЙ СТАТУС ТА ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ В ГЕНЕЗІ МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ

Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л. Шупика

Вступ. Згідно сучасних уявлень, інсулінорезистентність (ІР) % це первинне селективне і специфічне порушення біологічної дії інсуліна, що супроводжується зниженням утилізації глюкози тканинами, переважно скелетними м'язами, та призводить до хронічної гіперінсулінемії (ГІ).

Мета. Визначення про-запального статусу та його залежність від рівня інсулінемії у жінок з МС та СПКЯ.

Матеріали. Проведено комплексне клінічне обстеження стану репродуктивного здоров'я у 33 жінок репродуктивного віку з СПКЯ, 35 жінок з МС і 54 здорових пацієнток, що склали групу контролю (КГ). Визначення вмісту інсуліну та інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) у плазмі крові обстежених жінок проводили на імуноферментному аналізаторі-фотометрі виробництва "Avareness Technology". Імуноферментне дослідження ELISA виконувалось з використанням двох специфічних антитіл. Вимір оптичної щільності проведено на фотометрі MSR-1000 (Syntron, USA, 1995). Ендокринологічні дослідження проведені в лабораторії ендокринології з групою біохімії ДУ «Інститут ПАГ АМН України» (зав. лабораторією – д. мед. н., професор З.Б. Хомінська).

Результати. Показано, що на тлі МС спостерігається гіперінсулінемія, що патогенетично взаємопов'язує ожиріння, порушення карбогідратного метаболізму, артеріальну