**ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЙ СВОБОДНО ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК В КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН В РАМКАХ НЕИНВАЗИВНОГО ПРЕНАТАЛЬНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ (НИПТ), ВЫПОЛНЕННОГО МЕТОДОМ ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

Перфильева Д.В.

*МБОУ ОЦ №11, Майкопский район, Россия*

Свободно циркулирующая ДНК– фрагменты [ДНК](https://en.wikipedia.org/wiki/DNA) от 70 до 200 пар нуклеотид длиной, которые содержатся в [плазме крови](https://en.wikipedia.org/wiki/Blood_plasma). Приблизительно 4-10% всей ДНК в крови матери представлено свободно циркулирующей ДНК плода (сffDNA). Экстремально низкие и максимально высокие значения сffDNA могут говорить о патологии плода. Неинвазивное пренатальное тестирование — анализ cffDNA, циркулирующей в крови беременной женщины, для скрининга с целью выявления анеуплоидий по всем хромосомам, который выполняется начиная с 10-й недели беременности.

Целью работы было исследовать динамику фетоплацентарной свободно циркулирующей ДНК в крови беременных женщин и результаты, затрудняющие корректную лабораторную интерпретацию, такие как низкий уровень сffDNA, недостаточный для анализа, так и высокий уровень шума данных в рамках НИПТ.

Материалы и методы. Всего нами было проанализировано 290 образцов. В исследовании приняли участие женщины на сроке беременности от 8 до 35 недели в возрасте от 21 до 45 лет (средний возраст составил 33,91±5,35 лет). Индекс массы тела в среднем составил 22,9±4,29. Все женщины подписали добровольное согласие на участие в исследовательском проекте.

Исследование производилось на базе медицинской лаборатории «CL», г. Краснодар.

Материал анализировали с помощью полупроводникового высокопроизводительного секвенирования на платформе Ion Torrent. Оценку концентрации библиотек проводили на флуориметре Qubit 4.0. Результаты оценивали с помощью биоинформатической обработки данных. Оценка риска анеуплоидии хромосом выражалась через статистический показатель «Z-score» c комментарием по каждой хромосоме. Для работы с базой данных по пациентам мною были разработаны специализированные биоинформатические подходы, позволяющие сократить до минимума работу с большим количеством данных и сложными таблицами. Среда разработки – Visual Studio, язык программирования – Python.

Результаты и обсуждение. Концентрация cffDNA в течение беременности растет незначительно, с резким увеличением уровня в конце второго триместра. Полученные нами данные подтверждаются другими исследователями [1,2]. Средняя концентрация cffDNA на 10-ой неделе составила 10,86%, на 31-ой неделе - 31,6%.

У 2 пациенток наблюдались экстремально низкие значения cffDNA, которой было недостаточно для лабораторной интерпретации. Для этих пациенток характерны:поздний репродуктивный возраст (более 35 лет), второй триместр беременности (20-22 неделя), повышенный риск хромосомной патологии по результатам комбинированного скрининга. У одной из пациенток впоследствии произошла отслойка плаценты, что, возможно, и привело к снижению концентрации cffDNA в крови матери.

10% всех заключений приходятся на «Высокий уровень шума данных», которые так же препятствуют корректной интерпретации данных. Истинных факторов-триггеров на данный момент не выявлено. Стоит учитывать, что шумы не являются технической ошибкой аппаратуры и персонала. Исходя из нашей выборки пациенток можно разделить на две группы, когда при повторном анализе «Высокий уровень шума данных»: 1) подтвердился; 2) перезабор крови решил проблему «Высокого шума данных».

Нами не было выявлено закономерностей между характеристиками пациенток, получивших лабораторное заключение «Высокий уровень шума данных» повторно. Для второй группы было выявлено снижение концентрация cffDNA в диапазоне 1,9% в 90% случаев, что может говорить о влиянии концентрации свободно циркулирующей ДНК разного происхождения на шумы. Возможно, доброкачественные опухоли могут создавать фон своей свободно циркулирующей ДНК и выступать одним из факторов, провоцирующих шумы. Врачом-генетиком было описан клинический случай одной пациентки с миомой матки и нормально протекающей беременностью. Было известно, что эмбрион прикрепился к эндометрию в месте миомы. По показаниям УЗИ ей был рекомендован НИПТ. Лабораторная интерпретация полученных данных «Высокий уровень шума». При повторном анализе эти данные повторялись. Так же известно, что миома была растущая.

Из данных литературы известно, что многие факторы, такие как инфаркты, травмы, сепсис, прием лекарственных препаратов влияют на уровень внеклеточной ДНК в крови [3]. Мы рассматриваем медикаменты как один из факторов шумов в результатах анализа НИПТ, для этого мы предлагаем дополнительное исследование, состоящее из двух направлений (*In vitro* и *In vivo*). *In vitro* – работа с клеточными культурами, в среду которых будут добавляться различные медикаменты. Целесообразно будет начать с такой группы медикаментов, как цитостатики. Это группа противоопухолевых препаратов, которые нарушают процессы роста, развития и механизмы [деления](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5_%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BA%D0%B8) всех клеток организма, включая злокачественные, тем самым инициируя [апоптоз](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BF%D0%BE%D0%BF%D1%82%D0%BE%D0%B7). *In vivo* **–** разработка направлений для НИПТ, где пациенткам будет предложено подробно описать все препараты, которые они принимают, семейный анамнез, особенности течения беременности. Благодаря этому исследованию мы сможем понять, какие группы медикаментов провоцируют шумы, и сможем внести их в ряд ограничений для выполнения неинвазивного пренатального тестирования.

Выводы:

1. Мною была выполнена амплификация выделенной cffDNA, создание библиотек, их очистка и количественная оценка их концентрации.
2. Концентрация cffDNA в течение беременности растет незначительно, с резким увеличением уровня в конце второго триместра.
3. Доброкачественные опухоли могут выступать факторами-триггерами, которые вызывают шумы.
4. Специально разработанные мною программы обеспечивают успешную обработку базы данных пациенток.
5. Метод секвенирования свободно циркулирующей ДНК хоть и активно используется, но не до конца изучен, так как биоинформатические подходы разнообразны и до сих пор совершенствуются. Не всегда понятны причины, из-за которых случаются сбои в программе, данная сфера очень актуальна и требует дальнейшего изучения.
6. НИПТ становится обязательным анализом в наше время. Увеличение его точности, а также изучение недочётов позволит усовершенствовать данный метод.

**Литература:**

1. Барков И.Ю. Совершенствование системы пренатального скрининга анеуплоидий плода внеклеточной крови ДНК материна основе анализа. 2018. Диссертация на соискание степени к.б.н.- С. 151.
2. Dey M., Sharma S., Aggarwal S. *N Am J Med Sci*,-2013,- 5(3): 182–190. doi: 10.4103/1947- 2714.
3. Chang CP, Chia RH, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. Clin Chim Acta. 2003 Jan;327(1-2):95-101. doi: 10.1016/s0009-8981(02)00337-6. PMID: 12482623.