

© О. В. Малышева<sup>1</sup>, В. С. Баранов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> СПбГКУЗ «Диагностический центр  
(медико-генетический)», Санкт-Петербург

<sup>2</sup> ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отга»

СЗО РАМН, Санкт-Петербург

## НЕИНВАЗИВНАЯ ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА. ПРОБЛЕМЫ, ПОДХОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

УДК: 618.2-07:575

■ Обзор посвящен возможностям проведения неинвазивной пренатальной диагностики по ДНК плода, циркулирующей в периферической крови беременной. Приведены характеристики внеклеточной (вк) ДНК плазмы крови и вкДНК плода, циркулирующей в материнском кровотоке. Рассмотрены методические подходы к выделению и анализу внеклеточной фетальной (вкф) ДНК. Обсуждаются возможности и ограничения применения метода для определения пола и резус-фактора плода, а также перспективы неинвазивной диагностики распространенных анеуплоидий.

■ **Ключевые слова:** неинвазивная пренатальная диагностика; внеклеточная фетальная ДНК; пол плода; резус-фактор плода; пренатальная диагностика анеуплоидий.

### Введение

В течение последних двух десятилетий большой интерес вызывает поиск подходов к проведению неинвазивной диагностики генетических заболеваний плода с использованием фетального материала, циркулирующего в материнском кровотоке. Небольшое количество фетальных клеток ( $1/10^5$ – $1/10^6$  от материнских ядерных клеток) [3; 16] проходят сквозь плацентарный барьер и могут быть обнаружены в периферической крови матери. В 1989 была проведена первая неинвазивная диагностика пола плода с использованием метода FISH (флуоресцентной гибридизации *in situ*) на интерфазных ядрах клеток периферической крови беременной. В течение следующих десяти лет были предприняты значительные усилия по совершенствованию и внедрению в практику методов неинвазивной диагностики с использованием клеток плода, однако в большинстве лабораторий эффективность такого исследования не превышала 80% при весьма высокой себестоимости анализа. Кроме того, было установлено, что после каждой беременности клетки плода могут годами присутствовать в организме матери, что также может оказывать неблагоприятное влияние на точность анализа [7].

В 1997 году Ло с соавторами впервые показали присутствие фетальной внеклеточной (свободной) ДНК (ffDNA — fetal free DNA) в плазме крови беременных женщин [36]. Предполагают, что вследствие апоптоза клеток плаценты, а также деградации клеток плода, проникающих через фетоплацентарный барьер, ДНК плода попадает в кровь матери. Количество фетальной ДНК оценивается в среднем от 0,4 до 11,4% от общего количества ДНК плазмы крови. Внеклеточная ДНК плода может быть выявлена в материнском кровотоке, начиная с 5-й недели беременности, при этом содержание ее возрастает на протяжении всей беременности, достигая максимума перед родами [39]. Данное открытие послужило стимулом к интенсивному изучению свободной ДНК плода в качестве потенциального субстрата для неинвазивной дородовой диагностики.

Одни из первых таких исследований были направлены на обнаружение в крови беременных женщин последовательностей Y-хромосомы как маркеров мужского пола плода с целью дородовой диагностики заболеваний, сцепленных с полом [43; 14; 10; 46]. Помимо этого, появились также работы по выявлению последовательностей, кодирующих резус-антиген плода, в крови резус-отрицательных женщин [33]. Ряд работ посвящен пренатальной диагностике аутосомно-доминантных заболеваний, наследуемых по отцовской линии (хорея Гентингтона, миотоническая дистрофия), а также аутосомно-рецессивных заболеваний, диагностика которых возможна в том случае, когда вызывающие заболевание мутации отличаются у отца и матери [34; 5]. Появление в последние годы

более чувствительных методов молекулярной диагностики (digital PCR, полногеномное секвенирование) стимулировало разработку новых более эффективных подходов, позволяющих проводить неинвазивную пренатальную диагностику широкого спектра моногенных и наиболее частых хромосомных болезней [27; 25; 32; 31].

### Внеклеточная фетальная ДНК плазмы крови беременных

Внеклеточная ДНК (вкДНК), циркулирующая в крови здоровых доноров, имеет несколько источников происхождения: апоптозные тельца; ядра, деградирующие в процессе созревания эритроцитов и тромбоцитов; активная секреция клетками нуклеиновых кислот во внеклеточное пространство [8]. ВкДНК плазмы крови низкомолекулярная. 40% молекул имеют длину не более 300 п. н., а размер 90% молекул не превышает 1500 п. н.

Основным источником внеклеточной фетальной ДНК (вкфДНК) является, по-видимому, апоптоз клеток плаценты [6]. Чан с соавторами показали, что молекулы вкфДНК в целом короче, чем молекулы материнской вкДНК [41]. Фракция ДНК размером от 100 до 300 п. н. составляет примерно 50% всей вкфДНК, циркулирующей в материнском кровотоке, в то время как молекулы ДНК длиной 500–700 составляют не более 5% ДНК плода, а молекулы большего размера практически не определяются [41]. По данным других авторов, использовавших технологию полногеномного секвенирования, размер вкфДНК, определенный по последовательностям Y-хромосомы, редко превышает 250 п. н., а основная доля фрагментов имеет размер до 150 п. н. [4]. Размер вкДНК материнского происхождения заметно отличается. Общая вкДНК имеет основную фракцию со средним размером фрагмента 162 п. н., а вторая, минорная фракция, состоит из фрагментов со средней длиной приблизительно 340 п. н.. В то же время до 5% вкДНК в плазме представлены фрагментами длиной 500–700 п. н., а также в небольшом количестве могут быть выявлены последовательности длиной 1,5–2 тпо. Различия в размерах фрагментов внеклеточной ДНК матери и плода авторы объясняют тем, что механизмы, ответственные за высвобождение материнской и фетальной ДНК в кровоток матери, могут отличаться [17; 9].

Общая концентрация вкДНК в плазме крови имеет весьма значительные межиндивидуальные различия и колеблется в пределах 1–100 нг/мл (150–15 000 геном/эквивалентов (Г. Э.)). ДНК плода надежно выявляется в материнском кровотоке начиная с 7-й недели беременности. В 1 мл плаз-

мы крови беременной можно выявить в среднем 25 Г. Э. фетальной ДНК на ранних сроках беременности (до 17 недель) и 292 Г. Э. в третьем триместре [39]. Таким образом, при проведении неинвазивной диагностики, особенно на раннем сроке беременности, исследователи сталкиваются с методическими сложностями, связанными с необходимостью анализа фактически единичных молекул фетальной ДНК, находящихся в смеси с многократно большим количеством молекул материнской ДНК. В этой связи критически важными для успеха подобной диагностики является применение адекватных методик как для выделения ДНК, так и для ее анализа.

### Способы выделения вкфДНК

В первых работах, посвященных исследованию фетальной ДНК в крови матери, авторы использовали как сыворотку, так и плазму крови беременных. Содержание ДНК плода оказалось примерно одинаковым в том и другом случаях, однако содержание материнской ДНК было гораздо выше в сыворотке крови, вследствие выхода в нее ДНК из клеток, разрушающихся в процессе коагуляции [38; 39]. Присутствие большего количества материнской ДНК делает выявление последовательностей ДНК плода существенно менее эффективным, поэтому в настоящее время вкфДНК для неинвазивной диагностики выделяют только из плазмы крови беременных [12]. Для получения плазмы кровь, взятую с антикоагулянтом (ЭДТА), центрифугируют 10 минут при 1000 g. После этого проводят повторное центрифугирование образцов плазмы при 13 000 g в течение 10 минут для того, чтобы избавиться от фрагментов клеток, которые также могут содержать значительное количество материнской ДНК [35].

Критически важным для точности диагностики является также время, прошедшее от момента взятия крови до начала обработки полученных образцов. Молекулы фетальной ДНК стабильны *in vitro*, по крайней мере, в течение 24 часов даже при комнатной температуре, однако через несколько часов начинается разрушение ДНК-содержащих клеток крови матери, что приводит к резкому увеличению концентрации общей вкДНК в плазме, и, как следствие, к снижению чувствительности анализа [35]. Поэтому в большинстве протоколов рекомендуется начинать обработку образцов в течение 2 часов после флеботомии. Образцы плазмы, свободные от форменных элементов крови и фрагментов клеток, могут храниться в течение продолжительного времени при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  [39]. Недавно опубликованы результаты, свидетельствующие о том, что массовое разрушение ДНК-содержащих клеток

крови начинается в образцах через 8 часов после венапункции, независимо от температуры хранения [20]. Однако показано, что добавление к образцам некоторых веществ, в частности формальдегида [11], стабилизирует клетки крови и дает возможность хранить и транспортировать образцы цельной крови в течение достаточно продолжительного времени. Пробирки для взятия крови, содержащие стабилизаторы клеток, коммерчески доступны. В частности, это cell-free DNA BCTs, Streck™.

Для надежного выделения низкомолекулярных ДНК, присутствующих в исследуемых образцах в небольшом количестве, оптимальными являются методы, использующие различные ДНК-сорбенты. Выделение обычно производится из 500–1000 мкл плазмы, на выходе получают 40–200 мкл раствора ДНК [35]. Формат наборов, используемых для выделения ДНК из плазмы крови, может быть различным. Хорошо зарекомендовали себя как автоматические системы выделения ДНК (MagNA Pure LC DNA Isolation System, Roche Applied Science; Chemagen Magnetic Separation Module1, MDX robot Qiagen и др.), так и наборы для ручного выделения [35, 42]. В последнем случае оптимальными для работы являются колоночные системы выделения ДНК. Большое внимание разработке методов выделения ДНК для проведения неинвазивной пренатальной диагностики на протяжении многих лет уделяет компания Qiagen (Германия). В первых работах, посвященных диагностике пола и резус-фактора плода [39, 33], были использованы наборы QIAamp Blood Mini Kit с небольшими модификациями методики. Позже было показано, что большую эффективность выделения и более удобный формат для решения данных задач обеспечивают наборы QIAamp DSP Virus Kit и MinElute Virus Kit [45]. Недавно компания выпустила специальный набор для выделения циркулирующих вкДНК QIAamp Circulating Nucleic Acid, к несомненным достоинствам которого можно отнести возможность выделения ДНК из 5 мл плазмы, получая при этом на выходе 20–150 мкл раствора ДНК, что позволяет в несколько раз увеличить концентрацию вкДНК [20]. К сожалению, кроме высокого качества выделения ДНК, наборы, производимые компанией Qiagen, отличаются также высокой стоимостью (самый дешевый набор для выделения ДНК из 50 образцов MinElute Virus spin kit в декабре 2011 года стоил около 13 000 руб.) и длительными сроками их поставки в Россию.

Следует отметить, что далеко не все колоночные наборы для выделения ДНК дают возможность эффективного выделения вкДНК для проведения пренатальной диагностики. В литературе

имеются данные по успешному применению наборов High Pure PCR Template Preparation kit (Roche, Швейцария), GST genomic DNA purification kit (Invitrogen) и других [45, 35]. Мы, в свою очередь, успешно выделяли вкДНК, используя наборы QIAamp Blood Mini Kit, но не смогли получить удовлетворительных результатов с китами AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen, США) и К-сорб (Синтол, Россия).

Колоночный формат наборов для ручного выделения ДНК наиболее предпочтителен, поскольку условия выделения ДНК при его использовании оказываются практически одинаковыми для всех образцов и риск перекрестной контаминации в процессе выделения минимален. Однако, в принципе, возможно достаточно эффективное выделение вкДНК из плазмы крови с использованием наборов для выделения ДНК, содержащих суспензию сорбента. Два набора отечественных производителей, а именно Diatom DNAprep 400 (Биоком) и ДНК-сорб-В (ЦНИИ Эпидемиологии) могут быть, с небольшими модификациями, использованы для выделения вкДНК из 800–1000 мкл плазмы крови. Дальнейшее исследование ДНК, выделенной таким способом, позволяет провести неинвазивную диагностику пола и резус-фактора плода с точностью не менее 90% [2, собственные данные].

### Методы анализа фетальной ДНК

Классические подходы к неинвазивной пренатальной диагностике направлены на выявление в исследуемом образце последовательностей ДНК, отсутствующих у матери. Это могут быть последовательности Y-хромосомы при диагностике пола плода, гена *RhD* при диагностике резус-фактора плода или отцовского мутантного аллеля/сцепленного с мутацией полиморфного аллеля при диагностике моногенных болезней. В разное время для решения этих задач были использованы разные способы — рутинная ПЦР, ПЦР с внутренними праймерами (nested PCR) [46], количественная флуоресцентная (QF) ПЦР [24]. В настоящее время стандартным методом для выявления последовательностей ДНК плода является проведение ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с зондами TaqMan. Этот метод позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять единичные молекулы ДНК, присутствующие в образце.

Как было отмечено выше, фетальная ДНК выявляется в материнской плазме в 11–17 недель беременности в количестве 3–69 (в среднем 25) Г.Э./мл, а перед родами ее концентрация увеличивается до 77–769 (в среднем 292 Г.Э.) [39, 24]. Для проведения неинвазивной диагностики у па-

циентки обычно берут не менее 5 мл крови, отделяют плазму (не менее 2 мл), и выделяют ДНК из 500–1000 мкл плазмы. Суммарный объем ДНК, выделенной из такого количества плазмы, составляет обычно 50–100 мкл [35]. В образцах, полученных от женщин первого триместра беременности, в этом объеме содержится в среднем 10–20 г/Э. фетальной ДНК. Для проведения ПЦР в реакционную смесь добавляют 5–20 мкл раствора ДНК, выделенной из плазмы крови, то есть в среднем 1–4 г/Э. на 1 пробирку. Таким образом, при проведении неинвазивной ПД, особенно в первом триместре беременности, должна быть решена задача надежного выявления низкого числа копий ДНК. Для этого а) анализ проводится в большом числе повторностей — 3, 6 или 8 реакций для каждого образца; б) могут быть одновременно проанализированы несколько локусов, например, разные экзоны гена *RhD* 3) выделение ДНК из каждого образца плазмы дублируется и полученные образцы ДНК тестируются независимо друг от друга. Во втором и особенно в третьем триместре беременности концентрация фетальной ДНК увеличивается, и задача выявления фетальной ДНК несколько упрощается [45, 35, 40].

Ложноотрицательные результаты анализа могут быть получены в результате неэффективного выделения вкДНК, как общей, так и фетальной. Поэтому при проведении диагностики по вкДНК из плазмы крови матери необходим контроль выделения ДНК и отсутствия ингибиторов ПЦР. С этой целью, параллельно с основным экспериментом, следует проводить ПЦР в реальном времени, позволяющую определить количество суммарной ДНК в образце. Для этого можно использовать разные локусы, например, *GAPDH*, *CCR5*, *ACTB* (бета-актин), *HBB* (бета-глобин) и другие. Однако это не является контролем эффективного выделения фетальной ДНК. Известно, что у небольшого числа женщин количество ДНК плода в периферической крови очень незначительно [24]. Принципиально присутствие ДНК плода в образце может быть доказано. Так, примерно в 50% случаев (при мужском поле плода) при диагностике резус-фактора плода в образцах ДНК могут быть выявлены последовательности Y-хромосомы. В некоторых лабораториях [44] для подтверждения присутствия фетальной ДНК проводится анализ полиморфных локусов отцовского происхождения, однако это требует дополнительного обследования на информативность по нескольким локусам каждой семьи. Определенные надежды связаны с возможностью использования для внутреннего контроля последовательностей ДНК, дифференциально метилированных в организме матери и плода, например

локуса *RASSF1A* [18, 37]. Пока, однако, простые и универсальные подходы к контролю выделения фетальной ДНК не разработаны.

Возможно появление также ложноположительных результатов. Они могут быть результатом контаминации в процессе выделения ДНК и постановки ПЦР, а также артефактов ПЦР. Для уменьшения вероятности загрязнения образцов и неправильной оценки результатов рекомендуется: 1) выделить отдельное рабочее место (ламинарный шкаф) только для выделения ДНК из плазмы крови; 2) минимизировать количество операций при выделении ДНК; 3) использовать для постановки ПЦР отдельный ПЦР-бокс, оборудованный HEPA-фильтром; 4) в каждой постановке ПЦР использовать несколько (не менее 3) «нулевых» контролей для каждого анализируемого локуса.

Кроме контаминации образцов в процессе выделения ДНК и постановки ПЦР, существует еще одна причина, по которой специфичность неинвазивной диагностики в принципе не может достигать 100%. Это существование «исчезающих близнецов» (*vanishing twins*). При наличии по результатам ультразвукового исследования на раннем сроке беременности (4–5 недель) двух зародышевых мешков, исходом беременности примерно в 40,5% случаев будет рождение только одного ребенка. При регистрации двух эмбрионов на более позднем сроке (6–7 недель), в 7,3% случаев беременность также развивается как одноплодная [22].

Поскольку частота рождения близнецов у человека составляет примерно 1:63, а частота возникновения многоплодной беременности оказывается почти в полтора раза выше, проблема «исчезающих близнецов» может вносить существенный вклад в точность неинвазивной диагностики. Так, если исчезающим близнецом окажется эмбрион мужского пола, а вторым будет девочка, ген *SRY* может присутствовать в плазме крови матери, хотя исходом беременности будет рождение ребенка женского пола. В ряде случаев от неразвивающегося близнеца формируется и сохраняется на протяжении всей беременности доля плаценты, клетки которой могут вносить свой вклад в пул фетальной ДНК в плазме крови беременной [29].

### Диагностика пола плода

Решению данной задачи были посвящены первые работы, посвященные неинвазивной пренатальной диагностике по вкДНК плазмы крови беременных [15, 43, 14, 10, 46]. Определение пола плода может проводиться для решения двух задач: во-первых, планирование семьи, и, во-вторых,

анализ пола плода по медицинским показаниям. Вопрос об этичности прерывания беременности ребенком нежелательного пола обсуждается давно. ВОЗ не рекомендует проведение такой диагностики; в ряде стран она запрещена законом. Тем не менее, определенная потребность населения в такой услуге существует, и, по-видимому, она будет оказываться, а возможность проведения неинвазивной диагностики может привести к увеличению спроса. Очевидно, что такая диагностика должна быть выполнена в срок до 12 недель беременности.

Медицинскими показаниями к диагностике пола плода является, прежде всего, беременность у женщины, имеющей высокий риск рождения ребенка с миодистрофией Дюшенна, гемофилией или другими X-сцепленными заболеваниями. Другими показаниями к диагностике генетического пола плода являются риск рождения ребенка с врожденной гиперплазией коры надпочечников (ВГКН; проявления заболевания менее выражены у мальчиков), аномалии развития мочеполовой системы, выявленные при ультразвуковом исследовании, а также как вспомогательный анализ при пренатальной диагностике некоторых генетических синдромов.

В Великобритании неинвазивная диагностика пола плода с 2006 года рутинно проводится в комплексе мероприятий по проведению пренатальной диагностики перечисленных выше заболеваний, более 250 случаев неинвазивной диагностики пола плода ежегодно. 82% составляют случаи семей,отягощенных тяжелыми X-сцепленными заболеваниями (миодистрофия Дюшенна, гемофилия и т.д.). При определении женского пола плода, инвазивные процедуры, как правило, не проводятся (в 45% случаев). 11% диагностик осуществляются в семьях с ВГКН, в 3% случаев проведение диагностики связано с аномалиями развития [29]. Расчет стоимости проведения исследования в случае семей с ВГКН и тяжелыми X-сцепленными наследственными заболеваниями показал, что проведение неинвазивной диагностики пола плода несколько удешевляет проведение пренатальной диагностики и снижает риск потери беременности за счет отказа в 32–45% случаев от проведения диагностических процедур, связанных с получением плодного материала [29].

Диагностика пола плода по медицинским показаниям также должна быть выполнена как можно раньше, чтобы в случае необходимости инвазивной пренатальной диагностики она могла быть закончена в I триместре.

На рынке достаточно давно существуют компании, производящие тест-системы (direct-to-

consumer, непосредственно потребителю) для неинвазивного определения пола плода. Услуги некоторых из них доступны в России ([http://www.testgenom.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=22&Itemid=41](http://www.testgenom.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=22&Itemid=41)). Следует отметить, что, как правило, эти компании не занимаются медицинской диагностикой, и не несут юридической ответственности в случае выдачи некорректных результатов. При несовпадении ожидаемого по результатам диагностики пола ребенка с реальным, компания гарантирует возврат стоимости анализа. Такое предприятие может быть коммерчески успешным при хотя бы 90% точности анализа (декларируется точность диагностики более 95%).

В 2011 году в России появились отечественные тест-системы для неинвазивной диагностики пола плода, изготавливаемые в г. Самаре компанией «Ген-Технология». Эти наборы имеют необходимые для применения в клинике сертификаты и регистрационные удостоверения. Себестоимость одного исследования (без учета расходных материалов и трудозатрат) в 2011 году составляла 685–822 рубля. В сопроводительных документах заявляется о 100% воспроизводимости результатов и 100% специфичности при работе с мужской и женской ДНК. По результатам представленных производителем клинических испытаний, тест-системы для диагностики пола плода (срок беременности от 7 до 30 недель) имеют точность около 96%. Мы провели анализ пола плода в 16 образцах крови беременных (срок 12–21 неделя беременности) с использованием тест-системы «ДНК-пол ребенка плюс». Забор крови производился перед проведением биопсии плодного материала. Генетический пол плода устанавливался цитогенетическими или молекулярными методами по материалу хориона, плаценты или амниоцитам. Для выделения ДНК использовали наборы «ДНК-сорб-В» производства ЦНИИ эпидемиологии (Москва), как рекомендовано производителем тест-системы. В одном случае нам не удалось выделить достаточного для анализа количества ДНК. Были правильно выявлены все плоды мужского пола (10 из 16), и три плода женского пола. Еще в двух случаях у женщин, беременных плодами женского пола, регистрировался сигнал, соответствующий Y-хромосоме (ложноположительный результат). Таким образом, точность диагностики пола плода, по нашим данным, составила 87%. Возможно, что применение других наборов для выделения ДНК может способствовать увеличению специфичности анализа.

Мы провели неинвазивную диагностику пола плода у 43 беременных по методике Ло с соавторами [39], используя критерии оценки результатов, указанные в работе Леглера с соавтора-

ми [45]. Наличие последовательности гена *SRY* изучено в образцах плазмы крови, полученных перед инвазивной пренатальной диагностикой на сроке от 10 до 23 недель беременности. ДНК из 800 мкл плазмы выделяли с помощью набора Diatom DNAPrep (Биоком, Россия). В результате выделения получено по 50 мкл р-ра ДНК. Для проведения ПЦР в реальном времени в каждую реакцию вносили 5 мкл раствора ДНК. ПЦР проводили в объеме 50 мкл. Для анализа гена *SRY* ставили 6 повторностей, для контроля выделения ДНК анализировали содержание последовательностей гена *HBB* (бета-глобина) в трех повторностях. В пяти случаях (у 4 беременных плодом мужского пола и двух беременных плодом женского пола) был получен неопределенный результат. Все 13 плодов мужского пола были идентифицированы правильно; в 2 случаях из 24 женщин, беременных плодом женского пола, был получен ложно-положительный результат. Таким образом, мы смогли провести анализ в 86% случаев. Чувствительность диагностики составила 100%, а специфичность — 92%.

По данным мета-анализа публикаций ведущих центров, чувствительность метода неинвазивной диагностики пола плода (определяемая как отношение истинно-положительных к сумме истинно-положительных и ложно-отрицательных результатов, т. е. способность теста выявлять плоды мужского пола) составляет 95,3%. Примерно у 4% беременных наблюдается крайне низкая концентрация ДНК в плазме крови, и у них подобная диагностика при существующих подходах в принципе невозможна. Специфичность анализа (определяемая как отношение истинно-отрицательных результатов к сумме истинно-отрицательных и ложно-положительных), то есть его способность не идентифицировать девочек как мальчиков, в сертифицированных лабораториях составляет 98,5% [29].

Одни из наилучших показателей чувствительности и специфичности неинвазивной пренатальной диагностики пола плода достигнуты в Великобритании. В Лондоне, в North-East Regional Molecular Genetics Laboratories, в настоящее время точность ее составляет 99,5% (401/403 правильных ответов) [29]. Диагностика пола плода проводится по медицинским показаниям по следующей методике.

1. Анализ возможен начиная с 7 недель беременности; у каждой пациентки берется по два образца крови из вены в пробирки по 10 мл или 5 пробирок по 4 мл; при этом, если срок беременности на момент обращения составляет менее 9 недель, образцы крови получают с интервалом в 1 неделю; при обращении на сро-

ке 9 недель и более, оба образца получают одновременно.

2. Выделяют два образца ДНК ручным методом, используя набор Qiagen MinElute Virus spin kit; лучшие результаты дает выделение ДНК с набором QIAamp Circulating Nucleic Acid [20], но он пока не используется в рутинной диагностике. Из 800 мкл плазмы получают 75 мкл раствора ДНК.
3. Подготовленные два образца анализируют одновременно, проводя ПЦР в реальном времени для выявления генов *SRY* (анализ пола плода) и *CCR5* (контроль выделения ДНК). Всего ставят 58 реакций:
  - 8 повторностей ген *SRY* образец 1 (5 мкл р-ра ДНК на реакцию);
  - 8 повторностей ген *SRY* образец 2 (5 мкл р-ра ДНК на реакцию);
  - 3 повторности ген *SRY* отрицательный контроль (вода);
  - 3 повторности ген *SRY* отрицательный контроль (женская ДНК 0,1 нг);
  - 3 повторности ген *SRY* положительный контроль (мужская ДНК 0,1 нг);
  - 3 повторности ген *CCR5* образец 1 (5 мкл р-ра ДНК на реакцию);
  - 3 повторности ген *CCR5* образец 2 (5 мкл р-ра ДНК на реакцию);
  - 3 повторности ген *CCR5* отрицательный контроль (вода).

Кроме того, в каждой постановке строят калибровочную кривую для проверки параметров РВ-ПЦР для генов *SRY* и *CCR5*. Для калибровочной кривой используют мужскую ДНК в количестве 100 нг; 10 нг; 1 нг и 0,1 нг, по три повторности для каждой точки. Калибровочная кривая, полученная в результате эксперимента, должна удовлетворять следующим требованиям: наклон (slope) от 3,1 до 3,9; корреляция между *Ct* и концентрацией ДНК (*R*-value) не менее 0,98. При отсутствии сигнала амплификации гена *SRY* в отрицательном контроле и в опытных образцах делается вывод о женском поле плода; при наличии сигнала (*Ct* < 38) в 4 и более повторностях плод диагностируется как мужской. Если сигнал регистрируется менее, чем в 4 повторностях, наблюдается большой разброс значений *Ct* в повторностях (более 1,5) или значение *Ct* больше 38, делается вывод о неопределенном (inconclusive) результате анализа, и исследование повторяют, начиная с выделения ДНК. Приблизительно 1 из 12 анализов нуждается в повторении; в некоторых случаях определенный ответ не удается получить. Очевидно, что такой анализ не может быть дешевым. Себестоимость исследования, проведенного по описанной методике, составля-

ет в Великобритании приблизительно 250 фунтов [21].

Таким образом, неинвазивная диагностика пола плода по периферической крови матери в первом триместре беременности может проводиться двумя принципиальными способами. Первый — сравнительно недорогое исследование с небольшим количеством контролей и повторностей (в тест-системе производства компании «ДНК-технология» предусмотрена 1 повторность для отрицательного контроля и 1 для опытного образца), дающее ответ с точностью от 90 до 96%, или весьма дорогостоящий анализ с тщательной системой контроля и точностью свыше 99%, который, однако, в 2–3% случаев не дает определенного ответа.

### Диагностика резус-фактора плода

Около 15% людей белой расы имеют отрицательный резус-фактор. Практически все они гомозиготны по делеции гена *RHD*. Лица с положительным резус-фактором имеют одну или две копии этого гена (у представителей негроидной расы распространены другие аллели гена *RHD*, что необходимо учитывать при молекулярной диагностике резус-фактора). В том случае, когда резус-отрицательная женщина беременна резус-положительным плодом, возможно развитие иммунного ответа материнского организма на эритроциты плода. Аллоиммунизация против эритроцитарного D-антигена является наиболее частой причиной гемолитической болезни (ГБ) плода и новорожденных у людей белой расы и развивается у одной из 20–25 резус-отрицательных беременных, имеющих резус-положительного мужа. До 60 годов XX века эта патология была причиной гибели одного из 2 200 новорожденных. Проведение профилактических мероприятий, связанных с введением анти-D-иммуноглобулина во время беременности и после родов, позволило десятикратно снизить это значение [35].

В настоящее время все беременные, имеющие отрицательный резус-фактор при положительном резус-факторе супруга, в течение беременности обследуются на наличие и титр анти-D-антител. При наличии сенсибилизации, женщина попадает в группу риска развития ГБ плода, и на протяжении всей беременности проходит наблюдение и, при необходимости, лечение. В том случае, когда антитела не выявляются, стандартно проводят мероприятия по предотвращению иммунизации. С этой целью на 28-й неделе беременности всем резус-отрицательным женщинам вводят препарат анти-D-иммуноглобулина внутримышечно. В течение суток после родов препарат повторно вводят пациенткам, родившим резус-положительных

детей. Иммуноглобулин также вводится несенсибилизированным резус-отрицательным женщинам в случае угрозы прерывания беременности, сопровождающейся наличием кровяных выделений из половых путей, независимо от срока гестации; при прерывании внематочной беременности при сроке более 13 недель; после любых инвазивных процедур (биопсии хориона, амниоцентеза, кордоцентеза); при получении травмы брюшной полости во время беременности. Антитела выводятся из кровотока немногочисленные клетки плода, предотвращая, таким образом, образование антител. Анти-D-иммуноглобулин производится из плазмы крови иммунизированных доноров; он дорог и его введение связано с некоторым риском передачи инфекций; кроме того, при его введении отмечается незначительное число побочных эффектов [35].

Работы по успешному выявлению последовательностей гена *RHD* плода в крови резус-отрицательных женщин появились сразу после доказательства возможности проведения неинвазивной диагностики по периферической крови беременной [39]. В настоящее время в рутинную практику некоторых европейских стран введено исследование крови сравнительно небольшого числа сенсибилизированных беременных женщин с целью выявления среди них группы высокого риска по развитию гемолитической болезни (т.е. беременных резус-положительным плодом). Активно обсуждается также вопрос о возможности и необходимости внедрения в рутинную практику проверки всех резус-отрицательных женщин для решения вопроса о необходимости введения им анти-D-иммуноглобулина [42]. По статистике, среди людей белой расы в 38% случаев резус-отрицательная беременная вынашивает резус-отрицательный плод, и в этом случае необходимость в иммунопрофилактике ГБ отсутствует [35].

Определение резус-принадлежности плода представляется менее сложной задачей, чем диагностика пола плода, поскольку в этом случае нет необходимости проводить анализ в I триместре беременности. По результатам мета-анализа, точность неинвазивной диагностики резус-фактора оценивается в 94,8%, однако разброс значений между лабораториями весьма велик (от 90 до 100%) [35]. Некоторые исследователи рекомендуют с осторожностью относиться к отрицательным результатам тестов, проведенных до 12-й недели беременности [26]. Как и при диагностике пола плода, в большой степени точность анализа зависит от выбранной стратегии. Так, применение развернутой системы контроля, большого числа повторностей и анализ одновременно нескольких экзонов гена *RHD*, позволил

некоторым авторам достичь точности диагностики 99,8% [40]. Такой подход оправдан при проведении диагностики в группе сенсibilизированных беременных. Для решения вопроса о необходимости введения иммуноглобулина допустимо применение более дешевых и несколько менее точных подходов к проведению анализа. Для стран Евросоюза показано, что при стоимости неинвазивной диагностики 26,5 евро и менее, проведение ее у всех резус-отрицательных беременных для решения вопроса о необходимости введения анти-D-иммуноглобулина экономически оправдано [35].

В 2007 году на рынке появился первый коммерческий кит для определения резус-принадлежности плода [26] — Free DNA Fetal Kit RhD, производство Institute de Biotechnologies Jaques-Boy, Реймс, Франция. Описание набора, принцип его работы, результаты испытаний и методика проведения анализа доступны на сайте [http://www.biotechjboy.com/biologie\\_moleculaire/biologie\\_moleculaire\\_eng.htm](http://www.biotechjboy.com/biologie_moleculaire/biologie_moleculaire_eng.htm). Определение резус-фактора плода рекомендуется проводить после 12 недель беременности; отрицательный результат, полученный на сроке до 18 недель рекомендуется рассматривать как вероятный, и в этом случае необходимо повторить исследование на более позднем сроке. При использовании данного кита проводится анализ трех экзонов гена *RHD* (5, 7 и 10). Для контроля качества выделения ДНК в образцы плазмы добавляют небольшое количество экзогенной ДНК (кукурузы), и проводят ПЦР для контроля ее наличия в образцах выделенной ДНК. Себестоимость анализа с использованием этого кита в Великобритании составляет 46,5 фунтов при однократной диагностике, и более 65 фунтов при проведении уточняющей диагностики при выявлении отрицательного резус-фактора плода [42].

Российская компания «Ген-технология» также производит тест-системы для определения резус-фактора плода. С набором и инструкцией по применению можно ознакомиться на сайте компании <http://testgen.ru>. Проводится анализ двух экзонов гена *RHD* в одной повторности с минимальным количеством положительных и отрицательных контрольных образцов. Себестоимость одного анализа составляет 1370–1570 руб., заявленная точность диагностики — 98%.

### Перспективы неинвазивной пренатальной диагностики

Наиболее частым показанием для проведения инвазивных вмешательств является необходимость выявления наиболее распространенных хромосомных болезней, обусловленных дисбалансом

хромосом 13, 18, 21 и X. Существующие скрининговые неинвазивные методы (анализ маркерных белков в сыворотке крови матери, ультразвуковое исследование), являются косвенными, и, несмотря на значительный прогресс в этой области, в лучшем случае позволяют сформировать группу женщин высокого риска по наличию плодов с трисомией 21 и другой хромосомной патологией [1].

На первый взгляд, диагностика фетальных анеуплоидий по вкДНК плазмы крови беременной практически неосуществима. Действительно, очень небольшое количество вкфДНК плода в материнской плазме находится в смеси с многократно превосходящим количеством вкДНК матери (1); учитывая, что трисомии у плода имеют преимущественно материнское происхождение, последовательности ДНК непарных хромосом будут в большинстве случаев одинаковы у матери и плода (2).

Однако в настоящее время предложено несколько подходов, позволяющих в перспективе проводить неинвазивную пренатальную диагностику распространенных хромосомных болезней. Один из них — количественный анализ выделенной из плазмы РНК для оценки уровня экспрессии плацентоспецифичных генов, локализованных на 13-й, 18-й и 21-й хромосомах [19]. Другой основан на том факте, что последовательности вкфДНК плода, циркулирующие в плазме крови беременной, имеют преимущественно плацентарное происхождение, а вкДНК матери образуются в основном из гемопоэтических клеток. Эпигенетические межтканевые различия, например особенности метилирования некоторых локусов, предлагается использовать для выделения и анализа последовательностей ДНК фетального происхождения [28, 13]. Анализ метилированных последовательностей проводят разными методами. Один из них — это бисульфидная конверсия ДНК и затем количественная (как вариант — цифровая, digital) ПЦР со специфичными к метилированным последовательностям праймерами [28]. Другой — обработка вкДНК метилчувствительными или метилзависимыми рестриктазами, с последующей количественной ПЦР генов плода. Выявленное увеличение числа копий генов, расположенных на хромосомах 13, 18 и 21 по сравнению с контролем, будет указывать на хромосомную патологию плода.

Весьма убедительными являются результаты авторов, использующих для анализа вкДНК метод параллельного геномного секвенирования (massively parallel shotgun sequencing (MPSS)) [27, 25]. Ehrich с соавторами использовали следующий подход. Выделяли ДНК из 4 мл плазмы крови беременных, используя QIAamp Circulating Nucleic Acid kit (Qiagen). Поскольку вкДНК яв-



ляется низкомолекулярной, ее непосредственно использовали для приготовления библиотек фрагментов ДНК. На одной панели анализировали одновременно 4 библиотеки, при этом каждая библиотека содержала свою синтетическую олигонуклеотидную последовательность, которая работала как штрих-код, позволяющий идентифицировать происхождение фрагмента ДНК. При каждом запуске секвенатора (Illumina) можно анализировать параллельно 8 панелей, содержащих смесь четырех библиотек, то есть 32 образца вкДНК. Процесс секвенирования продолжается 2 дня, и его результатом для каждой библиотеки является последовательность 5 миллионов фрагментов ДНК. Длина каждого прочтения составляет 36 нуклеотидов, что суммарно составляет примерно 6% генома человека.

Затем полученные данные обрабатывают, соотнося с референсной последовательностью, в результате чего определяется хромосомная локализация каждого фрагмента. В норме доля секвенированных фрагментов пропорциональна длине соответствующей хромосомы. Так, обычно 8,5% всех прочитанных последовательностей принадлежат хромосоме 1, в то время как к хромосоме 22 относятся только 1,2% всех фрагментов, а к 21-й хромосоме — 1,35%. В случае трисомии у плода в общем пуле вкДНК содержится несколько большее количество генетического материала, соответствующего лишней хромосоме. Для диагностики синдрома Дауна доля прочтений, принадлежащих 21 хромосоме, сравнивается с результатами (среднее и SD), полученными ранее для образцов с эуплоидными беременностями. Если различия в представленности фрагментов этой хромосомы между тестируемым образцом и средним значением, полученным для эуплоидных беременностей, превышает 2,5 SD, образец идентифицируется как содержащий избыточный материал 21-й хромосомы. Этим методом авторами были проанализированы 480 образцов плазмы крови беременных. Корректные результаты удалось получить для 449 образцов. Все 39 случаев синдрома Дауна были выявлены, чувствительность метода составила 100%; в 1 случае из 410 нормальных беременностей был получен ложно-положительный результат.

В другой работе [27], при анализе 314 беременностей трисомия по 21-й хромосоме была выявлена со 100% специфичностью и чувствительностью 97,9% (при использовании одного из протоколов).

Таким образом, создается впечатление, что метод параллельного геномного секвенирования может эффективно решать проблему неинвазивной пренатальной диагностики трисомий. В настоящее время применение этого метода в рутинной

клинической практике маловероятно из-за высокой стоимости оборудования и расходных материалов. Тем не менее, коммерческий вариант данного теста (Materni T 21), выпущенный на рынок фирмой Sequenom (Сан-Диего, Калифорния) уже получил официальное одобрение в США в октябре 2011 г. Международное общество пренатальной диагностики [ISPD, 2011] рекомендовало использование данного метода в качестве продвинутого (advanced) скринингового теста для женщин группы высокого риска по рождению детей с болезнью Дауна со следующими уточнениями: тест пригоден только для диагностики синдрома Дауна (1); он не гарантирует 100%-ю точность (2) при наличии позитивного результата теста рекомендуется подтверждающая диагностика инвазивными методами (3); тест может быть неинформативным; (4); он не пригоден для женщин с низким риском синдрома Дауна у плода (5). Данный тест уже используется в Китае и, по-видимому, скоро будет применяться в Европейских странах.

В последнее время метод глубокого параллельного секвенирования, разработанный первоначально только для болезни Дауна (трисомия 21-й хромосомы) получил дальнейшее развитие и для неинвазивной диагностики трисомий по другим хромосомам [30]. Хотелось бы надеяться, что в недалеком будущем он окажется доступным и в нашей стране. Уместно, однако, заметить, что учитывая сложность метода, достаточно высокую стоимость (около 2000\$) и серьезные ограничения в окончательной точности (ложноположительные результаты, случаи неинформативности) он еще неопределенно долго останется в числе «продвинутых» скринирующих тестов. Это означает, что в случае положительного результата неинвазивным методом всегда будет проводиться уточняющая инвазивная пренатальная диагностика с целью кариотипирования плода.

## Литература

1. Баранов В. С., Айламазян Э. К. Современные алгоритмы пренатальной диагностики наследственных болезней: методические рекомендации. — СПб., Изд-во Н-Л, 2009. — 116 с.
2. Токарева А. Г. Исследование фетальной и материнской ДНК при нормальной беременности и при нарушениях развития плода: дис... канд. биол. наук. — Томск, 2006.
3. Шилова Н. В. Клетки плода в крови матери // Мед. генетика. — 2002. — № 1. — С. 57–64.
4. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing / Fan H. C. [et al.] // Clin. Chem. — 2010. — Vol. 56, N 8. — P. 1279–1286.
5. Application of fetal DNA detection in maternal plasma: a prenatal diagnosis unit experience / González-González C. [et al.] // J. Histochem. Cytochem. — 2005. — Vol. 53, N 3. — P. 307–314.

6. *Bianchi D.W.* Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential // *Placenta*. — 2004. — Vol. 25. — P.93–101.
7. *Bianchi D.W., Zickwolf G.K., Weil G.J.* Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum // *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*. — 1996. — Vol. 93. — P. 705–708
8. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors / Tamkovich S.N. [et al.] // *Clin. Chem.* — 2005 — Vol. 51 — P. 1317–1319.
9. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women / van Wijk I.J. [et al.] // *Clin. Chem.* — 2000 — Vol. 46 — P. 729–731.
10. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats / Pertl B. [et al.] // *Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 106. — P. 45–49.
11. Effect of formaldehyde treatment on the recovery of cell — free fetal DNA from maternal plasma at different processing times / Zhang Y. [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* — 2008. — Vol. 397. — P. 60–64.
12. Effects of blood processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma / Chiu R. W. K. [et al.] // *Clin. Chem.* — 2001. — Vol. 47. — P. 1607–1613.
13. Epigenetic-genetic chromosome dosage approach for fetal trisomy 21 detection using an autosomal genetic reference marker / Tong Y. K. [et al.] // *PLoS One* — 2010 — Vol. 20. — E. 15244.
14. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum / Honda H. [et al.] // *Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 110. — P. 75–79.
15. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR / Costa J. M. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 2001. — Vol. 21. — P. 1070–1074.
16. *Holzgreve W., Hahn S.* Fetal cells in cervical mucus and maternal blood // *Bail. Clin. Obstet. Gynecol.* — 2000. — Vol. 14. — P. 709–722.
17. *Hristoskova S., Holzgreve W., Hahn S.* More than one-half of the erythroblasts in the fetal circulation and cord blood are TUNNEL positive // *Clin. Chem.* — 2001. — Vol. 47. — P. 1870–1871.
18. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis / Chan K. C. [et al.] // *Clin. Chem.* — 2006. — Vol. 52, N 12. — P. 2211–2218.
19. Identification of universal mRNA markers for noninvasive prenatal screening of trisomies / Picchiassi E. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 2010. — Vol. 30, N 8. — P. 764–770.
20. Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield / Barrett A. N. [et al.] // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6, N 10. — E. 25202.
21. Incremental cost of non-invasive prenatal diagnosis versus invasive prenatal diagnosis of fetal sex in England / Hill M. [et al.] // *Prenat Diagn.* — 2011. — Vol. 31, N.3 — P. 267–273.
22. *Landy H.J., Keith L.G.* The vanishing twin: a review // *Hum. Reprod. Update*. — 1998. — Vol. 4, N 2. — P.177–183.
23. *Li Y., Zimmerman B., Rusterholtz C.* Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms // *Clin. Chem.* — 2004. — Vol. 50. — P. 1002–1011.
24. *Lo Y.M.D.* Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2001. — P. 945.
25. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting / Ehrich M. [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 2011. — Vol. 204, N 3. — P. 1–11.
26. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD / Rouillac-Le Sciellour C. [et al.] // *Transfus. Clin. Biol.* — 2007. — Vol. 14, N 6. — P. 572–577.
27. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study / Chiu R. W. [et al.] // *BMJ*. — 2011. — Vol. 11. — P. 342.
28. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations / Tong Y. K. [et al.] // *Clin. Chem.* — 2006 — Vol. 52, N 12 — P. 2194–2202.
29. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice / Hill M. [et al.] // *Clin. Genet.* — 2011. — Vol. 80, N 1 — P. 68–75.
30. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing / Chen E. Z. [et al.] // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6, N 7. — E. 21791.
31. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA / Tsui N. B. [et al.] // *Blood*. — 2011. — Vol. 117, N 13 — P. 3684–3691.
32. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma / Lun F. M. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. — 2008. — Vol. 16, N 105. — P.19920–19925.
33. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma / Lo Y. M. [et al.] // *N. Eng. J. Med.* — 1998. — Vol. 399. — P. 1734–1738.
34. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma / Aminucci P. [et al.] // *Clin. Chem.* — 2000. — Vol. 46. — P. 301–302.
35. Prenatal RhD Testing: A Review of Studies Published from 2006 to 2008 / Legler T. J. [et al.] // *Transfus Med. Hemother.* — 2009. — Vol. 36, N 3. — P.189–198.
36. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum / Lo Y. M. [et al.] // *Lancet*. — 1997. — Vol. 350. — P. 485–487.
37. Quantification and application of the placental epigenetic signature of the RASSF1A gene in maternal plasma / Zhao F. [et al.] // *Prenat Diagn.* — 2010. — Vol. 30, N 8 — P. 778–782.
38. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma / Lee T. H. [et al.] // *Transfusion*. — 2001. — Vol. 41. — P. 276–282.
39. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis / Lo Y. M. [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 62, N 4. — P. 768–775.

40. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium / Minon J.M. [et al.] // *Transfusion*. — 2008. — Vol. 48, N 2. — P. 373–381.
41. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma / Chan K.C.A. [et al.] // *Clin. Chem.* — 2004. — Vol. 50. — P. 88–92.
42. *Szczepura A., Osipenko L., Freeman K.* A new fetal RHD genotyping test: costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales // *BMC Pregnancy Childbirth*. — 2011. — Vol. 18. — P. 11–15.
43. Testing normality of fetal DNA concentration in maternal plasma at 10–12 completed weeks gestation: a preliminary approach to a new marker for genetic screening / Farina A. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 2002. — Vol. 22. — P. 148–152.
44. Use of bi-allelic insertion/deletion polymorphisms as a positive control for fetal genotyping in maternal blood: first clinical experience / Page-Christiaens G.C. [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2006. — Vol. 1075. — P. 123–129.
45. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma / Legler T.J. [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 2007. — Vol. 27, N 9. — P. 824–829.
46. *Zolotukhina T.V., Shilova N.V., Voskoboeva E.Y.* Analysis of cell-free fetal DNA in plasma and serum of pregnant women // *J. Histochem. Cytochem.* — 2005 — Vol. 53, N 3 — P. 297–299.

#### NONINVASIVE PRENATAL DIAGNOSTIC. PROBLEMS, APPROACHES AND PERSPECTIVES.

Malysheva O. V., Baranov V. S.

■ **Summary:** In the review possibilities of noninvasive prenatal diagnostics on DNA of a fetus circulating in peripheral blood of pregnant woman are discussed. Characteristics cell-free (cf) DNA of plasma and fetus cfDNA (cffDNA), circulating in a parent blood-groove are resulted. Methodical approaches to extraction and analysis cffDNA are considered. Possibilities and restrictions of application of a method for fetal sexing and fetal Rhesus factor detection, and also prospect of noninvasive diagnostics of the most frequent aneuploidies are discussed.

■ **Key words:** noninvasive prenatal diagnostic; cell free fetal DNA; fetal sexing; fetal rhesus; prenatal diagnostic of aneuploidies.

#### ■ Адреса авторов для переписки

*Мальшиева Ольга Викторовна* — врач-лаборант-генетик, кандидат биологических наук. Диагностический центр (медико-генетический), СПб, ул.Тобольская д. 5. Лаборатория пренатальной диагностики ФГБУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» СЗО РАМН 199034, СПб., Менделеевская линия, д.3.

*Баранов Владислав Сергеевич* — заведующий Лабораторией пренатальной диагностики врожденных и наследственных заболеваний, д. м. н., член-корр. РАМН, профессор ФГБУ «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» СЗО РАМН 199034, СПб., Менделеевская линия, д. 3.

**E-mail:** baranov@VB2475.spb.edu.

*Malysheva Olga V.* — Diagnostic center of medical genetics, SPb, 5, Tobolskaya st.; Laboratory of prenatal diagnostic, D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Northwest Branch of the Russian Academy of Medical Sciences 199034, Saint-Petersburg, Mendeleevskaya liniya, 3.

*Baranov Vladislav S.* — professor, chief of the Laboratory for Prenatal Diagnosis, D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Northwest Branch of the Russian Academy of Medical Sciences 199034, Saint-Petersburg, Mendeleevskaya liniya, 3.

**E-mail:** baranov@VB2475.spb.edu.