

Оглавление

Предисловие к изданию на русском языке	11
Предисловие к изданию на английском языке	12
Участники издания	15
Список сокращений и условных обозначений	19
Глава 1. Введение (Ю.М. Деннис Ло)	21
Список литературы ☞ ⁺	22
Глава 2. Краткая история и перспективы неинвазивной пренатальной диагностики (Джан Карло ди Ренцо, Арун Мейяжаган, Валентина Цибизова)	23
2.1. Введение	23
2.2. Хронология развития пренатальной диагностики	25
2.3. Типы неинвазивного пренатального тестирования, используемые на сегодняшний день	30
2.4. Сложности неинвазивного пренатального тестирования в диагностике моногенных заболеваний	32
2.5. Ограничения неинвазивного пренатального тестирования и обеспечение качества	34
2.6. Поиск фетальных клеток в материнской крови	35
2.7. Заключительные замечания	36
Список литературы ☞ ⁺	38

ЧАСТЬ I. КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА

Глава 3. Взаимосвязь между хромосомными аномалиями и моногенными заболеваниями (Арун Мейяжаган, Джан Карло ди Ренцо)	41
3.1. Введение	41
3.2. Генетические заболевания и их типы	42
3.3. Разница между хромосомной аномалией и моногенным дефектом	49
3.4. Факторы, влияющие на фенотипы моногенных заболеваний	50
3.5. Менделевские заболевания: являются ли они истинными моногенными заболеваниями?	52
3.6. Обследование на моногенные заболевания	55
3.7. Хромосомные аномалии, наблюдаемые при моногенных заболеваниях, на основе вовлеченных генов	62
3.8. Хромосомные аномалии или нестабильность хромосом как прогностические маркеры при моногенных заболеваниях	67
3.9. Заключение	68
Список литературы ☞ ⁺	68
Глава 4. Клиническое значение полиморфизма хромосом при врожденных заболеваниях (Арун Мейяжаган, Хариприя Кучи Бхотла, Маникантан Паппусвами, Валентина Цибизова, Картик Кумар Алагамутху, Джан Карло ди Ренцо)	69
4.1. Введение	69
4.2. Частота хромосомного полиморфизма при врожденных пороках	71
4.3. Выявление хромосомного полиморфизма	71

4.4. Исследования, связанные с хромосомными полиморфизмами	73
4.5. Заключение	75
Список литературы @+	75
Глава 5. Плацентарная генетика. Плодово-плацентарная дискордантность кариотипов: проблемы пренатальной генетической диагностики	
(<i>Мириам Туриэль-Миранда, Хосе Луис Барта</i>)	76
5.1. Введение	76
5.2. Биология в основе фетоплацентарного мозаицизма	77
5.3. Пренатальная диагностика ограниченного плацентарного мозаицизма	79
5.4. Прогноз при ограниченном плацентарном мозаицизме: исходы беременности	81
Список литературы @+	84
Глава 6. Основа дилеммы генетического скрининга и тестирования	
(<i>Дэвид В. Бритт, Шара М. Эванс, Марк И. Эванс</i>)	85
6.1. Введение	85
6.2. Основы современных подходов	86
6.3. Влияние более широкого контекста	90
6.4. Индивидуальные факторы	94
6.5. Сеанс диадического консультирования	98
6.6. Перспективы общественного здравоохранения	102
6.7. Изменения в ситуации с ограничениями доступности искусственного прерывания беременности	103
6.8. Выводы	104
Список литературы @+	104
Глава 7. Эпидемиология врожденных пороков развития у близнецов	
(<i>Петя Чавеева, Мария дель Мар Гил, Кипрос Геродотос Николаидес</i>)	105
7.1. Введение	105
7.2. Ультразвуковое исследование в I триместре при беременности двойней	107
7.3. Маркеры структурных дефектов в I триместре	108
7.4. Врожденные пороки развития при монохориальной беременности	110
7.5. Выводы	116
Список литературы @+	117
Глава 8. Скрининг на анеуплоидии при многоплодной беременности	
(<i>Мария дель Мар Гил, Петя Чавеева, Кипрос Геродотос Николаидес</i>)	118
8.1. Введение	118
8.2. Эффективность и клинические аспекты различных методов скрининга	121
8.3. Выводы	126
Список литературы @+	126
ЧАСТЬ II. НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА	
Глава 9. Врожденные аномалии: роль ультразвуковой диагностики	
(<i>Валентина Цибизова, Татьяна Первунина, Вероника Артеменко, Арун Мейяжаган, Грациано Клеричи</i>)	129
9.1. Введение	129
9.2. Маркеры хромосомных аномалий	129
9.3. Аномалии, выявляемые в I триместре	131
9.4. Нехромосомные аномалии	132
Список литературы @+	141

Глава 10. Частые осложнения и методы скрининга на ранних сроках беременности (Арун Мейяжаган, Хариприя Кучи Бхотла, Маникантан Паппусвами, Джан Карло ди Ренцо)	142
10.1. Введение	142
10.2. Некоторые гематологические осложнения	143
10.3. Некоторые урогинекологические осложнения	145
10.4. Сахарный диабет беременных (гестационный)	146
10.5. Вирусные инфекции	146
10.6. Скрининг на ранних сроках беременности	146
10.7. Заключение	148
Список литературы @+	148
Глава 11. Скрининг I триместра на распространенные и редкие хромосомные аномалии, а также на пороки развития: какие тесты следует сочетать? (Карл Оливер Каган)	149
11.1. Введение	149
11.2. Риски дефекта плода и хромосомных аномалий	150
11.3. Комбинированный скрининг I триместра	150
11.4. Скрининг по внеклеточной ДНК плода	153
11.5. Тщательное исследование анатомии плода	155
11.6. Полезные сочетания комбинированного скрининга I триместра и анализа бесклеточной ДНК плода	156
11.7. Заключение	157
Список литературы @+	158
Глава 12. Технология неинвазивного пренатального тестирования на основе внеклеточной ДНК плода (Карен Уайт, Бодуэн Су, Рене Джонс, Эмилия Костенко, Франческа Романа Грати)	159
12.1. Принципы тестирования на основе внеклеточной ДНК плода	159
12.2. Преаналитическая обработка	160
12.3. Методы	160
12.4. Оценка фетальной фракции	166
12.5. Другие показатели качества	168
12.6. Биологические соображения	168
12.7. Заключение	169
Список литературы @+	170
Глава 13. Различные методы: сравнение эффективности, надежности и стоимости (Чжицзе Ян, Юйсян Ван, Джан Карло ди Ренцо)	171
13.1. Введение	171
13.2. Платформа цифровой полимеразной цепной реакции	172
13.3. Неинвазивное пренатальное тестирование на основе секвенирования нового поколения/массивного параллельного секвенирования	179
13.4. Другие платформы	194
13.5. Другие виды неинвазивных пренатальных тестов	197
13.6. Заключение	199
Список литературы @+	199
Глава 14. Консультирование до и после теста (Дик Оепкес)	200
14.1. Введение	200
14.2. Предтестовое консультирование	202
14.3. Послетестовое консультирование	214
Список литературы @+	220

Глава 15. Тестирование по внеклеточной ДНК плода при экстракорпоральном оплодотворении (Эмилия Матеу-Брулл, Нурия Балагер, Мария Гомес-Лопес, Карлос Симон, Мигель Милан)	221
15.1. Введение	221
15.2. Частота неудач при тестировании внеклеточной ДНК и фетальной фракции при использовании вспомогательных репродуктивных технологий по сравнению с естественным зачатием	223
15.3. Положительная прогностическая ценность анализа внеклеточной ДНК плода при беременности, наступившей с помощью вспомогательных репродуктивных технологий	224
15.4. Анализ по внеклеточной ДНК плода при многоплодной беременности	225
15.5. Анализ по внеклеточной ДНК плода и синдром исчезающего близнеца	226
15.6. Анализ по внеклеточной ДНК плода у пациенток, проходящих преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии	227
Список литературы @*	229
Глава 16. Редкие аутосомные трисомии и их значение в тестировании внеклеточной ДНК плода (Франческа Романа Грати, Питер Бенн)	230
16.1. Введение	230
16.2. Редкие аутосомные трисомии при спонтанном выкидыше	230
16.3. Редкие аутосомные трисомии в пренатальной диагностике	231
16.4. Генетическое консультирование при истинном фетальном и ограниченном плацентарном мозаицизме	234
16.5. Редкие аутосомные трисомии и внеклеточная ДНК: теоретические соображения	235
16.6. Частота редких аутосомных трисомий, выявленных во внеклеточной ДНК	235
16.7. Редкие аутосомные трисомии во внеклеточной ДНК: причины и клиническое значение	237
16.8. Моносомии, частичные дисбалансы и сложные дисбалансы	240
16.9. Клиническая тактика при выявлении редких аутосомных трисомий по неинвазивному пренатальному тестированию	241
Список литературы @*	243
Глава 17. Быстрое выявление менделевских нарушений у плода: талассемия и серповидноклеточная болезнь (Карен Лим, Махеш Чолани)	244
17.1. Неинвазивная пренатальная диагностика талассемии	245
17.2. Неинвазивная пренатальная диагностика серповидноклеточной болезни	251
17.3. Заключение	252
Список литературы @*	252
Глава 18. Неинвазивный пренатальный скрининг белка RhD плода у резус-отрицательных женщин для направленной анти-D-иммунопрофилактики (С. Эллен ван дер Шоот, Дик Оепкес)	253
18.1. Введение. Показания к неинвазивному определению резус-фактора плода	253
18.2. Преаналитические условия	256
18.3. Аналитические условия	257
18.4. Тесты на определение резус-фактора	258

18.5. Точность	261
18.6. Выводы	262
18.7. Практические рекомендации	262
Список литературы ☞+	263
Глава 19. Полногеномное тестирование на основе внеклеточной ДНК плода, его ограничения и перспективы (<i>Элиза Бевилакwa, Жак Жани</i>)	264
Список литературы ☞+	274
ЧАСТЬ III. КЛИНИЧЕСКАЯ ПРАКТИКА И СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ	
Глава 20. Разработка и предоставление медицинских услуг по неинвазивной пренатальной диагностике моногенных заболеваний (<i>Элизабет Скотчман, Джозеф Шоу, Натали Чандлер, Лин С. Читти</i>)	277
20.1. Общие сведения	277
20.2. Развитие неинвазивной пренатальной диагностики	278
20.3. Предоставление клинических услуг	283
20.4. Что мы можем ожидать от будущего	285
20.5. Заключение	288
Список литературы ☞+	288
Глава 21. Консультирование в быстро изменяющемся мире генетики (<i>С.М. Катя Билардо</i>)	289
21.1. Введение	289
21.2. Определение пренатального консультирования	289
21.3. Цель пренатального генетического скрининга/тестирования	289
21.4. В чем разница между скринингом и диагностическим тестированием?	290
21.5. История пренатальных скрининговых тестов на анеуплоидии	290
21.6. Где мы сейчас?	291
21.7. Что должна включать обычная предтестовая консультация?	291
21.8. Пренатальное тестирование на носительство	292
21.9. Пренатальный скрининг и диагностические тесты на анеуплоидию	292
21.10. Комбинированный тест и измерение толщины воротникового пространства	293
21.11. Неинвазивное пренатальное тестирование по внеклеточной ДНК	293
21.12. Какие скрининговые тесты и их комбинации нужны для выявления анеуплоидий?	294
21.13. Инвазивные диагностические тесты и лабораторные методы	295
21.14. Прогноз на будущее	297
Список литературы ☞+	298
Глава 22. Обнаружение хромосомных дефектов матери во время генетического тестирования плода (<i>Эми Туррифф, Диана В. Бьянки</i>)	299
22.1. Доброкачественные и злокачественные опухоли	299
22.2. Анеуплоидии половых хромосом у матери	307
22.3. Вариации числа копий матери	310
22.4. Плацентарный мозаицизм по аутосомной анеуплоидии и клональный гемопоэз	313
22.5. Другие заболевания матери	314
22.6. Пред- и послетестовое консультирование	315
22.7. Заключение и выводы	320
Список литературы ☞+	320

Глава 23. Пренатальное полногеномное секвенирование для исследования структурных аномалий плода: нужна ли неинвазивная пренатальная диагностика? (<i>Элизабет Уолл, Стефани Аллен, Джеймс С. Каслман, Марк Д. Килби</i>)	321
23.1. Генетическое исследование аномалий развития плода	321
23.2. Развитие пренатального экзомного секвенирования для клинической практики	323
23.3. Перспективы на будущее	334
23.4. Заключение	339
Список литературы @+	339
Глава 24. Взгляд на неинвазивное пренатальное тестирование в разных культурах (<i>Хазар Хайдар, Мари-Кристин Рой, Анн-Мари Лаберж, Вардит Равицкий</i>)	340
24.1. Введение	340
24.2. Канада	341
24.3. Китай	343
24.4. Ливан	345
24.5. Обсуждение	346
24.6. Заключение	347
Список литературы @+	347
Глава 25. Международные рекомендации по проведению неинвазивного пренатального тестирования на основе внеклеточной ДНК плода (<i>Мария Жозе Рего де Соуса, Маргарита Соуса, Мария Грасиэль Круз</i>)	348
25.1. Рекомендации	350
Список литературы @+	390
Глава 26. Общая характеристика и исторические перспективы преимплантационного генетического тестирования (<i>Джо Ли Симпсон, Светлана Речицки, Анвер Кулиев</i>)	391
26.1. Исторический обзор	391
26.2. Получение ДНК эмбриона	394
26.3. Уникальные стратегии, применимые только в преимплантационном генетическом тестировании на моногенные заболевания	396
26.4. Хромосомные транслокации (преимплантационное генетическое тестирование на структурные хромосомные перестройки)	400
26.5. Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии для увеличения частоты наступления беременности при экстракорпоральном оплодотворении	401
Список литературы @+	408
Предметный указатель	409

Предисловие к изданию на русском языке

Уважаемые коллеги!

Перед вами первое русскоязычное издание руководства по постоянно совершенствующейся, самой высокотехнологичной сфере перинатологии или медицины плода — «Пrenатальная диагностика хромосомных аномалий», написанного коллективом авторов под редакцией одного из авторитетнейших экспертов в области акушерства, гинекологии и перинатологии, иностранного члена-академика РАН Джана Карло ди Ренцо.

В начале XXI в. сложно было представить себе те возможности современной генетики, молекулярной медицины, биологии репродукции, которые привели к формированию основных понятий пренатальной диагностики, зачастую выходящие за рамки просто диагностических тестов и затрагивающие общечеловеческие, этические, культурологические и личностные проблемы, стоящие перед беременной и ее семьей при решении вопроса о здоровье их будущего ребенка.

Абсолютно уникальным и передовым стало открытие в 1997 г. Деннисом Ло и соавт. внеклеточной свободно циркулирующей ДНК плода в кровотоке матери, что создало основу для рождения нового направления в медицине плода — неинвазивного пренатального тестирования, служащего концептуально новым подходом к оценке хромосомного и генного благополучия ребенка. К написанию наиболее полного на сегодняшний день руководства были привлечены признанные эксперты в данной области, включающие и наших соотечественников.

Прекрасно иллюстрированное издание не только практически полностью освещает базисные понятия генетической диагностики и хромосомной патологии плода, но и подробно представляет хромосомный полиморфизм при врожденных заболеваниях, плодово-плацентарную дискордантность, особенности генетического неинвазивного скрининга при многоплодной беременности, саму технологию неинвазивного пренатального тестирования и сравнение различных методов и вариантов по клинической и диагностической эффективности, информативности, стоимости, организацию предтестового и послетестового консультирования, роль оценки ультразвуковых маркеров и эхографической анатомии плода, обнаружение хромосомных дефектов матери при использовании полногеномного секвенирования и возникающие при этом вопросы. Большой раздел посвящен сравнительному анализу существующих к настоящему времени международных и локальных протоколов/клинических рекомендаций/руководств по неинвазивному пренатальному тестированию. Полнота охвата практически всех аспектов этого тестирования с их сложностью, технологичностью и в то же время доступность изложения материала для практикующего врача сделают это руководство настольной книгой не только для врачей пренатальной диагностики, медицины плода, генетиков, но и акушеров-гинекологов и врачей смежных специальностей.

*Член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук,
профессор И.В. Игнатко*

Предисловие к изданию на английском языке



В предыдущем столетии многочисленные открытия в области генетики, технологий и их внедрение в пренатальную медицину произвели впечатляющий переворот в пренатальной диагностике. Выявление и профилактика пренатальных заболеваний раскрыли тайну, окружающую плод, и сняли завесу неприкосновенности, имевшуюся в прошлом.

Открытия, касающиеся системы мать—плацента—плод, способствовали возрастающему осознанию научным сообществом того аспекта, что многие проблемы ребенка и взрослого человека появляются еще до рождения. Внедрение методов косвенной (биохимической) и прямой (биофизической) оценок состояния плода позволило проводить адекватные исследования с помощью возрастающего количества технологий, основанных на заборе материала плода (амниоцентез, биопсия ворсин хориона, кордоцентез). В настоящее время стало возможным не только проводить сложную диагностику, но и в некоторых случаях прибегать к внутриутробному медикаментозному и/или хирургическому лечению.

Амниоцентез начали использовать только с середины 1960-х годов для выявления заболеваний плода путем спектрофотометрического анализа на билирубин в амниотической жидкости; таким образом оценивают тяжесть изоиммунизации по антигену RhD у плода. В этот же период впервые был определен хромосомный пол на культуре амниоцитов путем обнаружения телец Барра. Однако в 1970-х годах амниоцентез использовали очень ограниченно, поскольку он был сопряжен не только с высоким риском выкидыша и непомерно высокой стоимостью, но и с тем, что только женщин в позднем репродуктивном возрасте рассматривали как группу риска. Только в конце 1980-х годов был предложен новый, помимо амниоцентеза, подход к скринингу без риска, учитывающий не только возраст, но и концентрацию некоторых плодово-плацентарных факторов, присутствующих в периферической крови матери. В 1990-х годах была внедрена модель скрининга, учитывающая комбинацию возраста матери и толщины воротникового пространства в 11–14 нед беременности, и впоследствии было показано, что такой комбинированный скрининг

материнского возраста, толщины воротникового пространства и биохимических показателей материнской сыворотки крови (свободная β -субъединица хорионического гонадотропина человека и ассоциированный с беременностью плазменный белок А) в I триместре позволяет идентифицировать в ~85–90% случаев плод с синдромом Дауна.

Однако в период с середины 1980-х годов было обнаружено присутствие фетальных клеток в крови беременной. Их выделение для генетического тестирования произвело знаменательную революцию в проспективной пренатальной диагностике. В материнской крови были обнаружены различные типы фетальных клеток, и исследователи начали работать над идентификацией, отбором и генетическим анализом фетальных клеток, пригодных для пренатальной генетической диагностики.

Еще одна возможность неинвазивной пренатальной диагностики появилась в 1997 г., когда Деннис Ло и соавт. из Оксфорда показали наличие внеклеточной фетальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в материнской плазме и сыворотке крови. В результате исследований, последовавших за этим открытием, было доказано, что фетальная ДНК присутствует в материнском кровообращении с первых недель беременности и в количестве, большем по сравнению с ДНК, полученной из клеток плода. Более того, преимущество внеклеточной фетальной ДНК заключается в том, что она разрушается в течение нескольких часов после родов, поэтому не может помешать пренатальной диагностике при последующих беременностях.

С тех пор неинвазивное пренатальное тестирование на анеуплоидию плода с использованием бесклеточной фетальной ДНК было широко внедрено в рутинную акушерскую практику. Первоначально тесты на фетальную ДНК были нацелены на хромосомные aberrации, выявляемые традиционными методами пренатального скрининга: трисомия 21, трисомия 18 и трисомия 13. Вскоре сфера применения этой методики расширилась за счет панелей на анеуплоидии по половым хромосомам и микроделеции. Недавно стал доступен расширенный анализ генома на редкие аутосомные трисомии и серьезные хромосомные дисбалансы. Поскольку техническая возможность тестирования на наличие того или иного заболевания не всегда соотносится с клинической пользой для популяции или отдельных беременных, польза и негативные аспекты программ скрининга должны быть тщательно взвешены до их внедрения. В настоящее время научные данные о клинических преимуществах расширенного бесклеточного ДНК-тестирования недостаточны. Таким образом, расширенные клинические панели ДНК-тестирования создают дилемму для диагностики, лечения и консультирования пациентов, которая в настоящее время стала предметом серьезных дискуссий и требует проработки аспектов этики и эффективного распространения этой методики.

Впервые представленное в 2011 г. так называемое неинвазивное пренатальное тестирование (которое практически относится только к пренатальным тестам на основе внеклеточной ДНК плода) за 10 лет широко, хотя и неравномерно, распространилось по всему миру, и возникло множество проблем, связанных с его применимостью (особенно в странах с низким и средним уровнями дохода), стоимостью, надежностью (это относится в основном к некоторым домашним тестам, расплодившимся как грибы во многих частях

мира), консультированием до и после тестирования, этическими дилеммами, справедливостью доступа к технологиям и, наконец, «патентоспособностью» тестов. Все эти аспекты требовали разъяснения. Именно с этой целью и была задумана данная книга, чтобы дать читателю адекватное представление о методах, проблемах и их потенциальных решениях с помощью самых известных экспертов в этой области.

Несмотря на бесспорные успехи в области пренатальной диагностики, исследования непрерывно продолжаются с целью идентификации клеточного белкового маркера для выявления «лучшей» фетальной клетки в материнском кровотоке, которая была бы пригодна для пренатального генетического тестирования. Исследователи проводят эксперименты по экспрессии генов, используя инновационные технологии, такие как микрочипы и протеомные исследования, для выявления различий в экспрессии генов и/или белков между клетками плода и материнскими клетками.

Из этой картины видно, что, хотя достигнутые цели (использование бесклеточной ДНК плода для диагностики хромосом и генов плода в клинической практике многих стран) весьма значительны, многое еще предстоит сделать, и исследования всегда должны быть направлены на дальнейшее совершенствование технологий, чтобы помочь неинвазивной пренатальной диагностике стать новым «золотым стандартом», который, несомненно, изменит историю медицины матери и плода.

Я особенно признателен всем авторам-экспертам, которые согласились представить актуальные главы, посвященные нескольким аспектам этой важной и широко обсуждаемой темы, а также издательству, которое подготовило своевременную публикацию высокого уровня. Надеюсь, что она заинтересует многих и поможет читателям получить четкое представление о «новом» статусе и возможностях пренатальной генетической диагностики.

*Джан Карло ди Ренцо
Перуджа, Италия
Детройт, Массачусетс, США*

Глава 1

Введение

Ю.М. Деннис Ло



Прошло 24 года с момента первого сообщения о наличии внеклеточной фетальной ДНК в материнской плазме крови [1]. Таким образом, эта книга очень своевременна для подведения итогов достигнутого, поскольку область вступает в пору своего серебряного юбилея. Развитие неинвазивного пренатального тестирования (НИПТ) продемонстрировало важность инвестирования в фундаментальные научные исследования, в то время как мы продвигаем трансляционные и клинические исследования. К примеру, без информации о концентрации внеклеточной ДНК плода в разные сроки беременности [2] было бы трудно разработать НИПТ для выявления хромосомных анеуплоидий и моногенных заболеваний, при которых точность диагностики в значительной степени зависит от доли фетальной ДНК. Другой пример: без понимания клиренса внеклеточной фетальной ДНК после родов [3] будет трудно с уверенностью использовать НИПТ у многорожавших беременных. Поскольку циркулирующая фетальная ДНК поступает из плаценты, знания о биологии плаценты в конечном итоге помогут нам лучше понять образование, высвобождение и биофизические характеристики внеклеточной фетальной ДНК. В связи с этим мне особенно приятно видеть главу о плаценте в этом томе.

Очень рад видеть, что мои многочисленные коллеги и друзья внесли свой вклад в создание этой книги. Мне выпала честь сотрудничать с профессором Кипросом Николаидесом, профессором Ранджитом Аколекаром, профессором Россой Чиу в первом исследовании использования НИПТ при трисомии 21 (Т21) [4]. Очень хотелось бы также прочитать главу профессора Лин Читти о развитии НИПТ моногенных заболеваний. Профессор Л. Читти ранее сотрудничала с профессором Алленом Чаном в моей группе по использованию цифровой полимеразной цепной реакции (ПЦР) для этой цели [5]. Отмечу очень интересную главу доктора Дианы Бьянки о случайных

находках при НИПТ, которая связана с другим моим интересом к жидкой биопсии рака [6, 7]. Мне посчастливилось сотрудничать с доктором Д. Бьянки при наблюдении аберрантной концентрации внеклеточной ДНК плода в материнской плазме и сыворотке крови при трисомии 21 [8]. С нетерпением также жду возможности прочитать главы, написанные многими моими друзьями, включая профессора Ди Ренцо, профессора Юваля Ярона, доктора Марка Эванса, профессора Карлоса Саймона, профессора Махеша Чулани и профессора Джо Ли Симпсона и др. Наконец, я рад видеть, что, помимо научных и клинических применений, эта книга также охватывает этические, социальные и культурные аспекты НИПТ. В условиях быстрого развития науки и техники особенно важно рассматривать такие разработки в контексте человеческого общества и их этических, правовых и социальных последствий.

Список литературы



Глава 2

Краткая история и перспективы неинвазивной пренатальной диагностики

Джан Карло ди Ренцо, Арун Мейяжаган, Валентина Цибизова

Основные моменты

- НИПТ позволяет выявить специфические генетические аномалии плода уже на 10-й неделе беременности.
- Побочные эффекты и риск выкидыша отсутствуют.
- Метод обладает высокой чувствительностью при трисомиях, особенно T21, T13 и T18.
- В НИПТ используется внеклеточная фетальная ДНК из материнской крови.
- Ультразвуковые маркеры, такие как толщина воротникового пространства (ТВП) и биохимический профиль [β -субъединица хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ), ассоциированный с беременностью плазменный белок А (PAPP-A — от англ. pregnancy associated plasma protein A), ингибин А], позволяют выявить риск рождения генетически аномального плода.
- Низкая концентрация внеклеточной фетальной ДНК, связь со специфическими факторами риска и технические ошибки могут ограничить результаты НИПТ.
- Подтверждение любого теста необходимо осуществлять с помощью классических инвазивных методов (таких как амниоцентез, биопсия ворсин хориона).

2.1. Введение

Неинвазивная пренатальная диагностика, в настоящее время чаще всего называемая НИПТ, которая использует внеклеточную ДНК плода, циркулирующую в материнской крови с самого начала беременности, служит методом, наиболее часто применяемым для установления генетических аномалий плода, в основном анеуплоидий, уже в конце I триместра (10 нед и далее). Первоначально внеклеточную ДНК использовали для выявления синдрома Дауна. С той поры эту технологию стали применять и для выявления других трисомий и хромосомных аномалий. Технологический прогресс позволил идентифицировать более мелкие аномалии в геноме, такие как вариации числа копий [1], а также генах, вызывающих моногенные нарушения [1]. НИПТ считается последней инновацией в пренатальной диагностике, призванной помочь

Таблица 2.1. Предположения, связанные с неинвазивным пренатальным тестированием, сделанные обычными людьми и врачами, в сравнении с реальностью

Характеристики	Предположение	Истинность
Период проведения	На ранних сроках беременности	Верно, тест можно проводить на сроках 9–10 нед беременности
Риск для плода	Отсутствие риска	Верно, так как для анализа берут материнскую кровь
Происхождение клеток (внеклеточная фетальная ДНК)	Предположительно происходит от плода	Происходит из клеток трофобласта
Дальнейшие обследования	Не требует инвазивных процедур	Неверно, при положительных результатах скрининга наличие аномалий подтверждают при помощи амниоцентеза или биопсии ворсин хориона
Продолжительность тестирования	Быстро и легко	Во многих случаях долгий и технически сложный процесс
Надежность	Надежен для всех видов генетической патологии	Надежность 99% для трисомии 21, но при других генетических аномалиях прогностическая ценность постепенно снижается
Состояние плода	Плоду не вредит	Верно, так как это скрининговое тестирование
Конечный результат	Получается быстро	Для получения результатов необходимо не менее недели, и вероятность того, что потребуются повторный тест, выше в случае низкого содержания внеклеточной ДНК

практикующим врачам и будущим родителям в ведении беременности, принятии обоснованных решений, осознанном выборе и консультировании по поводу их будущего ребенка. На **рис. 2.1** (см. цв. вклейку) представлен основной протокол, которому следуют во время НИПТ.

Поскольку НИПТ — неинвазивный метод, риск выкидыша и неблагоприятных исходов, связанных с диагностическими тестами, сведен к нулю, так как для диагностики используют только образцы материнской крови. Благодаря тому, что этот метод можно применять на ранних этапах беременности, НИПТ считают одним из лучших способов скрининга с нулевым риском для плода и матери, а также эффективным и экономичным [2]. Исследования показали более высокую чувствительность и специфичность (>99%) для синдрома Дауна по сравнению с предыдущими методами скрининга с постепенным снижением эффективности для других видов генетической патологии [3, 4]. По оценкам, НИПТ используют более чем в 61 стране. Ожидают, что в ближайшие 5 лет этот рынок составит 6,0 млрд долларов [5]. До сих пор не утихают споры о практических последствиях скрининга внеклеточной ДНК при беременности; как правило, они связаны с пробелами в знаниях как среди специалистов, так и пациентов с конкретными способами проведения теста и во многих случаях увеличением стоимости, связанной с крупномасштабны-

ми скрининговыми программами. Растет интерес к пониманию социальных и этических вопросов, связанных с расширением применения НИПТ с точки зрения принятия решения пациентом, возможной финансовой нагрузки, беспокойства пациентов, взглядов на прерывание беременности [6], а также опасений медицинских работников в связи с расширением использования НИПТ [2]. Хотя большинство женщин и представителей общественности рассматривают НИПТ как положительный инструмент для пренатальной диагностики патологии, помимо синдрома Дауна, родители высказывают аналогичные возражения по поводу финансовых вопросов, доступности теста и управления информацией. В табл. 2.1 представлены предположения и реальное положение дел с НИПТ в мире. В этой главе мы рассказываем, как эволюционировала данная технология, и остановимся на ее важности для НИПТ.

2.2. Хронология развития пренатальной диагностики

За последние шесть десятилетий область неинвазивного пренатального скрининга и диагностики развивалась семимильными шагами. По сравнению с непосредственным анализом клеток плода при амниоцентезе или биопсии ворсин хориона, неинвазивные подходы с использованием материнской крови или УЗИ имеют большое преимущество, поскольку не представляют угрозы выкидыша для беременной. Впоследствии неинвазивные тесты, включая скрининг сыворотки крови и скрининг на основе внеклеточной ДНК плода, были разработаны для выявления генетических аномалий во время беременности.

2.2.1. Основные этапы до появления ультразвукового исследования в акушерстве

Практика забора околоплодных вод для исследования существует уже не менее 100 лет. О трансабдоминальном амниоцентезе в III триместре сообщали Prochownick и соавт. [7] и Schatz [8]. Menees и соавт. [9] изложили информацию о взятии проб амниотической жидкости с помощью трансабдоминальной иглы; для визуализации контуров плода и плаценты вводили радиоконтраст. В 1956 г. Fuchs и Riis [10] в своей основополагающей статье в журнале *Nature* задокументировали первое применение анализа амниотической жидкости для определения пола плода, где клетки амниотической жидкости проверяли на наличие полового хроматина (тельца Барра). В 1961 г. Liley [11] в Окленде (Новая Зеландия) опубликовал хорошо известную корреляцию между отклонением спектральной кривой поглощения амниотической жидкости под воздействием билирубина и тяжестью резус-изоиммунизации. После открытий Liley амниоцентез стали широко применять в акушерстве.

Исследование Steele и Breg по кариотипированию амниотической жидкости [20] стало революционным. В том же году Nadler опубликовал исследование по ферментативным тестам с использованием клеток плода из амниотической жидкости и сообщил об одном из самых ранних случаев трисомии 21. Его исследователи использовали для изучения хромосом клетки, выращенные в лаборатории. В 1972 г. Milunsky и Littlefield [12] написали о метаболических

аномалиях у младенцев. Brock и Sutcliffe в Великобритании и одновременно Hino и соавт. из Японии в 1972 г. сообщили, что у беременных плодом с дефектом нервной трубки повышен уровень α -фетопротеина (АФП) в амниотической жидкости [13]. В 1970 г. Nadler и Gerbie опубликовали фундаментальную работу «Роль амниоцентеза во внутриутробной диагностике генетических аномалий», которая послужила настоящим толчком для генетического амниоцентеза и диагностики.

В 1968 г. Mohr представил антенатальную генетическую диагностику с использованием ворсин хориона [14]. В этом исследовании он проводил трансцервикальную биопсию хориона под контролем эндоскопа диаметром 5 мм, но первое эффективное пренатальное диагностическое использование биопсии ворсин хориона состоялось в 1975 г. в больнице Тьетунг в Аншане (Китай) [15], где был определен пол плода для предварительной селекции пола. Информация об этом была опубликована в одном из номеров *Chinese Medical Journal*, где сообщали о 100 пациентках, которым была проведена трансцервикальная биопсия ворсин хориона с помощью слепой аспирации металлической канюлей диаметром 3 мм. После введения канюли в канал шейки матки при ощущении легкого сопротивления помещали внутреннюю трубку меньшего размера, затем производили забор плацентарного материала. Было поставлено шесть ошибочных диагнозов на фоне 99 успешных попыток и четыре беременности были потеряны. Американские исследователи не смогли повторить эти результаты, поэтому на то время пренатальная диагностика в I триместре беременности была отложена.

Первые попытки фетоскопии были предприняты Westin в 1954 г. [16] с помощью гистероскопа диаметром 10 мм, введенного через шейку матки пациенткам, которым предстояло проведение аборта по медицинским показаниям на сроке от 14 до 18 нед. Термин «фетоскопия» был введен Scrimgeour в 1973 г. [17], когда он описал введение через стенку матки при лапаротомии 2,2-миллиметрового эндоскопа для визуализации амниотической полости и плода. Valenti [18, 19] использовал «эндоамниоскоп» и сообщил о первой аспирации крови плода и успешной диагностике гемоглобинопатии (<https://www.obultrasound.net/hobbins.html>).

2.2.2. Основные этапы после внедрения ультразвука в акушерство

Ультразвук и молекулярная генетика возродили потребность в дородовой диагностике на ранних сроках. Steele и Breg [20] культивировали фетальные клетки из амниотической жидкости и проложили путь к кариотипированию в 1966 г. Все эти работы привели к тому, что амниоцентез к 1970-м годам стал доминирующим методом пренатального генетического тестирования, и в дальнейшем его рассматривали как стандартную практику в соответствии с упомянутой публикацией Nadler и Gerbie в 1970 г. [21]. Прогресс в области амниоцентеза был достигнут благодаря использованию ультразвука для визуализации траектории иглы в соответствии с протоколом Bang и Northaved в 1972 г. [22].

Hobbins и Mahoney [23] из Йельского университета, а также Patrick и соавт. [24] из Канады провели новаторские работы с использованием ультразвука перед проведением фетоскопии. Эти исследователи сообщали об использова-

нии ультразвукового исследования (УЗИ) для точного картирования плаценты и положения плода, а также точного определения расстояния между передней брюшной стенкой и хориальной пластинкой. В 1977 г. Hobbins и Mahoney сообщили об успешном исключении β -талассемии и диагностике серповидно-клеточной болезни без явного риска для матери и плода при проведении процедуры. Среди других ведущих исследователей — Alter и соавт. [25], Fairweather и соавт. [26] в Лондоне. Rodeck и Campbell [27] сообщили о диагностике врожденной спинномозговой грыжи с помощью УЗИ. В 1979 г. та же группа доложила о получении образцов чистой крови, успешном на 94% в процессе 51 попытки забора пуповинной крови. Они ввели метод аспирации крови из одного из крупных сосудов у основания пуповины. Большинство исследователей начали использовать этот метод для диагностики гемоглобинопатий.

В СССР в своем первом сообщении об использовании УЗИ-сопровождения при биопсии ворсин хориона Кази и соавт. [28] сообщили о методе установления пола плода и ферментном анализе образцов хориона на сроке 6–12 нед беременности. Niazi и соавт. разработали более совершенные методы выращивания фибробластов из ворсин трофобласта в 1981 г. Ward в Лондоне выполнил трансцервикальный забор ворсин хориона с помощью ультразвукового катетера и шприцевого отсоса. В 1983 г. группа Brambati в Милане показала, что при УЗИ-контроле увеличивается частота получения хориального материала с 75 до 96%. Brambati использовал полиэтиленовую трубку диаметром 1,5 мм с мягким obturatorом из нержавеющей стали, которая впоследствии стала наиболее часто используемым устройством для забора ворсин хориона. В 1983 г. Simoni и Brambati [29] в Милане опубликовали процедуру прямого хромосомного и биохимического анализа ворсин хориона в I триместре беременности. Ворсины хориона аспирируются или биопсируются из ветвистого хориона (*chorion frondosum*) плацентарного диска. Внутренний слой цитотрофобласта, подлежащий к наружному слою синцитиотрофобласта, в свежих образцах ворсин состоит из активных митотических клеток. В 1984 г. Smidt-Jensen и Hahnemann [30, 31] в Копенгагене разработали трансабдоминальную тонкоигольную аспирацию ворсин. Благодаря меньшему количеству инфекций и неудачных проб, требующих повторного введения иглы, этот доступ стал гораздо более распространенным, чем его трансцервикальный аналог. Группа Brambati и Simoni в Милане и группа Golbus в Сан-Франциско в конце 1980-х годов открыли другие подходы к использованию ультразвука. В 1986 г. группа Golbus сообщила об опыте проведения 1000 биопсий ворсин хориона с уровнем потерь плода 3,8%, а также 1,7% случаев хромосомного мозаицизма, не подтвержденного впоследствии у плода.

После фетоскопии забор проб чистой фетальной крови под контролем ультразвука, или кордоцентез, был впервые применен во Франции в 1983 г. Фернаном Даффосом (Fernand Daffos) [32]. Чистую фетальную кровь забирали *in utero* в ~18 нед из пупочной вены вблизи прикрепления пуповины к плаценте с помощью иглы 20 G под ультразвуковым контролем. Приблизительно в то же время эта процедура была внедрена в Великобритании Campbell и Rodeck из больницы Королевского колледжа. Группа Hobbins из Йельского университета описала свою методику в 1985 г. и назвала ее «чрескожное взятие пуповинной крови». Этот подход заменил забор крови методом фетоскопии, который эта же группа впервые предложила 10 годами ранее.

В 1988 г. Nicolini, работая вместе с Rodeck в роддоме королевы Шарлотты в Лондоне, впервые описал забор крови у плода из внутривенной части пупочной вены в качестве альтернативной процедуры при безуспешной пункции сосудов пуповины. В конце 1980-х годов фетоскопию в основном использовали для забора образцов тканей или органов, а забор крови плода стали всегда проводить с помощью трансабдоминальной иглы под ультразвуковым контролем. Самым распространенным показанием для забора крови плода стало быстрое подтверждение подозрения на аномальный кариотип в конце II триместра, когда УЗИ выявляло пороки развития плода.

Использование критерия ТВП произвело революцию в области пренатального скрининга в 1990-х годах и стало важной ультразвуковой основой хромосомного скрининга в I триместре беременности [33]. Nicolaides из Королевского колледжа Лондона и Ville во Франции внедрили эту методику в Великобританию и Европе после 1991 г. Затем она стала стандартным методом скрининга анеуплоидий плода в перинатальных центрах по всему миру. Spencer и соавт. [34] показали, что ТВП плода на сроке 10–14 нед можно использовать в сочетании с биохимическими маркерами β -ХГЧ и РАРР-А для повышения эффективности скрининга анеуплоидии в I триместре. Экспресс-методики анализа биохимических маркеров позволили создать многопрофильную клиническую картину для оценки риска аномалий плода, где за один визит пациентка может получить предварительное консультирование, сдать биохимические анализы, пройти УЗИ и получить комбинированную оценку риска в течение 1 ч (Spencer [35, 36]).

2.2.3. Внеклеточная ДНК плода

Казаков и соавт. [37] впервые сообщили о присутствии внеклеточной ДНК плода в крови беременных в I триместре. Свободно плавающая внеклеточная ДНК плода, обнаруженная в материнской крови, может происходить из клеток трофобласта, лимфоцитов или децидуальных клеток, и ее важность при беременности освещена в этом разделе. Первое исчерпывающее сообщение об обнаружении внеклеточной фетальной ДНК в материнской плазме и сыворотке крови было опубликовано Lo и соавт. [38]. Новый этап в области пренатального скрининга наступил в 1997 г. после выявления внеклеточной ДНК и демонстрации увеличения ее концентрации с возрастом в плазме крови матери [38]. Эти результаты стали ключевыми для разработки альтернативного неинвазивного метода скрининга анеуплоидии плода, который стал известен как НИПТ. Первоначально предполагали, что этот метод можно использовать в качестве практического теста для скрининга, поскольку после беременности внеклеточная ДНК уже не присутствует в материнской крови (рис. 2.2, см. цв. вклейку). Однако только в 2008 г. было доказано, что трисомию можно выявить в материнской крови с помощью секвенирования нового поколения (NGS — от англ. new generation sequencing) [39, 40]. Fan, Chiu и соавт. продемонстрировали возможность скрининга на трисомию 21 с помощью секвенирования внеклеточной ДНК с низкой долей ложноположительных результатов у беременных. Это открыло «гонку» за разработку лучших НИПТ-тестов с использованием NGS, чтобы предложить более точный и безопасный метод, позволяющий избежать последующих инвазивных исследований.

С момента внедрения пренатального скрининга на внеклеточную ДНК в 2011 г. за последующие 4 года было проведено более 2 млн НИПТ [41]. В настоящее время, наряду с развитием генетического тестирования в целом растет потребность в подтверждении здоровья плода, развивающегося как в результате естественного зачатия, так и с помощью методов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Были также разработаны генетические тесты с целью выявления статуса носителя рецессивного заболевания у супружеских пар для оценки до зачатия риска наследования плодом рецессивного состояния [42].



Рис. 2.3. Пионеры в области пренатальной диагностики. Слева направо: Томас Орвилл Менис, Альберт Уильям Лайли, Марк У. Стил, Фриц Фридрих Фукс, Джон Хоббинс, Чарльз Родек. Второй ряд слева направо: Обри Милунски, Иеремия Махони, Генри Надлер, Альберт Б. Герби, Ян Гуннар Фэй Мор, Джон Скримджор. Третий ряд слева направо: Фернан Даффос, Стюарт Кэмпелл, Бруно Брамбати, Умберто Николини, Кипрос Николандис, Леонард Герценберг. Четвертый ряд слева направо: Василий Иванович Казаков, Деннис Ло, Кевин Спенсер, Кристина Фан, Росса Чиу, Диана В. Бьянки. Пятый ряд слева направо: Андре Буэ, Йенс Банг, Говард Какл, Николас (Ник) Уолд

В качестве альтернативы с помощью методов *in vitro* можно также использовать ДНК бластоцисты для диагностики перед имплантацией [1, 43]. Преимплантационная генетическая диагностика, однако, не исключает стандартного антенатального скрининга или диагностических тестов [44]. История пренатальной диагностики — это динамичный рассказ о том, как широко распространенные инвазивные пренатальные диагностические тесты постепенно сменились НИПТ, и на всех основных хронологических этапах это происходило при участии многих клиницистов и ученых-первопроходцев (рис. 2.3).

2.3. Типы неинвазивного пренатального тестирования, используемые на сегодняшний день

Анализ целого генома или целевой геномный анализ фрагментов внеклеточной ДНК [также с использованием однонуклеотидных полиморфизмов (SNP — от англ. single nucleotide polymorphism)] служит основной методологией, используемой для НИПТ на основе бесклеточной ДНК [45]. Для анализа миллионов фрагментированных последовательностей бесклеточной ДНК используют дробовое массовое параллельное секвенирование (МПС) или хромосомно-селективное секвенирование с последующим отнесением их к исходным хромосомам для количественной оценки. Обычно плод с трисомией содержит большее количество внеклеточной ДНК в материнской крови по сравнению с эуплоидным плодом [46]. Однако использование последовательного хромосомно-селективного секвенирования определенного участка хромосом X, Y, 13, 18 и 21 дает преимущество в виде снижения затрат, но и частота ошибок выше по сравнению с дробовым МПС [1]. В табл. 2.2 перечислены наиболее часто используемые методы пренатального скрининга.

Кроме того, использование мультиплексной ПЦР для выявления SNP помогает различать материнский и плодный фрагменты, а также количественно определять фетальную фракцию в хромосомно-селективном секвенировании или ПЦР с частотой ошибок 4% [51]. В качестве альтернативы секвенированию фрагментов внеклеточной ДНК уже несколько лет применяют количественное определение микроматричного анализа, что служит точной и более быстрой альтернативой хромосомно-селективному секвенированию и снижает определенную вариабельность анализа [52]. Кроме того, для трисомии 21 стали применять цифровую ПЦР (цПЦР), основанную на стратегии подсчета одиночных молекул. Эту технологию считают экономически эффективной и быстрой по сравнению с секвенированием следующего поколения, но при этом она имеет ограничения, связанные с тем, что для выявления низкоуровневого мозаицизма и структурных хромосомных аномалий, таких как сбалансированная транслокация, необходимо достаточное количество внеклеточной ДНК и один набор зондов [53]. NGS предпочтительнее благодаря способности выявлять микродупликации/делеции при разрешении, ограниченном ~7–8 мегабазами.

Недавно в качестве альтернативы NGS для выявления распространенных трисомий плода во внеклеточной ДНК была продемонстрирована ПЦР в реальном времени на основе пептидно-нуклеиновых зондов. В этой технологии

Таблица 2.2. Биохимические и ультразвуковые методы пренатального скрининга

Триместр	Метод	Интерпретация
I (11–13 нед)	ТВП + биохимические маркеры. Методы скрининга ВМ + ТВП плода. ВМ + свободный β -ХГЧ в сыворотке крови и РАРР-А. ВМ + ТВП + свободный β -ХГЧ и РАРР-А (комбинированный тест). Комбинированный тест + носовая кость или кровоток через трехстворчатый клапан либо венозный проток	Увеличение ТВП + старший репродуктивный возраст матери + повышенное содержание β -ХГЧ = трисомии (Orlandi et al. [47])
II (16–20 нед)	Скрининг по биохимическим маркерам. Методы скрининга ВМ + сывороточный АФП, ХГЧ (двойной тест). ВМ + сывороточный АФП, свободный β -ХГЧ (двойной тест). ВМ + сывороточный АФП, ХГЧ, свободный эстриол (тройной тест). ВМ + сывороточный АФП, свободный β -ХГЧ, свободный эстриол (тройной тест). ВМ + сывороточный АФП, ХГЧ, свободный эстриол, ингибин А (четверной тест). ВМ + сывороточный АФП, свободный β -ХГЧ, свободный эстриол, ингибин А (четверной тест)	Неконъюгированный эстриол + ХГЧ = тройной скрининг или с ингибином А в качестве четверного скрининга для определения риска дефектов нервной трубки, T21, T18 (Dey et al. [48])
I и II	КПС. КПС без ингибина А, КПС сыворотки крови	РАРР-А + ТВП + четверной скрининг для выявления риска трисомий (Wald et al. [49])
	Контингентный скрининг	РАРР-А + ТВП + четверной скрининг для выявления риска трисомий (Wald et al. [49])
	Последовательный скрининг	Субъекты выбраны из скрининга I триместра и предложена инвазивная диагностика. Низкое положительное прогностическое значение = подозрение на T21
I, II и III (с 5 нед)	УЗИ	Мягкие маркеры + УЗИ + + результаты предыдущих скринингов = риск анеуплоидий (Dey et al. [48])

Примечание: АФП — α -фетопротеин; ВМ — возраст матери; КПС — комплексный пренатальный скрининг; ТВП — толщина воротникового пространства; УЗИ — ультразвуковое исследование; ХГЧ — хорионический гонадотропин; РАРР-А — ассоциированный с беременностью плазменный белок А (от англ. pregnancy associated plasma protein A).