

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Janne Aule

**Mitteinvasiivne sünnieelne diagnostika – tänapäev ja tulevik**

Bakalaureusetöö

Juhendaja prof. Ants Kurg

TARTU 2015

# Sisukord

Kasutatud lühendid .....	3
Sissejuhatus .....	4
Kirjanduse ülevaade .....	5
1. Sõeluuring.....	5
1.1. Loote kuklavoldi läbikumavus (NT) .....	6
1.2. Seerummarkerite sõeluuring .....	7
2. Rakuvabad nukleiinhapped ema veres .....	9
2.1. Loote rakuvaba DNA ehk cffDNA .....	9
2.1.1. Avastamine .....	9
2.1.2. Päritolu.....	9
2.2. Loote rakuvaba RNA ehk cffRNA.....	10
2.2.1. Loote rakuvaba mRNA avastamine ja eraldamine .....	10
2.2.2. CffRNA diagnostikas.....	12
2.2.3. Loote rakuvaba miRNA.....	13
3. Mitteinvasiivne sünnieelne testimine (NIPT) cffDNA baasil .....	15
3.1. Kromosoomianeuploidiad .....	15
3.2. Monogeensed haigused .....	17
3.3. Loote cfDNA fraktsiooni suurus ja selle eraldamine ema cfDNAst.....	17
3.4. NIPT teise põlvkonna sekveneerimise teel .....	22
3.4.1. Kogu genoomi MPS.....	23
3.4.2. Suunatud MPS .....	25
3.4.3. SNP-de analüüsil põhinev suunatud sekveneerimine .....	27
3.5. Valepositiivsed ja -negatiivsed tulemused .....	28
4. Sõeluuringu ja cffDNA testide võrdlus .....	30
5. Arutelu .....	34
Kokkuvõte .....	39
Summary.....	40
Tänuavaldused .....	41
Kirjanduse loetelu.....	42
Kasutatud veebiaadressid .....	53
Lihtlitsents .....	54

## KASUTATUD LÜHENDID

AC –	amniotsentees, lootevedeliku analüüs
AFP –	$\alpha$ -fetoproteiin
AR –	alleelne suhe ( <i>allelic ratio</i> )
$\beta$ -hCH –	inimese beeta-koorionigonadotropiin
cfDNA –	rakuvaba DNA ( <i>cell-free DNA</i> )
cffDNA –	loote rakuvaba DNA ( <i>cell-free fetal DNA</i> )
cffRNA –	loote rakuvaba RNA ( <i>cell-free fetal RNA</i> )
CNV –	DNA koopiaarvu variatsioonid ( <i>copy number variations</i> )
CPM –	platsenta mosaiiksus ( <i>confined placental mosaicism</i> )
CSHL1 –	koorioni somatomammotropiin hormooni sarnane 1
CVS –	koorionibiopsia ( <i>chorionic villus sampling</i> )
DANSR –	valitud regioonide digitaalne analüüs ( <i>digital analysis of selected regions</i> )
FORTE –	loote cfDNA fraktsiooni suhtes optimeeritud trisoomia riski hindamine ( <i>fetal-fraction optimized risk of trisomy evaluation</i> )
hCG –	inimese koorionigonadotropiin
hPL –	inimese platsenta laktogeen
MPS –	teise põlvkonna sekveneerimine ( <i>massively parallel sequencing</i> )
NATUS –	teise põlvkonna SNP-del põhinev aneuploidiate test ( <i>Next-generation Aneuploidy Test Using SNP-s</i> )
NIPT –	mitteinvasiivne prenataalne testimine
NPV –	negatiivne ennustusväärtus ( <i>negative predictive value</i> )
NT –	loote kuklavoldi läbikumavus ( <i>nuchal translucency</i> )
ONTD –	neuraalitoru sulgumise defektid ( <i>open neural tube defects</i> )
PAPP-A –	rasedusega seotud plasma valk
PLAC4 –	platsentaspetsiifiline 4
PPV –	positiivne ennustusväärtus ( <i>positive predictive value</i> )
PS –	vanemlik tugi ( <i>Parental Support</i> )
qPCR –	kvantitatiivne reaalaja PCR
RT-PCR –	pöördtranskriptsioon-PCR ( <i>reverse transcription PCR</i> )
RT-qPCR –	pöördtranskriptsioon-qPCR ( <i>real-time quantitative reverse transcription PCR</i> )
SNP –	ühenukleotiidne polümorfism ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
uE3 –	konjugeerimata östriool
UH –	ultraheli

## SISSEJUHATUS

Loote pärilike haiguste sünnieelne tuvastamine on väga oluline nii tulevaste vanemate, lapse kui meditsiinisüsteemi seisukohast. Vanematele annab päriliku haiguse tuvastamine võimaluse rasedus katkestada või kui otsustatakse siiski haige laps sünnitada, võimaldab see teha vajalikke ettevalmistusi lapse hooldamiseks. Olenevalt tuvastatud arenguhäire iseloomust on võimalik vajadusel pakkuda lapsele sünnijärgselt kohest meditsiinilist abi. Selleks on oluline, et häire tuvastatakse lootel võimalikult varakult ja täpselt.

Eestis on hetkel standardiks raseduse esimese trimestri sõeluuringu läbiviimine ning selle tulemustest sõltuvalt vajadusel ka teise trimestri sõeluuringu teostamine. Esimesel trimestril määratakse raseda vereseerumist biomarkerite sisaldus ning teostatakse ultraheli uuring, mille käigus mõõdetakse lootel kuklavoldi läbikumavus (ingl. k. *nuchal translucency*; NT). Andmeid analüüsitakse statistiliste programmide abil võttes arvesse ka ema vanust ja teisi riskitegureid. Kui sõeluuringu tulemusel tuvastatakse rasedal kõrge risk haige lapse sünniks, suunatakse ta edasi geneetiku vastuvõtule ning raseda nõusolekul viiakse läbi loote invasiivne kromosoomiuuring – amniotsentees või koorionibiopsia. Kui tuvastatakse vahepealne risk, viiakse läbi teise trimestri sõeluuring, mille käigus hinnatakse esimesel trimestril mõõdetud NT näitu koos ema vereseerumi biomarkerite tasemetega. Risk leitakse kombineerituna raseduse kestuse, ema vanuse, kaalu, suitsetamisharjumuste ja muude riskifaktoritega. Kõrge riski tuvastamisel teostatakse invasiivne uuring (Sitska jt, 2011).

Sõltuvalt kasutatavast analüüsimeetodist võimaldavad invasiivsed uuringud määrata loote kariotüübi, tuvastada kromosoomide mikrodeletsioone ja -duplikatsioone või ühe geeni mutatsioone. Samas kaasneb sellega alati raseduse katkemise risk ka terve loote korral (Sitska jt, 2011). Lisaks on praeguste sõeluuringute puhul oluline, et tuvastatakse vaid 80-90% kromosoomihaigustega loodetest ([www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/component/content/article/6/14-iitrimestrisoeluuring<sup>1</sup>](http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/component/content/article/6/14-iitrimestrisoeluuring)). Seega on ülioluline leida täpsemaid sõeluuringu meetodeid, mis võimaldaks tuvastada need rasedused, mille puhul on invasiivse protseduuri läbiviimine põhjendatud, et viia teostatavate invasiivsete protseduuride hulk miinimumini. Siin tuleb appi loote rakuvaba DNA (ingl. k. *cell-free fetal DNA*; cffDNA) ema veres, aga ka selle kasutamisel diagnostikas on mitmeid murekohti.

Käesoleva töö eesmärgiks on tutvustada cffDNA analüüsimeetodeid, nende eeliseid ja puudusi, võrrelda seda sõeluuringuga ning analüüsida teise põlvkonna sekveneerimist antud kontekstis.

Märksõnad: mitteinvasiivne prenataalne testimine (NIPT); loote rakuvaba DNA (cffDNA); teise põlvkonna sekveneerimine (MPS).

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1. Sõeluuring

Reeglina saab naine oma raseduses veenduda koduse rasedustesti abil. Sellele võiks järgneda naistearsti või ämmaemanda esimene visiit, mille käigus raseduse olemasolu kinnitatakse ultraheli abil. Loote kromosomaalsete ja muude arenguhäirete riski hindamise seisukohast on oluline, et esimene visiit toimuks enne raseduse 12. nädalat. Seejärel on Eestis standardiks esimese ja teise trimestri järjestikuse sõeluuringu (ingl. k. *sequential screening*) läbiviimine, mis seisneb loote kuklavoldi läbikumavuse suuruse hindamises ultraheli (UH) uuringul ning ema seerummarkerite määramises esimesel trimestril ning selle tulemustest sõltuvalt vajadusel ka teisel trimestril. Sõeluuringu eesmärgiks on tuvastada need rasedad, kellel on tavapärasest suurem risk mõne kromosoomihaiguse või muu arenguhäirega lapse sünniks. Tegemist ei ole diagnostilise testiga, vaid riskihinnangu andmisega ([www.kliinikum.ee/naistekliinik/naistenouandla/rasedusaegsed-uuringud/79-raseduse-jaelgmine-naedalate-kaupa](http://www.kliinikum.ee/naistekliinik/naistenouandla/rasedusaegsed-uuringud/79-raseduse-jaelgmine-naedalate-kaupa)<sup>2</sup>). Ka mitmel pool mujal maailmas, eelkõige riikides, kus vastavad uuringud kompenseerib riiklik tervisekindlustussüsteem, on kasutuses järjestikune sõeluuring. Samas on mitmetes riikides vastavate uuringute eest tasumine raseda vastutus ning reeglina pakutakse siis rasedale erinevaid variante – vaid esimese või teise trimestri sõeluuring, järjestikune või integreeritud sõeluuring (ingl. k. *integrated screening*), mille puhul leitakse risk kõiki markereid korraga hinnates. Lisaks on viimastel aastatel tekkinud rasedal võimalus valida ka erinevate tootjate pakutavate mitteinvasiivsete prenataalsete testide (ingl. k. *noninvasive prenatal test*, NIPT) vahel, mille puhul esinevad küllalt suured kõikumised testi hinnas, aga ka tundlikkuses ja spetsiifilisuses. Ka Eestis on rasedal võimalik tellida kahte neist – Harmony<sup>TM</sup> Prenatal Test (Ariosa Diagnostics, San Jose, CA, USA) ja Panorama<sup>TM</sup> Prenatal Screen (Natera, Inc., San Carlos, CA, USA) testi, kuid nende eest peab rase ise tasuma.

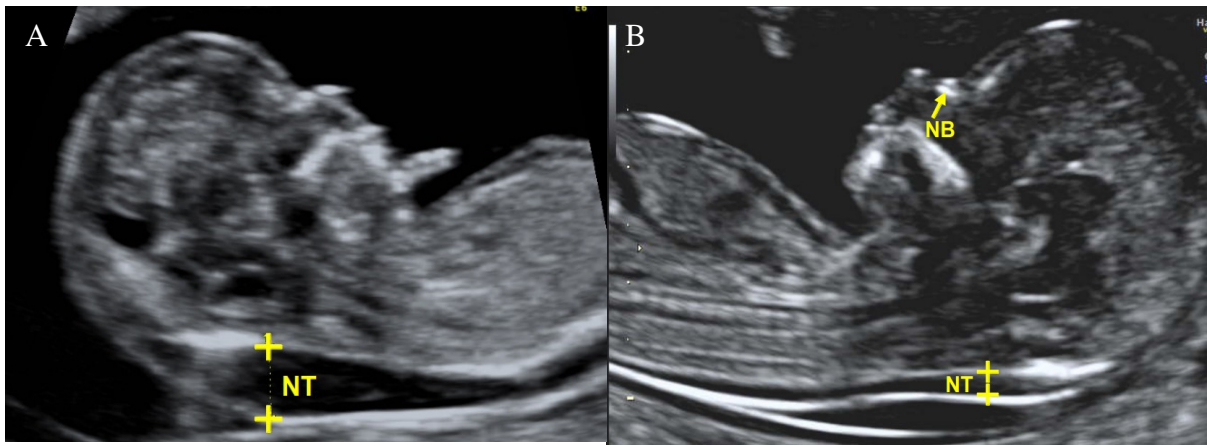
Kui kõigi eelnevate uuringute tulemusel tuvastatakse lootel kõrge risk mõne geneetilise arenguhäire esinemiseks, siis on näidustatud invasiivse protseduuri läbiviimine haiguse diagnoosimiseks. Diagnostilise protseduuri eesmärk on kinnitada või lükata ümber konkreetse haiguse esinemine tulevasel lapsel. Konkreetse protseduuri valik – amniotsentees (AC) või koorionibiopsia (CVS) – sõltub ka eelnevatest testidest. AC puhul on risk raseduse katkemiseks 0,2-0,3%, CVS korral 1-2% teostatud protseduuridest (Sitska jt, 2011). Kromosoomianeuploidia korral on lootel tegu mõne kromosoomi arvu häirega. Enimesinevad autosoomide aneuploidid on 21., 18., ja 13. kromosoomi trisoomiad, kus vastavat kromosoomi esineb rakkudes kolm koopiat. Lisaks on küllalt levinud ka sugukromosoomide

trisoomiad või monosoomiad, kus üks X või Y kromosoomi koopia on vastavalt kas üle või puudu (Latendresse ja Deneris, 2015).

### **1.1. Loote kuklavoldi läbikumavus (NT)**

Loote kukla piirkonnas oleva vedelikukogumi suuruse ehk kuklavoldi läbikumavuse suuruse määramine UH uuringul on üks vanemaid sünnieelse diagnostika meetodeid (Joonis 1). Esimesena näitasid loote NT suurenemise seost kromosomaalsete häiretega Nicolaides jt 1992. aastal. Nad mõõtsid NT suuruse 827 lootel ja viisid järgnevalt läbi ka invasiivse uuringu näidates, et loote NT läbimõõt üle 3 mm tõstab oluliselt aneuploidiate esinemise tõenäosust võrreldes nende loodetega, kelle NT läbimõõt on alla 3 mm (Nicolaides jt, 1992). Ka Comstock jt kinnitasid 2006. aastal avaldatud artiklis, et kui loote NT läbimõõt on üle 3 mm, ei anna seerummarkerite määramine enam diagnostilist lisaväärtust ning naine tuleks suunata geneetiku vastuvõtule, kes nõustaks edasiste võimaluste osas. Samas rõhutavad nad, et kuna NT läbimõõt muutub raseduse arenedes kiiresti, tuleks sellele hinnangu andmisel kindlasti arvesse võtta ka raseduse kestust (Comstock jt, 2006). Lisaks sagedaminiesinevate aneuploidiate määramisele on NT suurenenud läbimõõt heaks markeriks ka sugukromosoomide arvu häirete tuvastamisel (Kagan jt, 2006). Koos NT mõõtmega tuleks hinnata ka ninaluu olemasolu lootel, mille puudumine 10.–14. rasedusnädalal on samuti ohumärk aneuploidsuse esinemisele, kuid sellel pole nii tugevat diagnostilist väärtust kui NT mõõtmel (Sepulveda jt, 2007).

Lisaks NT suuruse mõõtmisele on raseduse esimese trimestri UH uuringu käigus võimalik lootel tuvastada ka mitmeid struktuurseid anomaaliaid. Näiteks skeleti ning neerude arenguhäired on väga edukalt tuvastatavad ka juba esimese trimestri UH uuringu käigus. Samuti on võimalik tuvastada südame ning aju arenguhäireid. Kuigi kõiki arenguhäireid ei suudeta nii varases raseduse staadiumis diagnoosida, tuleks siiski esimese trimestri UH uuringu käigus tähelepanu pöörata ka loote anatoomiale (Goldstein jt, 2014).



**Joonis 1.** Loote NT läbimõõdu määramine (joonisel tähistatud NT). A. NT läbimõõt üle 3 mm, mis viitab võimalikule aneuploidiale lootel. B. NT läbimõõt alla 3 mm, lisaks näha ka ninaluu esinemine (tähistatud NB), mis mõlemad annavad põhjust eeldada, et lootel ei esine kromosoomianeuploidiaid (<https://fetalmedicine.org/nuchal-translucency-scan><sup>3</sup>).

## 1.2. Seerummarkerite sõeluuring

Raseduse 10 (9)–14 (13) nädalal määratakse ema veres ka kahe biomarkeri – rasedusega seotud plasma valgu (PAPP-A) ja inimese vaba  $\beta$ -koorionigonadotropiini ( $\beta$ -hCG) sisaldus. Mõlema valgu puhul on kõikumisi nende kontsentratsioonid võrreldes normväärtustega seostatud loote kromosomaalsete anomaaliatega (Spencer, 2007; Driscoll ja Gross, 2008). Kombineerituna NT mõõtetega on vastavate markerite väärtused nii Downi sündroomi kui ka 13. ja 18. kromosoomi aneuploidiate, vastavalt Patau ja Edwardsi sündroomide ennustamisel efektiivsed (Orlandi jt, 1997; de Graaf jt, 1999; Latendresse ja Deneris, 2015). Lisaks on mõlema valgu sisalduste kombineeritud analüüsi abil võimalik ennustada ka raseduse varase katkemise riski. Juhul kui nende tase ema veres on oluliselt madalam kui vastava rasedusstaadiumi keskmine, esineb suur tõenäosus raseduse varaseks katkemiseks (Valbuena jt, 2015).

Raseduse teisel trimestril on testitavad biomarkerid riigiti pisut erinevad. Eestis ja mitmes teises Euroopa riigis määratakse  $\alpha$ -fetoproteiini (AFP), inimese koorionigonadotropiini (hCG) ja konjugeerimata östriooli (uE3) sisaldus ema vereplasmas. Samas Ameerika Ühendriikides määratakse lisaks ka neljanda markerina inhibiin A sisaldus. Muutused AFP kontsentratsioonid on ka oluliseks markeriks neuraalitoru sulgumise defektide tuvastamisel (ingl. k. *open neural tube defects*, ONTD) (<http://kliinikum.ee/geneetikakeskus/component/content/article/6/14-iitrimestrisoeluuring><sup>1</sup>; Driscoll, 2004; Spencer, 2007). Tabelis 1 on toodud nii esimese kui teise trimestri biomarkerid ning nende taseme muutused ema vereplasmas kolme levinuma kromosoomianeuploidia korral.

**Tabel 1** Praegu sõeluuringutel kasutuses olevate biomarkerite suhtelised näidud kolme levinuma aneuploidia korral. Tabel on koostatud Spencer'i 2007 aasta artiklis avaldatud andmete põhjal (Spencer, 2007).

Seerumi marker	trisoomia 13	Trisoomia 18	Trisoomia 21
<b>Esimene rasedustrimester</b>			
NT	+++	+++	+++
PAPP-A	---	---	---
Vaba $\beta$ -hCG	--	---	+++
<b>Teine rasedustrimester</b>			
AFP	+	---	---
hCG	0	---	+++
uE3	0	---	---
Inhibiin A	0	-	+++

+++ kõrge

+ kergelt tõusnud

- kergelt langenud

-- langenud

--- madal

0 normis



## **2. Rakuvabad nukleiinhapped ema veres**

Traditsioonilise sõeluuringu oluliseks puuduseks on väga suur valepositiivsete tulemuste hulk. Täpsemad näitajad selle kohta on toodud peatükis „Sõeluuringu ja cffDNA testide võrdlus“. Sellest tulenevalt on pidevalt otsitud paremaid ja täpsemaid sõeluuringumeetodeid loote kromosoomhaiguste ning teiste geneetiliste haiguste tuvastamiseks. Loote rakkude esinemine ema organismis tuvastati juba 1893. aastal, mil Schmorl tuvastas loote rakud ema kopsuvereringest (McEwan, 2005). Loote rakkude leidmine ema verest on siiski väga harv juhus. Normaalse raseduse korral leidub ühes milliliitris ema veres kõigest 1-6 loote rakku. Sellest tulenevalt vajaks analüüs küllalt suurt hulka lähtematerjali. Kuna loote rakkude kasutamine diagnostikas on komplitseeritud, siis asuti 1990. aastatel otsima alternatiivseid võimalusi loote geneetilise materjali eraldamiseks ema verest ning jõuti loote rakuvaba DNA avastamiseni (Hamada jt, 1993; Krabchi jt, 2001). Viimastel aastatel on siiski ka loote rakkude eraldamine ema verest saanud taas hoo sisse seoses uute tehnoloogiate väljatöötamisega (Calabrese jt, 2012; Choolani jt, 2012; Hatt jt, 2014).

### **2.1. Loote rakuvaba DNA ehk cffDNA**

#### **2.1.1. Avastamine**

Loote rakuvaba DNA tuvastati ema veres esmakordselt 1997. aastal, mil Lo jt uurisid 43 erineva raseduse kestusega ema verd ning leidsid selles Y kromosoomile iseloomulikke järjestusi, mis tõenäoliselt pidid pärinema meessoost loodetest. Katsetes määrasid nad Y kromosoomil asuvat *DYS14* järjestust, mis on heaks markeriks Y kromosoomi olemasolu tuvastamiseks. Katsed viidi läbi nii ema vereplasma kui -seerumiga ning nende tulemusel jõuti järeldusele, et plasma on parem cffDNA allikas kui seerum. Uuritud 30st poisi sünnitanud naisest leiti Y kromosoomi spetsiifiline järjestus 24 ema veres. Analüüsid raseduse kestuse seost cffDNA hulgaga ema veres järeldasid nad, et cffDNA hulk ema veres kasvab raseduse jooksul (Lo jt, 1997).

#### **2.1.2. Päritolu**

Küllalt pikka aega arutleti selle üle, mis võiks olla cffDNA allikas ema veres. Üheks uuritavaks versiooniks olid loote vereloomerakud, mis on läbinud platsentaalbarjääri, jõudnud ema verre ning läbivad seal apoptoosi. Kuna ema veres olevate tervete rakkude hulk on siiski küllalt väike, järeldasid teadlased, et cffDNA ema veres on ilmselt pärit mitmest allikast (Sekizawa jt, 2000). Zhong jt analüüsisid normaalsete, preeklampsiaga ning enneaegse sünnitusega lõppenud raseduste korral cffDNA kontsentratsiooni rasedate veres nii raseduse

esimesel kui teisel trimestril. Samal ajal määrasid nad ka loote rakkude hulga raseda veres. Probleemsete raseduste korral oli cffDNA tase raseda veres tõusnud, kuid loote rakkude arv ei muutunud. Sellest järeldasid nad, et cffDNA ei ole pärit loote rakkudest (Zhong jt, 2002).

Lõplikult lükati loote rakkude kui cffDNA allika teooria ümber 2003. aastal, mil Guibert jt viisid läbi uuringu, mille käigus vaadeldi 27 kunstliku viljastamise läbinud naist. Viiel juhul rasedus katkes, kuid 22 rasedust kulgesid eduka lõpuni. Neist rasedustest kümnel juhul oli vähemalt üks lastest poiss. Ema veres määrati Y kromosoomil asuva *SRY* geeni järjestusi kvantitatiivse reaalaaja PCR (ingl. k. *quantitative real-time PCR*, qPCR) abil. Selle tulemusel leiti, et kõige varem oli ema veres võimalik selle geeni esinemine tuvastada 18. päeval pärast embrüo siirdamist. Kõigi kümne patsiendi veres oli *SRY* geen määratav 37. päevaks pärast embrüo siirdamist. Kuna loote DNA on ema verest tuvastatav enne loote ja platsenta vahelise vereringe tekkimist, on väga tõenäoline, et cffDNA satub ema verre trofoblasti rakkudest (Guibert jt, 2003).

2005. aastal avaldasid Bischoff jt ülevaateartikli, kus võeti kokku varasemad teooriad rakuvabade nukleiinhapete päritolust ning neile tuginedes teostati katsed, milles näidati, et cffDNA ema veres võib olla pärit platsentast eralduvatest apoptootilistest kehakestest või olla kinnitunud nukleosoomide külge (Bischoff jt, 2005).

2007. aastal leidis kinnitust, et cffDNA allikaks ema veres on just trofoblasti rakud. Alberry jt uurisid rasedusi, mille puhul oli tõestatud embrüo puudumine, kuid oli arenenud koorion. Näidati, et ka loote puudumisel, esineb ema veres cffDNA (Alberry jt, 2007)). Järelikult on just trofoblasti rakud need, millest cffDNA ema verre satub.

Rasedusega seotud hea diagnostilise markeri üheks eelduseks on, et pärast rasedust see elimineeritakse ema verest kiiresti. 1999. aastal näitasidki Lo jt, et cffDNA kaob ema verest ühe päeva jooksul, valdaval enamusel juhtudest isegi kahe tunni jooksul pärast sünnitust. Keskmise cffDNA poolväärtusaeg oli 16,3 minutit (Lo jt, 1999).

## **2.2. Loote rakuvaba RNA ehk cffRNA**

### **2.2.1. Loote rakuvaba mRNA avastamine ja eraldamine**

Loote rakuvaba DNA tuvastamine ema verest avas prenataalses diagnostikas täiesti uue arengutee. Ühtlasi suunas see teadlasi otsima ka teisi võimalikke uusi diagnostilisi markereid ema verest. Üheks selliseks, mille olemasolu ka 2000. aastal tõestati, on loote rakuvaba RNA ehk cffRNA. Poon jt analüüsisid 58 naise vereproove ning määrasid neis loote päritolu soospetsiifilise mRNA olemasolu. Nad eraldasid vereproovidest kogu RNA, teostasid Y-kromosoomi spetsiifiliste praimerite abil pöördtranskriptsioon-PCR (ingl. k. *reverse transcription PCR*; RT-PCR) ja sellele järgnevalt geelelektroforeesi. Analüüsi tulemusel

selgus, et ema verest on võimalik tuvastada ka lootespetsiifilist RNAd, kuid erinevalt cffDNAst suutsid teadlased selles katses tuvastada vaid väikese osa Y kromosoomi kandvatest loodetest (varases raseduses 22%, hilises 63%). Arutleti, et üks põhjuseid selle taga võib olla cff mRNA väiksem stabiilsus ema veres (Poon jt, 2000).

Esialgsele cffRNA olemasolu tõestamisele järgnenud uuringud on keskendunud nii cffRNA eraldamise kvaliteedi tõstmisele kui uute lootespetsiifiliste RNA järjestuste tuvastamisele ema verest. Ng jt suutsid 2003. aastal tuvastada ema verest reaallaja kvantitatiivse pöördtranskriptsioon-PCRi (ingl. k. *real-time quantitative reverse transcription PCR*; RT-qPCR) abil kahe platsentas ekspresseeruva geeni mRNA kõigis analüüsitud proovides (Ng jt, 2003). Maron jt tuvastasid 2007. aastal 157 lootespetsiifilist potentsiaalselt biomarkeriks sobivat transkripti ema verest. Neist 27 osutus olevat seotud luu- ja lihaskoe, epiteelide või närvikoe arenguga, 5 sensorsete funktsioonidega, 17 immuunsüsteemiga ning 22 olid seotud loote füsioloogiliste protsessidega, avaldusid ainult loote ja vastsündinu kudedes või platsentas või olid Y kromosoomi spetsiifilised (Maron jt, 2007).

Oluline erinevus cffDNA ja cffRNA vahel on nende käitumine raseduse jooksul. Kui cffDNA kontsentratsioon tõuseb pidevalt raseduse käigus, siis cff mRNA puhul sõltub konkreetse RNA kontsentratsioon raseduse staadiumist. Platsentas ja lootes ekspresseeritakse gene erinevatel loote arenguetappidel erinevalt. Näiteks  $\beta$ -hCG ekspressioon ja seega ka kontsentratsioon ema veres on suurim raseduse esimesel trimestril ning langeb raseduse hilisemates etappides minimaalsele tasemele. Samas inimese platsenta laktogeeni (hPL) kontsentratsioon tõuseb pidevalt raseduse käigus ning saavutab suurima taseme raseduse lõpus. Sarnaselt cffDNA-ga eemaldatakse cffRNA ema verest pärast sünnitust 24 tunni jooksul (Ng jt, 2003). See teeb ka cffRNA-d potentsiaalseks sobivaks rasedusega seotud biomarkeriks. Tuleb siiski rõhutada, et iga konkreetse potentsiaalse cffRNA markeri puhul tuleks selle sobivust individuaalselt hinnata.

2009. aastal uurisid Heung jt nelja erineva lootespetsiifilise mRNA kontsentratsiooni ema vereplasmas võrrelduna täisverega. Lisaks teostati ka kahe geeni – platsentaspetsiifiline geen 4 (*PLAC4*) ja koorioni somatomammotropiin hormooni sarnane 1 geeni (*CSHL1*) - transkripti puhul alleelne genotüüpiseerimine. Sellest ilmnes, et vereplasmas oli tuvastatav vaid loote mRNA samal ajal kui ema täisveri sisaldas nii loote kui ema vastavaid allelele (Heung jt, 2009). Samas tuleb tõdeda, et katses teostati alleelne genotüüpiseerimine vaid kahe konkreetse RNA suhtes ning sellest ei saa teha põhjanevaid järeldusi kõigi ema verest tuvastatavate loote mRNAde suhtes.

Jorges jt näitasid 2006. aastal, et lisaks veeniverele sobib cffRNA eraldamiseks ka sõrmeotsast võetud vereproov, mis on kogutud filterpaberile ja kuivatatud. Nad kogusid

kõigest 6-7 tilka verd igalt naiselt ning suutsid seda analüüsides tuvastada RT-qPCR abil platsentaspetsiifilise mRNA ema veres. Lisaks näitasid nad, et selliselt kuivatatuna on platsentaspetsiifilise mRNA kogus ema veres stabiilne kuni 4 nädalat pärast proovi kogumist. Selle uuringu puhul tuleb küll tõdeda, et katsealuste hulk oli väike (10 proovi) ning igast vereproovist tehti vaid üks kordusanalüüs ja seetõttu ei pruugi tulemused olla statistiliselt usaldusväärsed. Selline proovi kogumise viis lihtsustaks aga tunduvalt proovide transporti (Jorgez jt, 2006).

### 2.2.2. CffRNA diagnostikas

CffDNA suur puudus on see, et seda on ema DNAST küllalt keerukas eraldada ning eraldamise jaoks on vaja lootel tuvastada isapoolse päritoluga polümorfisme või epigeneetilisi erinevusi ema ja platsentakoe vahel, mida saaks ema veres määrata. Loote rakuvaba RNA analüüsil ei ole ema ja loote materjali eraldamine üldjuhul nii keerukas, sest analüüsiks on võimalik valida vaid platsentakoes avalduvad geenid.

Oudejans jt sõnastasid 2003. aastal avaldatud artiklis viis kriteeriumi, mis peavad olema täidetud selleks, et konkreetne cffRNA sobiks Downi sündroomi diagnostiliseks markeriks:

1. kandidaatgeen peab olema kodeeritud 21. kromosoomis;
2. kandidaatgeen peab asuma Downi sündroomi kriitilises regioonis;
3. kandidaatgeen peab avalduma normaalses platsentakoes varases raseduses;
4. kandidaatgeen peab olema 21. kromosoomi trisoomia korral platsentas üleekspresseeritud;
5. vastav RNA peab olema varases rasedusjärgus tuvastatav ka ema veres.

Kirjandusallikatele ning oma varasematele uuringutele tuginedes valisid nad välja 3 geeni (*LOC90625*, *PTTG1IP* ja *DSCR4*), mille kohta oli teada, et need vastavad esimesele neljale kriteeriumile. Antud uurimuse eesmärgiks oli selgitada, kas väljavalitud geenid ekspresseeruvad platsentakoes ka raseduse esimesel trimestril ja kas transkriptid on tuvastatavad ema vereplasmas. Ekspressioonitugevuse järgi platsentakoes valiti edasisteks analüüsideks välja *LOC90625* geen. Selle geeni mRNA osutus tuvastatavaks ka ema 9.–13. rasedusnädalal kogutud vereplasmast. Kontrollgrupina kasutati mitterasedaid naisi ning määramisel ei esinenud ühtegi valepositiivset ega valenegatiivset tulemust. Samas oli uuringu valim küllalt väike (N=25) ja statistilist analüüsi tulemustele ei teostatud (Oudejans jt, 2003). Sellest hoolimata on tegu olulise tööga, mis näitab, et ka cffRNAd oleks edukalt võimalik kasutada mitteinvasiivses prenataalses diagnostikas.

Cff mRNA kasutamist teiste aneuploidiate diagnostikas on vähem uuritud kui 21. kromosoomi trisoomia korral. Ng jt näitasid 2004 aastal, et 18. kromosoomi trisoomia korral

on  $\beta$ -hCG mRNA tase raseduse esimesel trimestril ema vereplasmas tunduvalt madalam kui normaalse raseduse või 21. kromosoomi trisoomia korral. Samas tuli katses välja, et vaid  $\beta$ -hCG mRNA määramist ei saa siiski 18. kromosoomi trisoomia diagnoosimiseks kasutada, sest esines märkimisväärselt suur kõikumine selle mRNA tasemes rasedatel grupisiselt ning tulemused kattusid osaliselt ka normaalse raseduse korral tuvastatutega. See näitab, et praeguse esimese trimestri sõeluuringus oleva  $\beta$ -hCG valgumääramise asemel saaks markerina kasutada ka vastavat mRNA-d, kuid sarnaselt  $\beta$ -hCG valgule siiski vaid kombinatsioonis teiste markeritega (Ng jt, 2004).

Üks võimalus cff mRNA hulga alusel kromosoomi koopiaarvu hinnata on RNA ühenukleotiidsete polümorfismide (ingl. k. *single nucleotide polymorphism*, SNP) alleelse suhte kaudu. Sel juhul on suurimaks puuduseks, et testida saab siiski vaid konkreetse SNP suhtes heterosügootseid looteid. Kuid antud meetodi eelisena cffDNA kasutamise ees võib välja tuua, et RNA puhul ei ole kõrget segavat ema geneetilise materjali fooni. Kui valida analüüsiks konkreetne cff mRNA, mis ekspresseerub vaid platsentakoes, siis ei ole selle eraldamine ema RNAST kuigi töömahukas ning saadavad tulemused on usaldusväärsed (Lo jt, 2007b).

### 2.2.3. Loote rakuvaba miRNA

MikroRNAde (miRNAde) – lühikeste geeniekspressiooni reguleerivate RNAde – olemasolu tuvastati 2001. aastal. Hilisemad uuringud on leidnud, et raseduse jooksul ekspresseeritakse mitmeid platsentaspetsiifilisi miRNAsid, mis on heaks biomarkeri kandidaadiks (Chim jt, 2008b; Luo jt, 2009; Kotlabova jt, 2011). Lisaks on ka miRNAde puhul näidatud, et nad elimineeritakse ema verest 24 tunni jooksul pärast sünnitust (Chim jt, 2008b; Luo jt, 2009).

Kamieh-Milz jt võrdlesid erinevate miRNAde profiili ema vereplasmas euploidsete loodete ning 21. kromosoomi trisoomia korral. Esmalt tuvastasid nad 36 miRNA-d, mille tase ema veres erines oluliselt Downi sündroomiga loote korral võrrelduna euploidse lootega. Kuna ühegi võimaliku marker-miRNA puhul ei tuvastatud statistiliselt olulist erinevust kahe grupi vahel, kombineeriti analüüsil 10 või 20 erineva miRNA tulemused. Sel moel õnnestus nii euploidsed kui aneuploidsed looted õigesti tuvastada (Kamhieh-Milz jt, 2014).

Loote kromosoomianeuploidiate diagnostika on vaid üks võimalikke loote- või platsentaspetsiifiliste miRNAde kasutusalasid. Samuti on arutletud näiteks loote kaasasündinud südamedefektide varase diagnoosimise võimalikkuse üle südame arengu regulatsioonis osalevate miRNAde abil (Yu jt, 2011). Sarnast põhimõtet järgides võiks uurida

ka muude organite arenguga seotud miRNAsid ning võimalusel kasutada neid loote arenguhäirete diagnostikas.

Lisaks loote arenguhäirete tuvastamisele võiks cffRNA leida kasutust ka preeklampsia diagnostikas. Erinevate miRNAde taseme kõikumisi võrreldes normaalse rasedusega on preeklampsia korral näidatud nii raseduse varases kui hilises staadiumis (Gunel jt, 2011; Ura jt, 2014). Ura jt tuvastasid ema plasmas 19 miRNAd, mille kontsentratsioon oli juba varases raseduses tavapärasest kõrgem või madalam kui emal kujunes hiljem välja preeklampsia. Sellised miRNAd võiksid olla juba raseduse varases järgus head markerid preeklampsia tekke ning võimalik, et edasiste uuringute tulemusel ka selle raskuse ennustamiseks. See võimaldaks juba raseduse alguses hinnata võimalikke riske ja modifitseerida raviplaane ning päästa seeläbi nii emade kui vastsündinute elusid. Erinevate miRNAde samaaegne määramine võiks olla perspektiivikas nii preeklampsia, aneuploidiate kui organsüsteemide arenguhäirete testimiseks, kuid see eeldab põhjalikke uuringuid, et tuvastada vastavateks biomarkeriteks sobilikud miRNAd.

Hetkel on RNA-põhisel lähenemisel siiski mitmeid puudusi, mis muudavad selle kasutamise küsitavaks. Üheks murekohaks on mRNAde ebastabiilsus ema veres, mis on tingitud erinevatest ribonukleaasidest, miRNAde puhul ei ole antud probleem kriitiline. Lisaks on osutunud problemaatiliseks ka sobilike diagnostiliste mRNAde leidmine, mis vastaksid kõigile ülaltoodud kriteeriumitele. Praeguseks on leitud vaid üks geen 21. kromosoomis, millelt sünteesitud RNA sobiks trisoomiariski hindamiseks. Samuti esineb siin ka suurem valepositiivsete tulemuste saamise risk kui cffDNA analüüsil (Wagner jt, 2014). Arvestades ülaltoodud põhjuseid ning fakti, et kõik praegu kommertsiaalselt kättesaadavad mitteinvasiivsed prenataalsed testid on kõik cffDNA määramisel põhinevad, ei käsitleta käesolevas bakalaureusetöös cffRNAga läbi viidud uuringuid ja meetodikaid põhjalikumalt.

### **3. Mitteinvasiivne sünnieelne testimine (NIPT) cffDNA baasil**

Avastamisest alates on cffDNA olnud paljulubav diagnostiline vahend. Eelmise aastakümne keskpaigaks oli selle päritolu selge ning teadustööde põhisuunaks sai cffDNA kasutusvõimaluste uurimine. Üks esimesi cffDNA kasutusi kliinilises praktikas oli loote soo määramine suguliiteliste haiguste vältimiseks (Scheffer jt, 2010). Samuti on cffDNA kasutamine üsna levinud praktika loote reesusfaktori määramisel (Finning jt, 2002; Geifman-Holtzman jt, 2006). Loote reesusfaktori kindlaksmääramisel saab vajadusel reesusnegatiivsele emale süstida anti-D humaanimmunoglobuliini, hoidmaks ära organismi sensibiliseerumist ([http://193.40.10.165/SPC/Hum/SPC\\_21794.pdf](http://193.40.10.165/SPC/Hum/SPC_21794.pdf)<sup>4</sup>).

Ka rasedusega seotud häirete määramiseks saab cffDNA analüüsi kasutada. Eelmainitud võimalikust reesuskonflikti tekkest ema ja loote vere vahel võib-olla olulisemgi on platsenta arengu- ja kasvuhäirete tuvastamine. Ilmselt kõige enam uuritud rasedusega seotud platsentat puudutav tervisehäire on preeklampsia. Varase algusega preeklampsia puhul on näidatud cffDNA hulga tõusu ema veres juba raseduse esimesel trimestril. See on oluline võimalus tuvastada potentsiaalseid arenevaid preeklampsia juhte enne kliiniliste sümptomite avaldumist. On näidatud, et cffDNA hulk raseda veres tõuseb potentsiaalse preeklampsia puhul kahel korral – 17. ja 28. rasedusnädala vahel ning ligikaudu 3 nädalat enne sümptomite väljakujunemist. Hetkel on veel selgusetu, kas või kuivõrd on cffDNA hulk ema veres kasutatav preeklampsia tekke ennustamiseks, kuid kui preeklampsia on juba välja kujunenud, on cffDNA hulga dünaamikat ema veres jälgides võimalik ennustada preeklampsia raskust. Samuti on näidatud, et preeklampsia korral on häirunud cffDNA eliminatsioon ema verest (Hahn jt, 2011; Taglauer jt, 2014).

Lisaks rasedusega seotud häirete ning suguliiteliste haiguste diagnostikale, on cffDNA kasutuses ka kromosoomianeuploidiate, monogeensete haiguste ning mitmete mikrodeletsioonide ja -insertsioonide tuvastamisel.

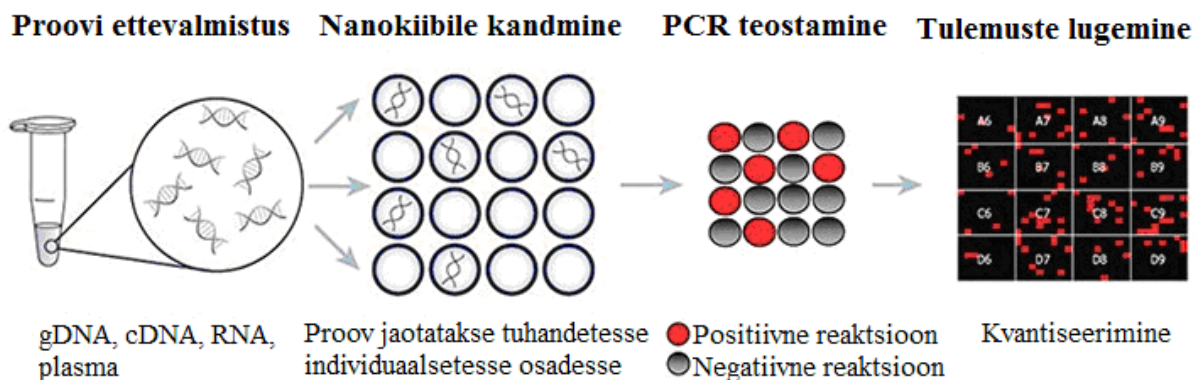
#### **3.1. Kromosoomianeuploidiad**

Kromosoomianeuploidiate prenataalne määramine on üks cffDNA enimkasutatud rakendusi. Selles suunas toimuvad intensiivsed uuringud ning mitmel pool maailmas pakutakse rasedale juba mitmeid mitteinvasiivseid teste tavalisemate aneuploidiate tuvastamiseks (Allison, 2013). Paraku on nende testide läbiviimisel tänasel päeval veel mitmeid tehnoloogilisi ja ka bioloogilisi piiranguid ning neid ei saa kasutada kindla diagnoosi andmiseks, vaid iga positiivne tulemus vajab järeluuranguid ja potentsiaalselt ka kinnitamist kasutades invasiivset testi. Siiski pakuvad need testid võimaluse vähendada invasiivsete

protseduuride hulka loote aneuploidiate määramiseks (Norton jt, 2015). Samas on vajalikud edasised uuringud, et parandada olemasolevate testide täpsust ning töökindlust, aga ka leida efektiivsemaid ja odavamaid meetodikaid aneuploidiate tuvastamiseks cffDNA baasil.

Kommertsiaalsetes NIP testides on põhimetoodikana kasutusel teise põlvkonna sekveneerimine (ingl. k. *massively parallel sequencing*, MPS), kuid lähenemine on mõnevõrra erinev. Panorama<sup>TM</sup> Prenatal Screen (Natera Inc.) test põhineb ema vereplasmast eraldatud cffDNA sekveneerimisel ning ema ja loote SNP-de võrdlemisel. Teiste pakutavate NIP testide puhul on samuti tegu MPS meetodiga, kuid nende puhul kasutatakse järjestuste loendamist ning iga konkreetse kromosoomi loenduste põhjal statistilise analüüsi teostamist. MPS kasutamist NIP testides on põhjalikumalt tutvustatud alapeatükis „NIPT teise põlvkonna sekveneerimise teel“.

Teine levinum meetodika mitteinvasiivsete sünnieelsete testide uuringutes on digitaalne PCR (Joonis 2). Digitaalne PCR põhineb sadade kuni isegi tuhandete paralleelsete PCR reaktsioonide teostamisel samast proovist. Proov on niivõrd palju lahjendatud, et osadesse reaktsioonidesse ei satu amplifitseeritavat DNAd. Selliselt on võimalik amplifitseerimise järel leida kui suures osas reaktsioonikambrites on PCR produkt olemas ning sellest lähtudes arvutada algproovi kontsentratsioon (Baker, 2012).



**Joonis 2.** Digitaalse PCR põhimõtteline skeem. Analüüsitav proov lahjendatakse ning kantakse nanokiibile. Proov on nii lahjendatud, et osadesse reaktsioonidesse ei satu ühtegi DNA (RNA) molekuli. Loetakse kokku positiivsete reaktsioonide hulk, kus on amplifitseeritav materjal sisaldunud ning selle põhjal arvutatakse algproovi kontsentratsioon. (modifitseeritud <http://www.lifetechnologies.com/ee/en/home/life-science/pcr/digital-pcr.html><sup>5</sup>).

Ka see meetod põhineb järjestuste loendamisel ning järgneval statistilisel analüüsil. Lo jt katsetasid digitaalset PCR-i kromosoomianeuploidiate tuvastamisel ning jõudsid järeldusele, et tegemist on küll odavama meetodiga kui MPS, kuid see vajab suuremat ema vere kogust



(15 ml) statistiliselt oluliste diagnostiliste tulemuste saamiseks (Lo jt, 2007a). Vereproovi kogust võimaldaks vähendada hea meetod cffDNA fraktsiooni rikastamiseks, kuid praeguseks pole sellist meetodit veel leitud. Enam edu on saanud digitaalse PCR kasutamist monogeensete haiguste mitteinvasiivsel tuvastamisel lootel (Lun jt, 2008b; Tsui jt, 2011).

### **3.2. Monogeensed haigused**

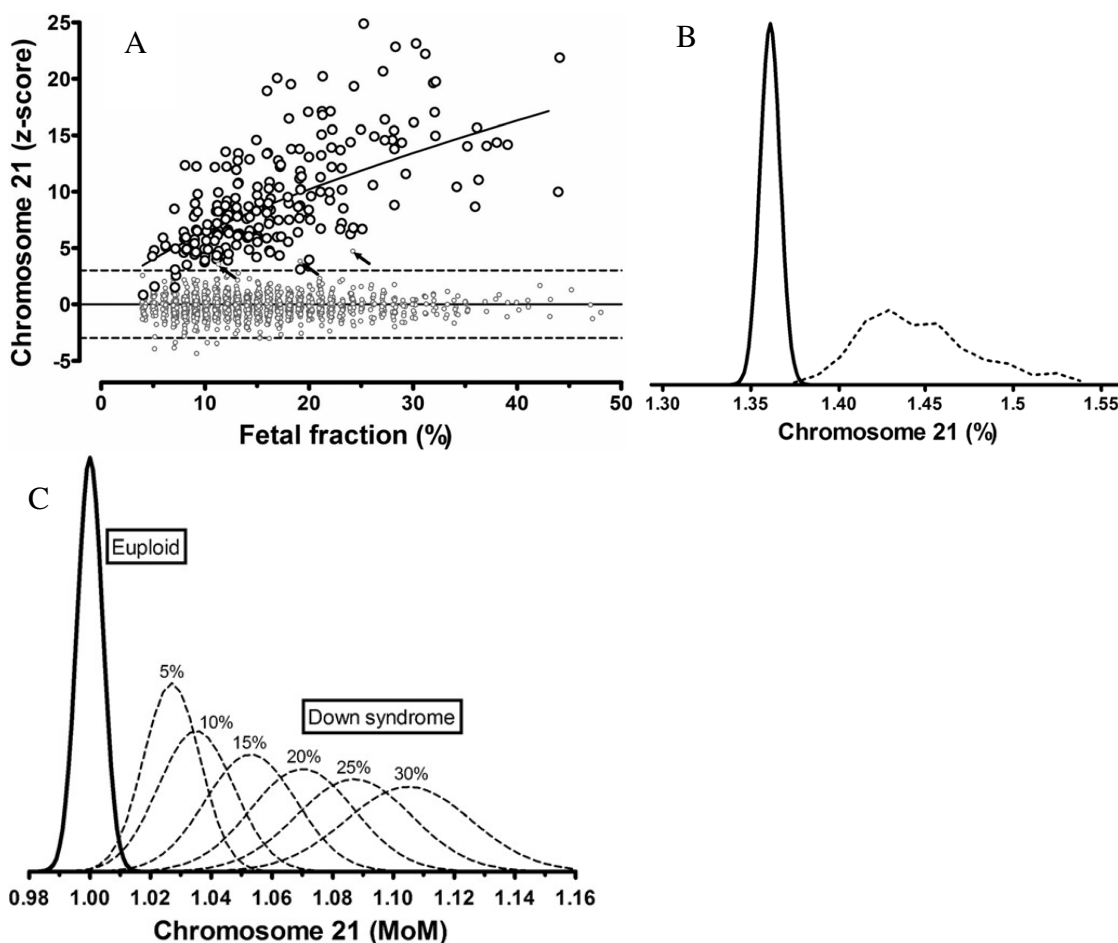
Lisaks kromosoomianeuploidiate tuvastamisele on viimasel ajal toimunud märkimisväärne areng ka ühe geeni mutatsioonidest tingitud haiguste diagnoosimisel lootel. Ühe geeni mutatsioonist põhjustatud haiguste tuvastamine on mitmel põhjusel komplitseeritum kui aneuploidiate määramine. Loote cfDNA hulk ema veres on siiski väga väike ning ema DNA võib märkimisväärselt määramist segada juhul kui ema on haigust põhjustava alleeli kandja. Praeguste tehnoloogiliste võimaluste juures saab ema veres määrata vaid neid loote allelele, mis on päritud isalt (Wright ja Burton, 2009). cffDNA sobilikkust võimaliku biomarkerina kasutamiseks on näidatud näiteks selliste haiguste puhul nagu Huntingtoni tõbi (Gonzalez-Gonzalez jt, 2008), akondroplaasia (Chitty jt, 2011), tsüstiline fibroos (Hill jt, 2015), hemoglobiнопaatiad (Lun jt, 2008b; Lam jt, 2012; Papasavva jt, 2013), hemofiilia (Tsui jt, 2011).

### **3.3. Loote cfDNA fraktsiooni suurus ja selle eraldamine ema cfDNAst**

Loote rakuvabale DNAle on iseloomulik, et ta esineb ema veres väga lühikeste lõikudena. Chan jt analüüsisid 21 meessoost loodet kandva raseda vereplasmat ning määrasid seal *SRY* geeni spetsiifilisi primereid kasutades loote DNA lõikude pikkuse. Katses kasutasid nad ühte *forward* praimerit ning kuut erinevat *reverse* praimerit, mis olid disainitud andma erineva pikkusega amplikone. qPCR tulemusel leiti, et üle 313 aluspaari pikkusi *SRY* geeni fragmente ema vereplasmas ei leidu (Chan jt, 2004). Sarnaste tulemusteni jõudsid 2008. aastal ka Norbury ja Norbury – 80% cffDNAst on alla 193 aluspaari pikkune ning üle 300 aluspaari pikkusi lootelt pärit DNA lõike ema vereplasmas pole (Norbury ja Norbury, 2008). Selline cffDNA fragmentide pikkus muudab keeruliseks ka kromosoomiseste koopiaarvu muutuste uurimise.

NIPT rakendamisel on üheks oluliseks takistuseks väga madal loote rakuvaba DNA fraktsioon ema cfDNA taustal. Kui cffDNA fraktsioon ema vereplasmas on 10%, siis on lootel näiteks 21. kromosoomi trisoomia esinemisel kogu selle kromosoomi cfDNA lõikude hulk ema vereplasmas võrreldes euploidse lootega 5% suurem. Samas kui loote fraktsiooni suurus on 4%, siis on trisoomia korral oodatav tõus selle kromosoomi osas vaid 2%. Seetõttu on kommertsiaalsete NIP testide puhul antud ka eelmainitud 4% piir cffDNA fraktsioonile –

madalamaid erinevusi ei suuda praegused meetodid piisavalt täpselt tuvastada (Sparks jt, 2012b) (Joonis 3).



**Joonis 3.** **A.** Loote cfDNA fraktsiooni (x-teljel) ning 21. kromosoomi z-skoori vaheline sõltuvus euploidsete (väikesed ringid) ja aneuploidsete (suured ringid) raseduste korral. Z-skoorid on määratud esimesel ja teisel rasedustrimestril mõõdetud tulemuste kohta. Loote cfDNA fraktsiooni suurenedes kasvab aneuploidia korral ka z-skoor. Katkendliku joonega on näidatud z-skoori piirid -3 ja 3, mille vahele jäävad tulemused loetakse reeglina euploidseteks. Z-skoor on statistiline suurus, mis vastab normaaljaotuse korral standardhälbele keskmisest. Z-skoori väärtus 3 tähendab, et antud väärtus erineb keskmisest kolme standardhälbe võrra. **B.** 21. kromosoomi MPS lugemite (ingl. k. *read*) osakaal kõigi autosoomide lugemitest euploidsete (pidev joon) ja aneuploidsete (katkendjoon) raseduste korral. Euploidsete raseduste korral on tulemused normaaljaotuslikud ning on väga kitsas protsentuaalses vahemikus. Aneuploidsete raseduste korral ei ole tegemist normaaljaotusega ning tulemused varieeruvad väga laias vahemikus. **C.** Kui 21. kromosoomi lugemite osakaalu hinnata ka loote cfDNA fraktsiooni suuruse (% katkendjoonte kohal) kontekstis, on näha, et ka trisoomiaga raseduste korral on tegemist siiski normaaljaotusliku parameetriga, mida mõjutab oluliselt cffDNA fraktsiooni suurus (Canick jt, 2013).

Algselt näitasid Lo jt loote cfDNA fraktsiooni suuruseks ema veres vaid ligikaudu 3-6 % (Lo jt, 1997). Hiljem on täpsemate meetoditega seda uuesti määratud. Lun jt analüüsisid raseduse esimesel, teisel ja kolmandal trimestril kogutud ema vereplasmasid *microfluidics* digitaalse PCR abil. Nad tuvastasid raseduse esimesel ja teisel trimestril cffDNA fraktsiooni keskmise suurusena ligikaudu 10% ning kolmandal trimestril 20%. Nende töö puudusena võib välja tuua Y kromosoomi spetsiifilise geeni tuvastamise ema veres, mille tõttu uuriti vaid meessoost looteid kandvaid rasedaid (Lun jt, 2008a). Lisaks konkreetse geeni kontsentratsiooni tuvastamisele on cffDNA fraktsiooni suurust võimalik määrata ka SNP-de abil, mille suhtes ema on homosügoot ning loode on heterosügoot. Selle lähenemise töökindlust näitasid esimesena Chu jt (Chu jt, 2010). Sparks jt määrasid loote cfDNA fraktsiooni suuruse 192 SNP lookuses ning seejärel ennustasid binoomjaotuse alusel kõige tõenäolisema cffDNA fraktsiooni suuruse (Sparks jt, 2012a). Sarnast meetodit kasutades tuvastasid ka Zimmermann jt loote cfDNA fraktsiooni suuruseks ema veres keskmiselt 12%, kuid see võib varieeruda 2-30% vahel (Zimmermann jt, 2012). Viimase 8 rasedusnädala jooksul esineb märkimisväärne cffDNA kontsentratsiooni tõus ema veres. Selle põhjuseks võib olla platsentaalbarjääri järkjärguline lagundamine raseduse lõppjärgus (Lo jt, 1998).

Kuna NIPT läbiviimisel on oluline võimalikult suur loote cfDNA fraktsioon ema vereplasmas, uurisid Chan jt ka erinevate tehnoloogiliste tegurite mõju ema veres leiduvale kogu rakuvabale DNAle. Nad hindasid vere hüübimise, 24 tundi vereproovi võtmisest hilisema plasma vererakkudest eraldamise, plasma korduva külmutamise ja sulatamise, plasma pikaajalise säilitamise ning eraldatud DNA külmutamise ja sulatamise toimet ning jõudsid järeldusele, et nii vere hüübimine, plasma hilisem eraldamine rakkudest kui ka plasma korduv külmutamine ja sulatamine muudavad märkimisväärselt rakuvaba DNA kontsentratsiooni ja DNA lõikude suurust. Sellest tulenevalt soovitasid nad plasma eraldada 6 tunni jooksul pärast vere võtmist ning võimalusel vältida ka korduvaid plasma külmutamisi ja sulatamisi. Oma katsetes kasutasid nad vere võtmiseks antikoagulandina EDTAd (etüleendiamiintetraetaanhape) sisaldavaid katsuteid (Chan jt, 2005). Tänapäevaks on olemas efektiivsemad meetodid rakuvaba DNA stabiliseerimiseks. Üks võimalus on kasutada firma Streck (Omaha, NE, USA) katsuteid, mis sisaldavad säilitusainet, mis stabiliseerib vere tuumaga rakke, takistab nende lüüsumist ning seeläbi ka genoomse DNA vabanemist (<http://www.streck.com/product.aspx?p=Cell-Free%20DNA%20BCT><sup>6</sup>).

Üks olulisemaid faktoreid, mis loote cfDNA fraktsiooni suurust mõjutab on raseda kehakaal. Mida suurem on raseda kehakaal, seda väiksem on loote cfDNA fraktsioon. Ema suitsetamine suurendab cffDNA fraktsiooni. Lootepoolsetest faktoritest, mis cffDNA fraktsiooni suurust mõjutavad, on olulisemad loote pikkus ning 21. kromosoomi trisoomia

esinemine, mis mõlemad suurendavad loote rakuvaba DNA osa ema vereplasma kogu cfDNAs. Samas 18. kromosoomi trisoomia esinemine cffDNA fraktsiooni suurus ei mõjuta. Loote rakuvaba DNA fraktsiooni suurus sõltub ka ema rassist (Ashoor jt, 2013a). Ema suitsetamisharjumuste mõju osas cffDNA fraktsiooni suurusel on siiski vastukäivad andmed. 2015. aastal viisid Tarquini jt läbi uurimuse, mille tulemusel jõudsid järeldusele, et ema suitsetamine ei vähenda loote cfDNA fraktsiooni suurus oluliselt ning NIPT saaks pakkuda ka suitsetavatele emadele (Tarquini jt, 2015). Nende uuringu valim oli siiski kümme korda väiksem kui Ashoor jt uuringus ning ka valimi väiksuse tõttu ei pruukinud seos avalduda.

Kuna NIP testide tulemus sõltub suurel määral loote cfDNA fraktsiooni suurusel ema vereplasmas, on pikka aega otsitud viise selle suurendamiseks enne analüüsi. Üks võimalus on kasutada ära loote cfDNA lõikude suurus ning analüüsida vaid väiksemaid cfDNA lõike. Seda katsetasid Li jt, eraldades geelelektroforeesil erineva pikkusega DNA fragmendid ning analüüsides neid PCR abil Y kromosoomispetsiifiliste praimeritega. Selle tulemusel järeldasid nad, et loote cfDNA fraktsiooni ema cfDNAs oleks võimalik DNA fragmentide suuruse alusel suurendada. Samas tuleb arvestada, et selline geelelektroforeesil eraldamine on kindlasti aja- ja töömahukas ning suurendab märkimisväärselt ka proovi saastumise võimalust (Li jt, 2004).

Alternatiivne võimalus ema cfDNA rikastamiseks cffDNA suhtes on kasutada ära epigeneetilisi erinevusi platsenta ja ema rakkude vahel. Seda näitasid Chim jt nii 18. kui ka 21. kromosoomi korral. 18. kromosoomi puhul esineb erinev metülatsioonimuster platsenta ja ema vererakkude vahel *maspin* (*SERPINB5*) geeni promotoraalal puhul, kusjuures platsentas on vastav ala hüpometüleeritud ning ema vererakkudes hüpermetüleeritud. Sarnaseid alasid, kus platsentakoe rakkudes on DNA hüpometüleeritud ja ema vererakkudes hüpermetüleeritud, tuvastasid nad 21. kromosoomil üheksa (Chim jt, 2005; Chim jt, 2008a). Epigeneetiliste erinevuste kasutamisel on siiski üks väga oluline puudus – see meetodika vajab bisulfiti töötlust, mille käigus toimub tsütosiini deamineerimine uratsiiliks, 5-metüültsütosiini sealjuures ei deamineerita. Seejärel produktid sekveneeritakse. Tsütosiini deamineerimine toimub efektiivselt 55°C juures 4-18 tunni jooksul või 95°C juures 1 tunni jooksul. Sellised pikaajalised kõrgeid temperatuurid põhjustavad aga vähemalt 85% DNA lagunemise ning nii kaotaksime, juhul kui loote DNA on hüpometüleeritud võrreldes ema DNAGA, väga olulisel määral analüüsivat materjali (Grunau jt, 2001).

Chim jt tuvastasid 21. kromosoomi metülatsioonimustrite uurimisel ka 13 sellist ala, kus loote DNA oli hüpermetüleeritud võrreldes ema DNAGA (Chim jt, 2008a). Lisaks tuvastasid Chan jt ka 3. kromosoomil sarnase ala – *RASSF1A* geeni promotoraalal (Chan jt, 2006). Tong jt üritasid ka euploidseid ja 21. kromosoomi trisoomiaga looteid eraldada kasutades selleks *RASSF1A* geeni promotoraalal, ühte 21. kromosoomi hüpermetüleeritud

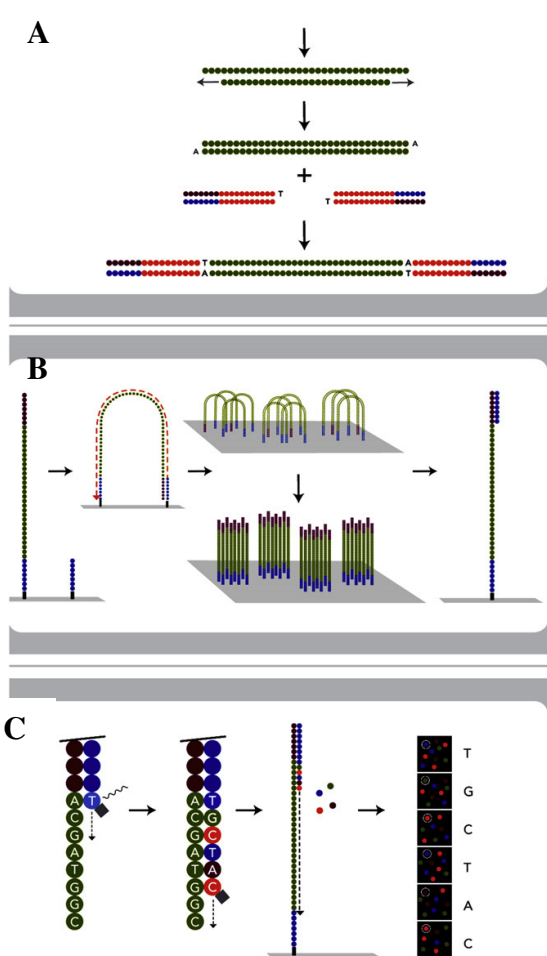
aladest (*HLCS*) ning võrdluseks ka *ZFY* lookust Y kromsoomil. Nad teostasid bisulfiti töötlust, millele järgnes digitaalne PCR ning kromosoomide osakaalu analüüs (ingl. k. *chromosome-dosage analysis*). Paraku ei erinenud tuvastatud 21. ja 3. kromosoomide järjestuste hulga üksteisest piisavalt, et sel moel oleks võimalik euploidseid ja aneuploidseid looteid eraldada. *ZFY* lookuse võrdluses *HLCS* lookusega tuvastati küll enamus looteid korrektselt, kuid kahjuks on see kasutatav vaid meessoost loodete korral (Tong jt, 2010). Samas annavad *ZFY* lookuse kasutamisel saadud tulemused siiski lootust, et kui referentslookusena kasutada mõnda muud ala peale *RASSF1A* või 21. kromosoomil analüüsida mõnda muud lookust, võiks see meetod töötada ka kromosoomianeuploidiate tuvastamisel.

Tunduvalt efektiivsem ja väiksemate kadudega meetod epigeneetiliste mustrite alusel ema ja loote cfDNA eraldamiseks on metüleeritud DNA immunosadestamine (ingl. k. *methylated DNA immunoprecipitation*, MeDIP). Selle meetodiga analüüsisid Papageorgiou jt 21., 18., 13., X ja Y kromosoomi ning leidsid üle 2000 ema veres ja platsentakoes erinevalt metüleeritud ala. Neid alasid analüüsiti kõrglahutuse ning -katvusega oligonukleotiid proovidega kiipide (ingl. k. *high-resolution tiling oligonucleotide array*) abil ning suurema erinevusega aladele teostati kontrollanalüüs ka qPCR abil. Enamus erinevusi asus mittekodeerivates regioonides (Papageorgiou jt, 2009). Samas töögrupis katsetati edukalt ka MeDIP töötlust ning qPCR abil 21. kromosoomi trisoomia tuvastamise võimalikkust lootel ning töötati välja algoritm tulemuste tõlgendamiseks (Tsaliki jt, 2012). Samas on Tong jt välja toonud mitmeid küsitavusi eelkirjeldatud katsetes. Neil ei õnnestunud ka Tsaliki jt tulemusi reprodutseerida (Tong jt, 2012).

Kliinilisse praktikasse pole viimane meetod paraku veel jõudnud hoolimata sellest, et tegu on loote soost ja polümorfismidest sõltumatu meetodiga. Üks põhjus võib olla see, et platsentakoes varieerub genoomi metülatsioonaste erinevates regioonides raseduse jooksul ning ala, mis raseduse esimesel trimestril on hüpermetüleeritud võib kolmandal trimestril olla hüpometüleeritud ning see muudab universaalsete markerite leidmise keeruliseks. Lisatäpsust analüüsile annaks digitaalse PCR kasutamine qPCR asemel. Kokkuvõtlikult võib öelda, et praegusel hetkel ei ole tuvastatud ühtegi töökindlat ja head meetodit loote cfDNA fraktsiooni suurendamiseks. Ilmselt kõige paljutootavam on siiski MeDIP. Kui selle meetodiga õnnestuks cffDNA osa ema vereplasmas suurendada, annaks see kindlasti uue tõuke ka digitaalse PCR kasutamiseks NIP testimises.

### 3.4. NIPT teise põlvkonna sekveneerimise teel

Teise põlvkonna sekveneerimine ehk mass-sekveneerimine (MPS) (Joonis 4) on muutnud DNA järjestuste sekveneerimise tunduvalt kiiremaks ning oluliselt vähendanud töö mahtu ning sekveneerimise maksumust võrreldes Sangeri sekveneerimisega. Samas on siin ka mitmeid olulisi puudusi. Kuna sekveneerimisel saadavad järjestused on küllalt lühikesed, võib kordusjärjestusi sisaldavate alade sekveneerimine osutada problemaatiliseks. Lisaks on uute genoomide *de novo* kokkupanemine keerulisem kui Sangeri sekveneerimisel, mille abil saab tunduvalt pikemaid DNA lõike. Vähemalt sama oluline puudus on suurem vigade hulk MPS-l (Tucker jt, 2009). Selle kompenseerib osaliselt suur lugemite hulk, mis ühe DNA positsiooni kohta saadakse.



**Joonis 4.** Illumina, Inc. MPS tehnoloogia põhimõtteline skeem. Tehnoloogia põhineb DNA ahelate sekveneerimisel nende sünteesi käigus. **A.** Esmalt pikad DNA ahelad fragmenteeritakse, saadud DNA lõikude otsad tömbistatakse ning nende 3' ja 5' ottesse ligeeritakse erinevad adapterid. **B.** Seejärel kantakse uuritav DNA kiibile (*Flow-cell*), millele on kinnitatud kahte tüüpi oligonukleotiidseid järjestusi, mis on komplementaarsed DNA ahelate eri ottesse kinnitatud adapteritega ning käituvad uue DNA ahela sünteesil praimeritena. DNA polümeraas sünteesib uue DNA ahela, mis on oligonukleotiidse järjestuse kaudu kinnitatud kiibi pinnale. Matriitsahel eemaldatakse ning allesjääva ahela vabas otsas olev, adapterilt sünteesitud oligonukleotiidne järjestus hübridiseerub lähedalasuva plaadile kinnitatud

komplementaarse oligonukleotiidiga – tekib DNA sild. Oligonukleotiid käitub ka siin praimerina ning DNA polümeraas sünteesib uue DNA ahela, mis on samuti plaadi külge kinnitunud. Edasi leiab aset sildamplifikatsioon, mille käigus konkreetset DNA ahelat paljundatakse tuhandeid kordi. Selline sildamplifikatsioon leiab samaaegselt aset miljonites klastrites kogu kiibi pinnal. **C.** Sildamplifikatsiooni järel *reverse* ahelad eemaldatakse ning alles jäävad vaid *forward* ahelad. Lisatakse sekveneerimise praimer ning alustatakse sekveneerimist sünteesi teel. Igas tsüklis lisab DNA polümeraas ühe fluorofoori ja

terminaatoriga seotud nukleotiidi komplementaarsuse alusel ahelasse. Erinevad nukleotiidid on seotud erinevat värvi fluorofooriga. Seejärel toimub kiibi ergastamine ning fluorestsentsi värvuse lugemine ning selle alusel lülitunud nukleotiidi tuvastamine. Fluorofoor koos terminaatoriga lõigatakse nukleotiidi küljest ning pestakse kiibilt. Järgneb uue nukleotiidi lisamine ahelasse. Sel moel loetakse kogu DNA ahel sünteesi ajal. Kõikides DNA klastrites toimub süntees ja ahela järjestuse lugemine samaaegselt. Saadud järjestused kaardistatakse referentsgenoomi abil. Joonis on modifitseeritud Tucker jt, 2009. aasta artiklist. (<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html><sup>7</sup>; Tucker jt, 2009).

MPS on kasutusel kõigis kommertsiaalsetes NIP testides, kuid kasutatavad tehnoloogiad ja tulemuste analüüsi algoritmid on erinevad. Käesolevas töös analüüsin põhjalikumalt kahe Eesti turul oleva testi – Harmony<sup>TM</sup> Prenatal Test (Ariosa Diagnostics) ja Panorama<sup>TM</sup> Prenatal Screen (Natera, Inc.)– ning Leuveni Katoliku ülikoolis arendatud kogu genoomi madala tihedusega sekveneerimisel põhineva testi meetodikaid.

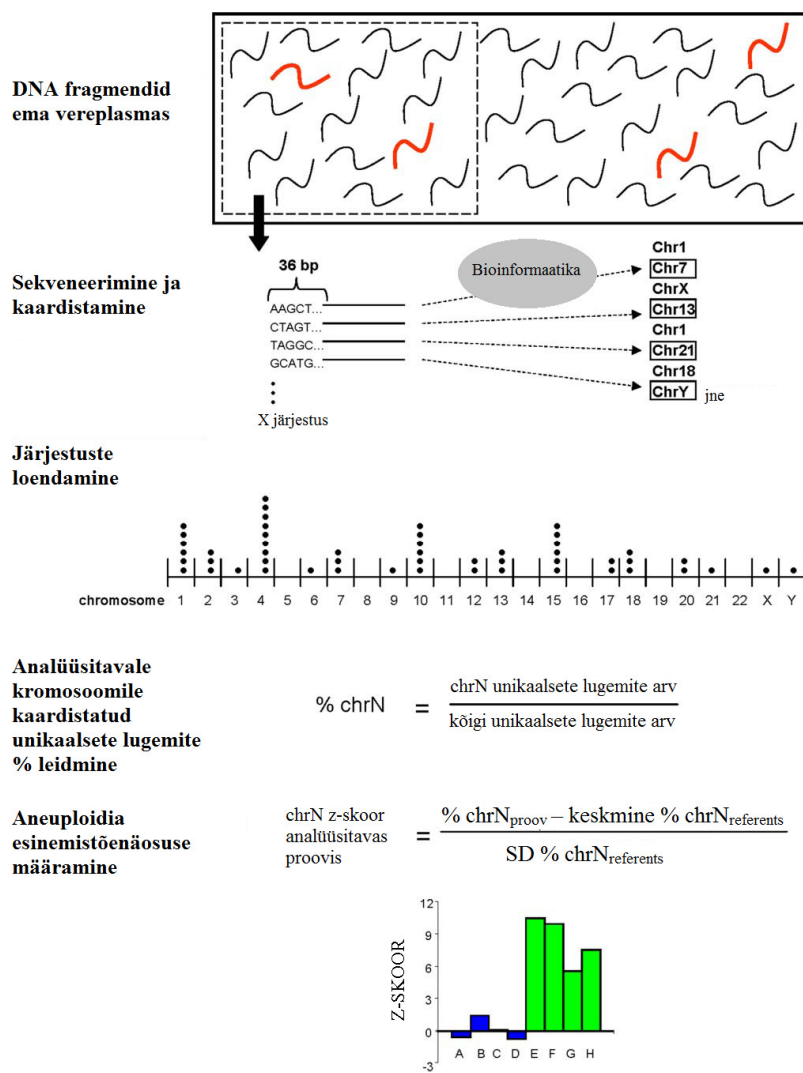
NIPT kontekstis on praegu kasutusel kolm võimalikku MPS läbiviimise strateegiat:

1. kogu genoomi MPS (ingl. k. *whole genome massively parallel sequencing*)
2. suunatud MPS (ingl. k. *targeted massively parallel sequencing*)
3. SNP-de analüüsil põhinev suunatud sekveneerimine

### 3.4.1. Kogu genoomi MPS

Enamik kommertsiaalsetest mitteinvasiivsetest prenataalsetest testidest kasutab kogu genoomi MPSi. See strateegia seisneb samaaegselt miljonite ema ja loote cfDNA fragmentide sekveneerimises, kaardistamises ning igale kromosoomile vastavate fragmentide loendamises. Kui lootel esineb mõni aneuploidia, peaks vastava kromosoomi fragmente olema rohkem või vähem kui teiste kromosoomide omi (Joonis 5). Erinevuse suurus sõltub ka loote cfDNA fraktsiooni suurusest ema veres, kuid igal juhul on see erinevus küllalt väike. Kromosoomide lugemite arvu statistiliselt olulise vahe tuvastamiseks peab lugemite arv olema väga suur ning loote cfDNA fraktsioon piisav (vähemalt 4%).

Kogu genoomi MPS kasutamise võimalikkust loote 21. kromosoomi trisoomia määramisel näitasid esimesena Fan jt 2008. aastal (Fan jt, 2008). Samal aastal avaldasid ka Chiu jt artikli, kus kirjeldasid, et tuvastasid sel meetodil korrektselt kõik 14 euploidset ja 14 aneuploidset loodet 28 analüüsitud proovi seast (Chiu jt, 2008). Loote cfDNA fragmentidest sekveneeriti katsetes vaid lühikesed lõigud (25 kuni 36 nukleotiidi).



**Joonis 5.** Loote cfDNA (punane) moodustab kogu ema vereplasmas ringlevast cfDNAst vaid väikese osa. Kogu ema vereplasma cfDNA sekveneritakse ning kaardistatakse referentsgenoomi põhjal erinevatele kromosoomidele. Leitakse igale kromosoomile vastavate unikaalsete lugemite arv. Arvutatakse analüüsitava kromosoomi lugemite % kõigi antud proovi lugemite seast ning arvutatakse sellele kromosoomile vastav z-skoor. Potentsiaalsete aneuploidsete loodete puhul on vastava kromosoomi z-skoor kõrgem

või madalam kui euploidsetel loodetel (joonisel A-D on euploidsed, E-H aneuploidsed) (Chiu jt, 2008).

2010. aastal näitasid Fan ja Quake, et kogu genoomi sekvenerimise kasutamisel loote aneuploidiate määramisel on kõige suuremaks kitsaskohaks andmete statistiline töötlus. Nad leidsid, et DNA raamatukogu koostamisel PCR abil ning ka sekvenerimise klastrite sünteesi etapis tekkis analüüsitavasse materjali GC kõrvalekalle (ingl. k. *GC bias*), kus suurema GC sisaldusega aladest esines vähem lugemeid. Sellest tulenevalt töötasid nad välja algoritmi, mis korrigeeris tulemusi GC kõrvalekalde osas. Seeläbi näitasid nad, et küllaldase sekvenerimistiheduse korral on võimalik kogu genoomi MPS abil tuvastada kõigi kromosoomide aneuploidiaid (Fan ja Quake, 2010).

2014. aastal töötasid Leuveni Katoliku ülikoolis Bayindir jt välja uue analüüsi *pipeline*-i, mille abil vähenes valepositiivsete NIPT tulemuste arv. Nad sekvenerisid cfDNAst 50 aluspaari pikkused lõigud ning kaardistasid need kromosoomidele. Välja jäeti kõik need lõigud, mis kaardistusid mitmesse regiooni, sisaldasid puuduolevaid nukleotiide või

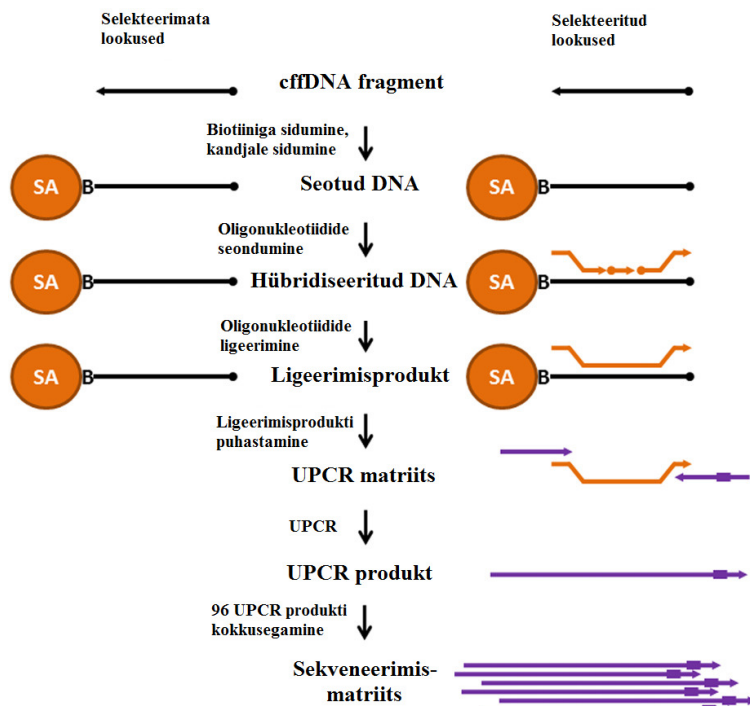


paigutusid teadaolevatele koopiarvu variatsioonide (ingl. k. *copy-number variation*, CNV) sisaldavatele aladele. Kaardistatud lõigud loendati ning andmed korrigeeriti GC kõrvalekalde osas. Nad arvutasid seejärel tavapärase z-skoori, kuid leidsid lisaks ka zz-skoori, mis võrdleb konkreetse autosoomi z-skoori kõigi teiste autosoomidega. Kui z-skoor võrdleb konkreetset indiviidi kogu populatsiooniga, siis zz-skoor võtab arvesse variatsioone konkreetse indiviidi erinevate kromosoomide vahel. Lisaks määrasid nad ka BM-skoori, mis võtab arvesse kromosoomisisesid variatsioone, ja OM skoori, mis võrdleb analüüsitava kromosoomi 5Mb suuruste vahemike z-skooride absoluutväärtuste mediaani kõigi teiste z-skooridega. Kui OM väärtus on madal on ka teised kromosoomid tõenäoliselt euploidsed. Need näitajad võimaldavad oluliselt vähendada proovi halvast kvaliteedist, ema CNV-dest ja teistest emapoolsetest põhjustest tingitud valepositiivsete tulemuste hulka (Bayindir jt, 2015).

### 3.4.2. Suunatud MPS

Suunatud MPS korral amplifitseeritakse vaid need kromosoomid või isegi teatud regioonid kromosoomidel, mille koopiarvu tahetakse määrata. Selle eelis kogu genoomi sekveneerimise ees võiks olla soodsam hind tingituna sellest, et suunatud MPS korral saadakse tulemus väiksema lugemite koguarvu korral. Sellist suunatud sekveneerimist kasutatakse ka Eestis pakutava Harmony<sup>TM</sup> Prenatal Test (Ariosa Diagnostics, Inc.) testi puhul. 2015. aasta jaanuaris omandas Roche Diagnostics Ariosa Diagnostics, Inc., kuid analüüse teostatakse endiselt USAs.

Sparks jt töötasid 2012. aastal välja uue valitud regioonide digitaalse analüüsi (ingl. k. *digital analysis of selected regions*, DANSR) meetodika. Joonisel 6 on seda meetodikat täpsemalt selgitatud. Esialgses uuringus analüüsisid nad 298 raseda vereplasmat ning tuvastasid seal 21. ja 18. kromosoomi spetsiifilisi lookusi. Testi tulemused väljendati z-skoorina. Nad jõudsid järeldusele, et DANSR meetodika abil on vaja saavutada ligikaudu 95% väiksem lugemite koguarv kui kogu genoomi sekveneerimisel, et tagada analüüsi täpsus (Sparks jt, 2012b). Seda meetodit täiendasid nad hilisemas uuringus ka uue loote cfDNA fraktsiooni suhtes optimeeritud trisoomia riski hindamise (ingl. k. *fetal-fraction optimized risk of trisomy evaluation*, FORTE) andmeanalüüsi algoritmi kasutuselevõtuga. FORTE eelstena tavapärase z-skoori ees võib välja tuua selle, et kuna korraga analüüsitakse 96 eri patsiendi proovid, siis kasutab see määramise varieeruvuse tuvastamiseks analüüsisisesid näitajaid, mitte ei ennusta seda varasemalt määratud referentsväärtuste alusel. Seega ei ole see niivõrd vastuvõtlik ka analüüsi tingimuste muutlikkusele. Lisaks võtab ta arvesse ka loote cfDNA fraktsiooni suurust ning ema vanusest tingitud riski (Sparks jt, 2012a).



**Joonis 6.** Suunatud MPS skeem DANSR meetodi korral. Joonisel on vasakul toodud DANSR meetodi rakendamine selekteerimata lookuste ning paremal selekteeritud lookuste korral. Musta pidevjoonena on tähistatud cfDNA, ringid tähistavad 5' fosfaati ja nooled 3' hüdroksüülrühma. CfdDNA seotakse esmalt biotiiniga (B), mille abil kantakse ta streptavidiiniga kaetud magnetkuulikestele (SA). Lookusspetsiifilised DANSR oligonukleotiidid hübridiseeritakse cfDNAle ning katked oligote vahel ligeeritakse. Saadud ligeerimisprodukt puhastatakse ning seda kasutatakse universaalse PCR (UPCR) matriitsina. UPCR praimerid on sünteesitud nii, et nende 3' ja 5' otsesse on konstrueeritud ka sekvenerimiseks vajalikud erinevad oligonukleotiidsed järjestused nii, et korraga saab ühel rajal sekvenerida 96 erinevat UPCR produkti ehk 96 erineva patsiendi proove (Sparks jt, 2012a).

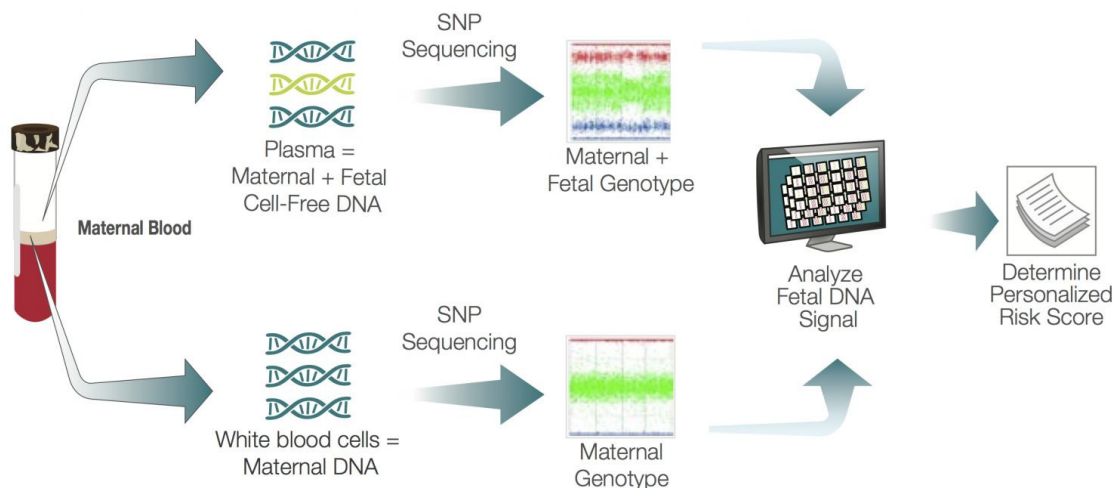
DANSR meetodikat kombineerituna FORTE algoritmiga on eraldi uuritud ka 13. kromosoomi trisoomia ning sugukromosoomide aneuploidiate suhtes. 13. kromosoomi trisoomia hindamisel saadi küllalt madal tundlikkus ning muudeti seetõttu algset algoritmi. Täiendatud algoritmi abil paranes testi tundlikkus märkimisväärselt, kuid jäi siiski madalamaks kui 21. ja 18. kromosoomi trisoomiate korral (Ashoor jt, 2013b). Sugukromosoomide aneuploidiate määramisel olid nii testi tundlikkus kui spetsiifilisus veel madalamad kui 13. kromosoomi puhul (Hooks jt, 2014). Mõlemad meetodid on kasutusel Harmony<sup>TM</sup> Prenatal Test (Ariosa Diagnostics) testis, mille kohta on tehtud ka mitmed suure valimiga uuringud, kus on tõestatud testi töökindlus ning eelised võrreldes standardse järjestikuse sõeluuringuga (Norton jt, 2012; Norton jt, 2015).

### 3.4.3. SNP-de analüüsil põhinev suunatud sekveneerimine

SNP-del põhinevat suunatud MPS-i kasutatakse Panorama<sup>TM</sup> Prenatal Screen (Natera, Inc.) testis kromosoomianeuploidiate tuvastamiseks (Joonis 7). Esimesena uurisid polümorfsete lookuste kasutamisevõimalust kromosoomianeuploidiate tuvastamisel Liao jt. Nad näitasid, et hübriidisatsioonil põhineva suunatud MPS (ingl. k. *hybridization-based targeted MPS*) kasutamisel on võimalik analüüsitava proovis suurendada kindlate DNA regioonide kontsentratsiooni nii, et samal ajal säilib ka selle piirkonna alleelne suhe (ingl. k. *allelic ratio*, AR) (Liao jt, 2011). Järgnevalt viisid nad läbi uuringu 14 rasedal, kellest seitse kandsid 21. kromosoomi trisoomiaga loodet. Selles katses defineeriti informatiivsete SNP-dena need, mille suhtes ema oli homosügoot ning loode heterosügoot. Erinevate alleelide kogused ema vereplasmas kvantiteeriti MPS abil ning leiti lootespetsiifiliste ning ühiste alleelide AR nii 21. kromosoomi kui referentskromosoomide jaoks. Seejärel tuvastati AR võrreldes loote ploidsus 21. kromosoomi suhtes. Euploidse loote korral on eeldatav suhe 21. kromosoomi ja referentskromosoomi vahel 1, kui lisakromosoom on päritud isalt, on eeldatav suhe 2 ning kui see on päritud emalt, on eeldatav suhe alla 1. Paraku töötas see strateegia vaid isalt päritud lisakromosoomi korral. Emalt päritud lisakromosoomi puhul esines märkimisväärne kattuvus euploidsete ja aneuploidsete loodete puhul (Liao jt, 2012).

Eelnevat teooriat arendasid edasi Zimmermann jt, kes töötasid proovide analüüsimiseks välja uue vanemliku toe (ingl. k. *Parental Support*; PS) algoritmi. NIP testis kasutatakse nii ema kui isa DNAd. PS abil ennustatakse vanemate DNAd määratud SNP profiilide alusel miljardeid võimalikke monosoomseid, disoomseid ja trisoomseid loote genotüüpe ning nende baasil tõenäolised sekveneerimise tulemused. Isa DNA proov ei ole siiski hädavajalik, sest isalt päritud alleele on võimalik loote DNA põhjal ennustada, kuid selle olemasolu parandab testi tulemusi. Seejärel sekveneeritakse loote DNA analüüsitava lookustes ja võrreldakse ennustatud tulemustega ning leitakse kõige tõenäolisem stsenaarium. Zimmermann jt analüüsisid PS abil 145 vereproovi (algvalim koosnes 166 proovist, kuid 21 proovi ei sisaldanud piisavalt suurt loote cfDNA fraktsiooni) 13., 18., 21., X ja Y kromosoomianeuploidiate suhtes ning suutsid korrektselt tuvastada kõik kromosoomide arvu häired (Zimmermann jt, 2012). Selle meetodi valideerimise ning andmeanalüüsi algoritmi täiendamise viisid läbi Nicolaides jt. Täiendatud teise põlvkonna SNP-del põhineva aneuploidiate testi (*Next-generation Aneuploidy Test Using SNP-s*; NATUS) algoritmi abil tuvastasid nad 229 raseduse puhul kõik loote kromosoomianeuploidid ning ühtegi valepositiivset tulemust ei esinenud. Samas ei andnud test tingituna vereproovi madalast kvaliteedist vastust 13 raseduse puhul, millest 2 olid aneuploidse lootega (Nicolaides jt, 2013). Sugukromosoomide aneuploidiate puhul on SNP-de määramisel põhineva meetodi

efektiivsust määranud ka Samango-Sprouse jt, andmete analüüsil kasutasid nad NATUS algoritmi. Uuringusse kaasati 201 rasedat, kellest 14 puhul ei vastanud vereproov kvaliteedinõuetele. Analüüsitud 187 raseda vereplasmas tuvastati edukalt nii 45,X, 47,XXX kui 47,XYY loote kariotüübid, kuid esines ka üks valenegatiivne tulemus. (Samango-Sprouse jt, 2013). 2014. aastal avaldasid Dar jt ka artikli, kus analüüsisid Panorama testi kasutamist kliinilises praktikas ligikaudu 30 000 patsiendi põhjal. Nad leidsid, et positiivne ennustusväärtus (ingl. k. *positive predictive value*, PPV) on Panorama™ Prenatal Screen (Natera, Inc.) testil võrreldav nii kõrge kui madala riskiga raseduste puhul (Dar jt, 2014).



**Joonis 7.** Panorama™ Prenatal Screen (Natera, Inc.) testi skeem. Ema vereplasma ja vererakud eraldatakse. Vere tuumaga rakkudest eraldatakse ema DNA ning vereplasmast kogu cfDNA. Sekveneeritakse nii ema vererakkude DNA kui cfDNA ja määratakse ligi 20000 SNP-i. Tulemusi analüüsitakse NATUS algoritmi abil ning määratakse uuritavate kromosoomide eeldatav ploidsus lootel (<http://www.panoramatest.com/en/healthcare-provider/our-science><sup>8</sup>).

### 3.5. Valepositiivsed ja -negatiivsed tulemused

Järgmises peatükis toodud tabelitest 3 ja 4 on näha, et kuigi NIPT on märkimisväärselt usaldusväärsem kui standardne järjestikune sõeluuring, esinevad ka siin siiski nii valepositiivsed kui valenegatiivsed tulemused. Need võivad olla tingitud tehnoloogilistest puudujääkidest eelkõige ema vereproovi käsitlemisel ning sellest tulenevast loote cfDNA fraktsiooni vähenemisest ema vere tuumaga rakkude lagunemise tõttu ja andmetöötlusel, aga väga paljudel juhtudel võib põhjus olla ka bioloogiline (Brady jt, 2015).

Nagu varasemalt mainitud, ei ole cffDNA pärit mitte loote enda rakkudest, vaid platsentakoest. Üldjuhul on platsenta geneetiliselt identne lootega, kuid võib esineda ka platsenta mosaiiksust (ingl. k. *confined placental mosaicism*, CPM), mille puhul platsenta moodustavates rakkudes esineb mõne kromosoomi trisoomia samal ajal kui lootel trisoomia

puudub. CPM võib esineda ka vastupidiselt – loode on aneuploidne, aga platsenta euploidne – ja olla nii täielik kui osaline. Osalise CPM korral on vaid osa platsenta rakke aneuploidsed. CPM tuvastatakse ligikaudu 1% CVS protseduuridest (Hahnemann ja Vejerslev, 1997). Viimastel aastatel on antud teada mitmetest juhtumitest, kus CPM on põhjustanud NIPT valetulemusi. Gao jt kirjeldasid juhtu, kus lootel esines nii 18. kui X kromosoomi trisoomia, kuid NIPT seda ei tuvastanud. UH uuringul tuvastati lootel arenguhäired ning viidi läbi amniotsentees, kus leiti loote trisoomiad. Rasedus katkestati ning platsentakoe analüüsil selgus, et platsenta rakkudest vaid 20-30% esines üks või mõlemad trisoomiad, ülejäänud rakud olid euploidsed (Gao jt, 2014). Vastupidistest juhtudest, kus NIPT on andnud valepositiivse tulemuse, on teatanud näiteks Lau jt ning Bayindir jt. Ühtlasi soovitatakse positiivse NIP testi tulemuse korral enne invasiivset protseduuri viia läbi põhjalik UH uuring, et selgitada, kas lootel esineb aneuploidiale iseloomulikke füüsilisi tunnuseid ning nende puudumisel kaaluda invasiivse protseduuri vajalikkust (Lau jt, 2014; Bayindir jt, 2015).

Teine põhjus NIPT valetulemuse saamisel võib olla tingitud juhust, kus rasedus algab kahe lootega, kuid mingil põhjusel ei ole üks neist eluvõimeline. Loote hukkamise põhjuseks võib sageli olla ka kromosoomianeuploidia ning valepositiivne NIPT tulemus võib peegeldada hoopis surnud loote kariotüüpi. Sellistel puhkudel võib olla abi põhjalikust UH uuringust, et tuvastada hukkunud loote olemasolu (Futch jt, 2013; Porreco jt, 2014).

Valepositiivse või -negatiivse NIPT tulemuse taga võivad olla ka emapoolsed põhjused. Kuna suurem osa ema vereplasma cfDNAst on siiski ema oma, mõjutavad ema varasemalt tuvastamata kõrvalekalded oluliselt ka NIPT tulemusi. Ema koopiarvu variatsioonid võivad märkimisväärselt mõjutada NIPT tulemusi nii sugukromosoomide (Wang jt, 2015) kui autosoomide määramisel (Bayindir jt, 2015). Sama moodi võib NIPT tulemust mõjutada ka ema geneetiline mosaiiksus (Wang jt, 2014). Eelnevad põhjused on kõik äärmiselt ootuspärased. Mõnevõrra üllatavam võib olla, et ka kasvaja esinemine emal võib põhjustada ema vereplasma cfDNA koostise muutust. Selliseid juhtumeid on kirjeldanud Futch jt, Osborne jt ning Vandenberghe jt (Futch jt, 2013; Osborne jt, 2013; Vandenberghe jt, 2015).

#### 4. Sõeluuringu ja cffDNA testide võrdlus

Kindlasti tuleb rõhutada, et eelmainitud mitteinvasiivsed testid on kõik statistilised, mitte diagnostilised, ning diagnoosi kinnitamiseks tuleks siiski ka invasiivne uuring läbi viia. Küll aga võimaldavad erinevad sõeluuringumeetodid saada mitteinvasiivselt ning loote ja ema jaoks ohutult infot erinevate lootel esineda võivate arenguhäirete kohta. Alltoodud tabelis on näidatud tänapäeval prenataalses hoolduses kasutuses olevad sõeluuringumeetodid ning diagnostilised testid ja nende kasutusvõimalused (Tabel 2).

**Tabel 2.** Olemasolevad prenataalsed sõeluuringumeetodid ja diagnostilised testid ning nende kasutusvõimalused (Latendresse ja Deneris, 2015).

Soovituslik raseduse kestus testimisel	Test	Testimisvõimalused			
		Aneuploid-sus	ONTD	Geneeti-line mutatsioon	Kaasa-sündinud anomaaliad
<b>Esimese trimestri sõeluuring</b>					
10-14 nädalat	UH uuring: NT mõõtmine	X			X
10-14 nädalat	Ema seerummarkerite määramine: PAPP-A ja $\beta$ -hCG	X			
10+ nädalat	NIPT ema vereplasmast	X			
<b>Esimese trimestri diagnostika</b>					
10-14 nädalat	CVS ja loote kariotüübi määramine, kromosoomide mikrokiibi analüüs ja/või konkreetsete mutatsioonide testimine	X		X	
<b>Teise trimestri sõeluuring</b>					
15-23 nädalat (optimaalne 18 nädalat)	UH uuring: loote anatoomia uuring	X	X		X
15-18 nädalat	Ema seerummarkerite määramine: mitme markeri hindamine – AFP, hCG, uE3, (inhibiin A)	X	X		
Kombineeritud sõeluuring	Kombineerituna esimese ja teise trimestri seerummarkerite ning NT samaaegne hindamine	X	X		X
Järjestikune sõeluuring	Esimese trimestri kombineeritud sõeluuring, millele järgneb vajadusel teise trimestri sõeluuring	X	X		X
Igal ajal	NIPT ema vereplasmast	X			
<b>Teise trimestri diagnostika</b>					
15-22 nädalat	AC ja loote kariotüübi määramine, kromosoomide mikrokiibi analüüs ja/või konkreetsete mutatsioonide testimine, lisaks amnionivedeliku AFP taseme määramine	X	X	X	

Soovituslik raseduse kestus testimisel	Test	Testimisvõimalused			
		Aneuploid-sus	ONTD	Geneeti-line mutatsioon	Kaasa-sündinud anomaaliad
<b>Raseduse kestusest sõltumatu diagnostika</b>					
Rasedusele eelnev või raseduseaegne vanemate või olemasolevate õdede-vendade testimine	Otsene mutatsioonide ja kromosoomide analüüs verest, süljest või naharakkudest	X		X	
Kunstliku viljastamise käigus	Embrüo preimplantatiivne diagnostika	X		X	

Ülaltoodud tabelist on näha, et kromosoomianomaaliate testimiseks sobivad nii traditsioonilised sõeluuringumeetodid kui NIPT. Samas tuleb rõhutada, et ONTD tuvastamiseks ning kaasasündinud struktuurianomaaliate avastamisel on siiski väga oluline roll UH uuringutel ning ema seerumi teise trimestri sõeluuringul määrataval AFP-l, mille tase on ONTD korral ema veres tõusnud (Driscoll, 2004). Rääkides kromosoomi arvu häirete tuvastamisest, on siiski näidatud NIPT meetodite parem tundlikkus ja spetsiifilisus ning ka tunduvalt suurem positiivne ennustusväärtus (Norton jt, 2015).

Bianchi jt viisid läbi võrdleva uuringu, kus analüüsisid ligi 2000 patsiendi vereproove standardsete sõeluuringumeetodiga ning NIPT meetodil (Illumina). Uuringusse kvalifitseerusid kõik naised, kes olid vähemalt 18 aasta vanused ning kelle rasedus oli kestnud vähemalt 8 nädalat. Lisatingimusena pidi neil olema juba läbitud või plaanis läbida kas esimese või teise trimestri standardne sõeluuring. Sõeluuringu raames läbi viidud protseduurid olid vastavalt USA meditsiinisüsteemile väga erinevad ning sõltusid raseda valikutest. Esimese trimestri sõeluuringul määrati PAPP-A ning vaba  $\beta$ -hCG või kogu hCG sisaldus ning analüüsiti neid tulemusi koos NT väärtustega. Teise trimestri seerummarkeriteks olid AFP, hCG, uE3 ning inhibiin A ja neid hinnati üksinda, koos esimese trimestri tulemustega (koos või ilma NT väärtuseta) või viidi läbi järjestikune sõeluuring, kus esimese trimestri tulemustest sõltus teise trimestri analüüsi läbiviimine. Seega esines sõeluuringu protokollis väga märkimisväärseid erinevusi rasedate vahel. NIPT analüüs viidi kõigil rasedatel (peale 10, kelle puhul vereproovid ei kvalifitseerunud analüüsiks vähese vere koguse, liiga pika transpordiaja või ema vanuse tõttu) läbi Illumina laborites verifi<sup>®</sup> Prenatal Test (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) sünnieelse testi abil, mis põhineb kogu genoomi MPS-l. See uuring erines varasematest, sest nad ei keskendunud NIPT puhul vaid kõrge riskiga rasedate grupile, vaid viisid mõlemad sõeluuringud läbi kõigil rasedatel, ka madala riski korral. Kogu valimis esines vaid viis 21. kromosoomi trisoomiat ning kaks 18. kromosoomi trisoomiat. Antud

uuringus tuvastati küll mõlema meetodi puhul kõik trisoomia juhud (Bianchi jt, 2014), kuid see on ilmselt vaid antud uuringu eripära, sest varasemalt on kirjanduses näidatud nii standardse sõeluuringu kui NIPT puhul valenegatiivseid tulemusi (Malone jt, 2005; Snyder jt, 2015).

2015 aastal avaldati ka NEXT (ingl. k. *noninvasive examination of trisomy*) uuringu tulemused. NEXT uuring viidi läbi 35 meditsiinikeskuses USAs, Kanadas ja Euroopas. Selles osales ligi 19000 rasedat, kellest kvalifitseerusid uuringusse 15841. Siin võrdlesid teadlased esimese trimestri sõeluuringu (PAPP-A,  $\beta$ -hCG ja NT läbimõõt) tulemusi cffDNA analüüsi tulemustega. NIPT meetodina kasutati firma Ariosa Diagnostics Harmony™ Prenatal Test testi. Kõigi testitud raseduste seas esines 68 kromosoomianomaaliat, millest 38 olid 21. kromosoomi trisoomiad, kümme olid 18. kromosoomi trisoomiad, kuus olid 13. kromosoomi trisoomiad ning kolmel juhul esines 45,X genotüüp. Lisaks tuvastati 3 markerkromosoomi, 4 translokatsiooni, 3 deletsiooni ning 1 isokromosoomi esinemine. Uuringusse olid ka siin kaasatud nii madala kui kõrge riskiga rasedad. Kahjuks ei analüüsitud NEXT uuringus valepositiivsete NIP testide (21. kromosoomi trisoomia puhul üheksa, 18. kromosoomi trisoomial üks ning 13. kromosoomi trisoomia puhul kaks) võimalikku päritolu ja seetõttu ei ole võimalik öelda, kas tegu oli tehnilist või bioloogilist laadi vigadega. Samuti esines valimis ligi 500 rasedat, kelle puhul NIPT ei andnud tulemusi. Nende seas tuvastati hiljem 13 aneuploidia juhtu (Norton jt, 2015). Alltoodud tabelites 3 ja 4 on näidatud kolme levinuma trisoomia kohta uuringu tulemused. Tabelis 3 on cffDNA analüüsi puhul eraldi toodud ka andmed madala riskiga (risk sünnitada Downi sündroomiga loode alla 1:270 standardse sõeluuringu tulemusel) raseduste kohta. Tabel 4 kirjeldab 18. ja 13. kromosoomi trisoomiaid.

**Tabel 3.** 21. kromosoomi trisoomia testimine standardse sõeluuringu ja Harmony™ Prenatal Test (Ariosa Diagnostics) testi abil (Norton jt, 2015).

	Standardne sõeluuring	cffDNA test	
	Kõik patsiendid (N=15841)	Kõik patsiendid (N=15841)	Madala riskiga rasedused (N=14957)
Tõelisi positiivseid	30	38	8
Tõelisi negatiivseid	14949	15794	14941
Valepositiivseid	854	9	8
Valenegatiivseid	8	0	0
Tundlikkus % (95% CI)	78,9 (62,7 – 90,4)	100 (90,7 – 100)	100 (63,1 – 100)
Spetsiifilisus % (95% CI)	94,6 (94,2 – 94,9)	99,9 (99,9 – 100)	99,9 (99,9 – 100)
PPV % (95% CI)	3,4 (2,3 – 4,8)	80,9 (66,7 – 90,9)	50,0 (24,7 – 75,3)
NPV % (95% CI)	99,9 (99,9 – 100)	100 (99,9 – 100)	100 (99,9 – 100)



**Tabel 4.** 13. ja 18. kromosoomi trisoomiate testimine standardse sõeluuringu ja Harmony™ Prenatal Test (Ariosa Diagnostics) testi abil (Norton jt, 2015).

	<b>13. kromosoomi trisoomia</b>		<b>18. kromosoomi trisoomia</b>	
	<b>Sõeluuring</b> (N=11185)	<b>cffDNA test</b> (N=11185)	<b>Sõeluuring</b> (N=15841)	<b>cffDNA test</b> (N=15841)
Tõelisi positiivseid	1	2	8	9
Tõelisi negatiivseid	11155	11181	15782	15830
Valepositiivseid	28	2	49	1
Valenegatiivseid	1	0	2	1
Tundlikkus % (95% CI)	50,0 (1,2 – 98,7)	100 (15,8 – 100)	80,0 (44,4 – 97,5)	90,0 (55,5 – 99,7)
Spetsiifilisus % (95% CI)	99,7 (99,6 – 99,8)	100 (99,9 – 100)	99,7 (99,6 – 99,8)	100 (99,9 – 100)
PPV % (95% CI)	3,4 (0,1 – 17,8)	50,0 (6,8 – 93,2)	14,0 (6,2 – 25,8)	90,0 (55,5 – 99,7)
NPV % (95% CI)	100 (99,9 – 100)	100 (99,9 – 100)	100 (99,9 – 100)	100 (99,9 – 100)

## 5. Arutelu

Eelmises peatükis toodud tabelitest 3 ja 4 ning Bianchi jt poolt läbi viidud uuringust nähtub, et NIPT meetodid on suurema tundlikkusega kui standardne sõeluuring. Kõige olulisem on siiski testide PPV erinevus – kogu rasedate populatsioonis kasutamisel oleks NIPT kõigi kolme trisoomia testimisel ligikaudu 10 korda suurema positiivse ennustusväärtusega kui standardsed sõeluuringu meetodid. Kõrge riskiga rasedate testimisel on vastav väärtus veelgi suurem. Oluline on siinkohal rõhutada ka valenegatiivsete tulemuste märkimisväärselt madalamat hulka NIPT puhul võrreldes standardsete sõeluuringutega. Raseda seisukohast vaadatuna on äärmiselt oluline, et testi negatiivne tulemus oleks võimalikult usaldusväärne. Sama oluline aspekt on ilmselt ka valepositiivsete tulemuste tunduvalt väiksem hulk NIPT korral. Mõlema meetodi puhul tuleb positiivne testi tulemus kinnitada ka invasiivse protseduuri abil, enne kui raseduse edasist kulgu mõjutavaid otsuseid langetada. Invasiivne protseduur ei ole vajalik vaid juhul, kui ema on igal juhul otsustanud raseduse lõpuni kanda ning lapse sünnitada. Samas kaasneb invasiivse protseduuriga alati raseduse katkemise oht ning on oluline viia teostatavate ebavajalike invasiivsete protseduuride hulk minimaalsele tasemele, mis ongi NIP testide eesmärgiks.

Riikliku meditsiinisüsteemi seisukohast vaadatuna on aga asjal kaks külge – ühelt poolt säästetavad inimesed mitteinvasiivsete protseduuride vähendamise arvelt, kuid teiselt poolt tuleb alati arvesse võtta ka sellega kaasnevaid kulutusi. 2015. aasta Ameerika meditsiinigeneetika ja –genoomika kolledži aastakoosolekul tõdes Ariosa tegevjuht Ken Song Nortoni jt läbiviidud uuringu andmetest lähtuvalt, et kui Harmony prenataalse testi hind oleks alla 450 USD, siis oleks praeguse esimese trimestri sõeluuringu asendamine NIPT meetodiga kulutõhus (<https://www.genomeweb.com/reproductive-health/nipt-outperforms-standard-screening-t21-false-positives-call-caution-nejm><sup>9</sup>). See hinnang põhines siiski ligikaudsetel arvutustel, kuid Evans jt analüüsisid 2014. aasta statistika põhjal olukorda USAs ning võrdlesid omavahel kolme võimalikku strateegiat:

- a) NIPT kui esmane sõeluuring;
- b) järjestikune sõeluuring, kus on esmavalikuna kasutusel traditsiooniline esimese trimestri sõeluuring, millele järgneb kõrge riski korral NIPT enne invasiivset protseduuri;
- c) hübriidstrateegia, mille korral pakutakse NIPT esimese testina üle 35-aastastele rasedatele ning alla 35-aastastele vaid esimese trimestri sõeluuringu järgse kõrge riski korral.

Nad jõudsid järeldusele, et NIPT esmase strateegiana ei õigusta ennast. Kulutõhususe seisukohast on kõige mõistlikum kasutada järjestikust sõeluuringut, kuid sealjuures tuleks muuta kõrge riski tuvastamise piiri esimese trimestri standardse uuringu järgselt. Nad tegid ettepaneku, et NIPT meetodit võiks rakendada kõigil rasedatel, kellel tuvastatakse tõenäosus haige lapse sünniks vähemalt 1:1000 (Evans jt, 2015). Selle analüüsi ilmselgeks puuduseks on eeldus, et kõigi tuvastatud trisoomia juhtude korral järgneb raseduse katkestamine. Samas tegelikkuses esineb märkimisväärne hulk neid juhte, mil vanemad otsustavad siiski sünnitada haige lapse ning seetõttu ei ole Evansi jt arvutused ilmselt korrektsed.

Austraalias on läbi viidud 3 kulutõhususe uuringut, millest üks käsitles standardse sõeluuringu asendamist NIPT meetodiga (Susman jt, 2010), teine analüüsis NIPT meetodi kaasamist sünnieelsesse diagnostikasse standardse sõeluuringu positiivse tulemuse järel enne invasiivse protseduuri sooritamist (O'Leary jt, 2013) ning kolmas analüüsis nelja erinevat strateegiat:

1. standardne sõeluuring esimesel trimestril ning kõigi kõrge riskiga rasedate invasiivne testimine amniotsenteesi abil;
2. standardne sõeluuring esimesel trimestril, millele järgneb tuvastatud kõrge riski korral NIPT. Invasiivne protseduur viiakse läbi vaid naistel, kellele NIPT annab positiivse tulemuse;
3. Üle 35-aastastele naistele pakutakse esmase sõeluuringu meetodina NIPT, noorematel viiakse esmalt läbi standardne sõeluuring esimesel trimestril ning NIPT teostatakse vaid neil, kellel see tuvastab kromosoomianomaalia esinemise riski. Positiivse NIPT tulemuse korral teostatakse invasiivne protseduur;
4. Esimese trimestri standardne sõeluuring asendatakse täielikult NIPT meetodiga. Kõigi positiivsete NIPT tulemuste korral teostatakse invasiivne uuring.

Analüüsid viidi läbi 2010 aasta statistiliste näitajate alusel. Selle uuringu tulemusel selgus, et teine strateegia aitaks vältida enim invasiivse protseduuriga seotud loote hukkumisi, samal ajal esimese strateegia korral esineks neid ligikaudu 10 korda rohkem võrrelduna kõigi teiste strateegiatega. Teine strateegia oleks ka meditsiinisüsteemile langevaid kulutusi arvestades kõige optimaalsem (Ayres jt, 2014). Samuti säilitaks selle strateegia kasutuselevõtt esimesel trimestril läbiviidava UH uuringu, mis on oluline mitmete mittekromosomaalsete arenguhäirete hindamisel. Sarnane uuring on läbi viidud ka Hollandis (Beulen jt, 2014). Siiski ei saa nende uuringute tulemusi otse Eesti meditsiinisüsteemi üle kanda, sest meil erinevad nii testide hinnad kui rasedate iga-aastane hulk ning nende naiste osakaal, kes otsustavad raseduse katkestada pärast positiivse tulemuse saamist mõne kromosoomianomaalia osas.

NIPT on väga hea vahend vähendamaks ebasoovitavate invasiivsete protseduuride hulka, kuid Eesti meditsiinisüsteemis puuduvad hetkel konkreetsed soovitused selle rakendamiseks. Samuti on erinevates haiglates erinev praktika. Ida-Tallinna Keskhaiglas soovitatakse ligikaudu pooltel juhtudel patsientidele, kellel on tuvastatud keskmine või kõrge risk kromosoomianomaalia esinemiseks, enne invasiivset protseduuri ka NIPT. Seal on kasutuses Harmony™ Prenatal Test (Ariosa Diagnostics) test. Ema vereproov kogutakse ja töödeldakse Eestis ning saadetakse seejärel USAsse testimiseks. Tulemuste saamiseks kulub reeglina 2 nädalat. See pikendab küll mõningal määral diagnoosi panemiseks kuluvat aega, kuid vähendab invasiivsete protseduuride hulka. Samas Tartu Ülikooli Kliinikumi Naistekliinikus ei ole NIPT kasutamine hetkel just eriti populaarne ning üldiselt seda eraldi naistele ei soovitata. Samas kui naine ise soovib NIPT meetodit kasutada, on ka seal võimalik Harmony™ Prenatal Test (Ariosa Diagnostics) testi tellida. Mõlemas kliinikus peab siiski naine ise testi eest tasuma ning see maksab 410 – 465 eurot. Küllalt kõrge hinna tõttu on NIPT kättesaadav siiski vaid väga väikesele osale rasedatest. Lisaks on Tartus Elite kliinikus ning Tallinnas Ultrahelikeskuses võimalik rasedal ka Panorama™ Prenatal Screen (Natera, Inc.) testi tellida, kuid see on veelgi kallim (<http://www.elitekliinik.ee/elite/rasedus/panorama-test/><sup>10</sup>; <http://www.ultraheli.ee/panorama-test><sup>11</sup>; <http://kliinikum.ee/teenused/nimekiri/1210-harmony><sup>12</sup>; <http://www.itk.ee/kliinikud/naistekliinik/naistekliinikust/perinataalkeskus/emadusnouandla/rasedusaegsed-uuringud><sup>13</sup>).

Kuna hetkel puuduvad Eesti meditsiinisüsteemi kontekstis korralikud kulutõhususe analüüsid, kus oleks hinnatud mitmeid stsenaariume NIPT kasutamiseks, on raske öelda, milline oleks just Eesti süsteemi seisukohalt kõige mõistlikum variant. Kindlasti tuleks analüüsides arvesse võtta ka kaudseid kulutusi – näiteks ka seda kui palju meditsiinisüsteem säästab iga välditud aneuploidiaga sündinud lapse hoolduseks kuluvat raha võrreldes praeguste testidega. Samuti tuleks sealjuures arvestada ka positiivsest diagnoosist tingitud raseduste katkestamise arvu võrrelduna nende naistega, kes otsustavad siiski sünnitada haige lapse. Samas tuleb tõdeda, et kui 2014. aastal viidi Eestis läbi kokku 848 invasiivset protseduuri ning kromosoomianomaalia tuvastati vaid 59 juhul ehk 93% invasiivsetest protseduuridest olid tegelikkuses ebavajalikud, on näha, et arenguruumi on selles vallas märkimisväärselt. Näiteks Downi sündroomi diagnoositi sünnieelselt invasiivse protseduuri tulemusel 31 juhul, kuid viiel juhul jäi kromosoomianomaalia tuvastamata. Tõsi – neist kahel juhul leidis raseda esmane visiit arsti juurde aset raseduse liiga hilises faasis ega olnud enam võimalik teostada sõeluuringuid, kuid kolme loote puhul oli tegu valenegatiivse sõeluuringu testi tulemusega. Seega suudeti sõeluuringute tulemusel tuvastada vaid 86,1% kõikidest Downi sündroomidest (Sitska, 2015).

Praegu on Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus ASi juhtimisel Eestis toimumas uuring Leuveni Katoliku ülikoolis arendatud kogu genoomi madala tihedusega sekveneerimisel põhineva NIPT tehnoloogia kasutuselevõtmiseks Eestis ning testi edasiarendamiseks. Juhul kui mainitud uuring osutub edukaks, oleks vaja läbi viia ka kulutõhususe uuringud. Kindlasti oleks mõistlik mitteinvasiivset testi rakendada rasedatel, kellel on eelnevalt tuvastatud kõrge risk kromosoomianomaaliaga lapse sünniks, et vähendada läbiviidavate invasiivsete protseduuride hulka, kuid põhjalikumat analüüsi vajab täpsete kriteeriumite välja töötamine, mille alusel võiks rasedale olla näidustatud NIPT kasutamine haigekassa kulul. Lisaks tuleks Eestis välja töötada ühtne sünnieelse diagnostika eeskiri, et kõigis haiglates pakutaks rasedatele sarnased võimalusi. Kuna NIPT ei võimalda paljude kaasasündinud haiguste tuvastamist, mis standardsel sõeluuringul on tuvastatavad, ei tohiks ühte meetodit täielikult teisega asendada, kuid nad võiksid väga edukalt teineteist täiendada. Teatud tingimustel võiks olla NIPT ka haigekassa poolt kompenseeritav, kuid seda võiks siiski pakkuda ka ülejäänud rasedatele nende endi rahalisel vastutusel. NIPT edukus sõltub ka loote cfDNA fraktsiooni suurusest ema veres ning selle hulk suureneb raseduse käigus. Üldiselt ei soovitata NIPT viia läbi enne kui raseduse 10. nädalal just loote cfDNA hulga vähesuse tõttu. Seega võikski olla eelneva esimese trimestri sõeluuringu läbiviimine raseduse 12. nädalal ning sellele vajadusel järgnev NIPT heaks praktikaks, mis vähendaks ka neid juhte, kus NIPT ei saa läbi viia vähesel loote DNA fraktsiooni tõttu ema veres.

Eesti puhul on ka praeguste sõeluuringumeetodite puhul probleemiks spetsialistide puudus. NT suuruse korrektseks mõõtmiseks peab ultraheli teostav arst olema läbinud ka vastava koolituse ning omama selle kohta sertifikaati. Neid arste, kellel see olemas on, leidub Eestis ligikaudu 20. Oluliseks probleemiks on see just maapiirkondades, kus spetsialisti puudumine võib olulisel määral mõjutada ka rasedale pakutavate sõeluuringute läbiviimise võimalusi ja teenuse kvaliteeti. NIPT läbiviimiseks pole rasedal vaja teha muud kui anda oma vereproov ning seda on maapiirkondades tunduvalt lihtsam organiseerida kui sertifitseeritud UH arsti olemasolu. Samas kaasnevad sellega olulised probleemid. Rasedale peab olema tagatud vajalik testieelne ja -järgne nõustamine. Seda saab garanteerida vaid meditsiinipersonali piisavalt koolitades, sest ka meditsiinigeneetikust, kes võiks rasedate nõustamisega tegeleda, on Eestis puudus. Euroopa Inimesegeneetika Ühing ning Ameerika Inimesegeneetika Ühing on oma ühisavalduses rõhutanud just piisava nõustamise olulisust (Dondorp jt, 2015). Samas on seda küllalt raske tagada – mida rohkem võimalusi pakuvad NIP testid, seda keerulisem on tagada piisava informatsiooni jagamine rasedale nii enne testi kui tulemuste saamise järgselt. Kromosoomianeuploidiate ning monogeensete haiguste tuvastamisel ilmselt probleeme ei teki, kuid üha enam diskuteeritakse mikrodeletsioonide,

-duplikatsioonide ja polümorfismide tuvastamise üle, mille puhul pole sageli teada, kas või kui olulisi meditsiinilisi probleeme nad lapsele põhjustada võivad (Dixit jt, 2012; Weise jt, 2012). Nii tõstatubki küsimus, kui palju testist saadavast infost tuleks rasedale edastada – kas anda edasi vaid konkreetsete haiguste kohta käiv teave või tuleks edastada kogu info? Kõigi testitulemuste tõlgendamine on kindlasti meie ämmaemandatele ja isegi günekoloogidele küllalt väljakutsuv ülesanne, mis vajab põhjalikke eelnevaid koolitusi.

Samuti on näidatud, et kuigi NIPT on väga usaldusväärne 18. ja 21. kromosoomi trisoomiate testimisel, jääb nii 13. kromosoomi trisoomia kui sugukromosoomide aneuploidiate puhul positiivne ennustusväärus küllalt madalaks (Norton jt, 2015). Samas suureneks kindlasti invasiivsete protseduuride hulk valepositiivsete tulemuste tõttu. Sugukromosoomide aneuploidiate korral võib ka haiguse avaldumine olla väga varieeruv – mõnel juhul ei teki lapsel tulevikus mingeid probleeme ning aneuploidiat ei tuvastata enne kui täiskasvanul avalduvate viljakusprobleemide esinemisel, kuid tõsisematel juhtudel esinevad märkimisväärsed arenguhäired (Boyd jt, 2011). Praegu on NIPT puhul positiivsena tõstetud esile eelkõige just invasiivsete protseduuride vähendamist. Samas kui testime ka kõrvalkaldeid, mille tulemus on väga varieeruv, suurendab see kindlasti omakorda just invasiivsete protseduuride hulka. Lisandub ka keeruline nõustamine, mille tulemus võib olla raseda jaoks väga segadusseajav ja ebarahuldav tingituna haiguse varieeruvast fenotüübist. Küllalt raske on tagada tasakaalustatud ning mittersuunavat nõustamist rasedale nii, et ta oskaks saadud info põhjal ka raseduse edasise kulu üle otsustada.

## KOKKUVÕTE

Loote kromosoomianomaaliate sünnieelne testimine ja diagnostika on reaalsus juba mitukümmend aastat. Tänu sellele on tulevastel vanematel võimalik langetada teadlikke pereplaneerimise otsuseid. Samas on tänapäeva standardsed sõeluuringumeetodid liiga ebatäpsed ja diagnostikameetodid potentsiaalselt rasedust ohustavad. Mitteinvasiivne sünnieelne testimine cfDNA baasil võimaldaks edukamalt välja selekteerida vaid need rasedused, mille korral invasiivne protseduur on tõesti õigustatud.

Tehnoloogia areng on taganud NIPT meetodite erakordselt kiire väljatöötamise ning kommertsiaalsete testide turulejõudmise vähem kui 20 aastaga. Praegused saadaolevad testid põhinevad kõik teise põlvkonna sekveneerimisel, mis on paraku väga kallis meetodika. Lähituleviku üks eesmärkidest võiks olla testide hinna alandamine nii sekveneerimise hinna languse kui efektiivsemate analüüsimeetodite kasutuselevõtu abil. Teine tehnoloogiate arengu eesmärk on subkromosomaalsete häirete ja monogeensete haiguste esinemise diagnostika meetodite väljatöötamine ja arendamine.

Tehnoloogia arenguga kaasneb võimalus leida üha väiksemaid geneetilisi kõrvalekaldeid ja mitmekülgsema fenotüübiga häireid. Samas ei tohi ära unustada sellise testimise eetilist külge – on äärmiselt oluline tagada rasedale kogu vajaliku info kättesaadavus ning korrektne raseda nõustamine. Kindlasti sama oluline on võimaldada raseduse kulgu puudutavate otsuste langetamine rasedal endal ning teda sealjuures mitte suunata. Meditsiinisüsteemi huvides oleks küll võimalikult väheste kromosoomianomaaliate või teiste käesoleval ajal ravimatute geneetiliste haigustega laste sünd, kuid see otsus peab siiski jääma tulevase ema langetada.

Maailmas on läbiviidud mitmeid kulutõhususe uuringuid NIPT laiema kasutuselevõtu suhtes ning enimlevinud on seisukoht, et NIPT õigustaks ennast enne invasiivse protseduuri läbiviimist kui esimese trimestri sõeluuring on andnud tavapärasest kõrgema riski kromosoomianeuploidiaga lapse sünniks. Ilmselt oleks ka Eestis sarnane lähenemine põhjendatud, kuid kindlasti on vaja teostada põhjalikud analüüsid, et leida täpsed kriteeriumid, mille alusel selekteerida välja need rasedad, kellel NIPT võiks teostada haigekassa kulul.

Käesolevas referatiivses bakalaureusetöös on tutvustatud erinevaid sünnieelse sõeluuringu meetodeid keskendudes eelkõige mitteinvasiivsele prenataalsele testimisele, selle positiivsetele külgedele, puudustele ning toodud välja valukohti, mis vajavad lahendamist juba lähiajal. NIPTi kasutamisel diagnostilise meetodina on hetkel veel mitmeid kitsaskohti, kuid tehnoloogia arengu ning efektiivsete andmetöötlusalgoritmide abiga on kindlasti võimalik sellest arendada töökindel diagnostiline meetod.

## SUMMARY

Prenatal testing and diagnostics of fetal chromosomal anomalies has been a reality for decades now. It enables the future parents to make conscious familyplanning desicions. However, today's standard screening methods are too insensitive to accurately detect problematic pregnancies and diagnostic measures are a potential threat to the pregnancy. Noninvasive prenatal testing (NIPT) based on cell-free fetal DNA would enable us to select more accurately the pregnancies for which an invasive procedure is really necessary and the risk to the pregnancy is justified.

Technology has evolved extremely fast during the last 20 years and this has ensured a quick progress in developing commercial NIP tests that are already available for public use. All of these tests on the market today are based on massively parallel sequencing which is, unfortunately, a very expensive method. One of the goals during the next few years should be to lower the costs of NIPT either by lowering the costs of sequencing or by finding more effective methods of sample preparation and data analysis. Another goal to developing the technology should be to find ways to test for smaller genetic aberrations such as monogenic diseases, microdeletions and -duplications.

As the technology progresses more and more opportunities are avaiable. However, the ethical questions concerned can not be overlooked either. It is extremely important to make sure that the woman carrying the child has all the necessary information to make an informed but undirected decision about the pregnancy. It is in the best interest of the public medicine system that as few children as possible are born with a chromosomal anomaly or any other genetic and currently untreatable disease, but the decision has to be made, uninfluenced by anyone, by the mother.

Several cost-effectiveness studies have been conducted in different countries to analyze the use of NIPT. It is commonly considered the best strategy to apply NIPT after a positive first trimester screening test prior to an invasive procedure. It is very likely that the same applies to Estonia as well. However – more thorough analysis is needed to determine the exact criteria under which NIPT should be funded by the Estonian Health Insurance Fund.

The goal of this thesis is to introduce different prenatal screening methods focussing mostly on noninvasive prenatal testing, to bring out its advantages and disadvantages and to point attention to problems that need to be solved in the next few years. The use of NIPT as a diagnostic procedure is not possible today, but with the development of technology and better data analysis algorithms it certainly holds a promise to become one.



## TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajat prof. Ants Kurge kasulike nõuannete ja abi eest. Olga Žilinat, kes andis alati head nõu ning Hanna Moori, kes tuletas mulle meelde vahepeal ununenud grammatikareegleid. Kõige suuremad tänud lähevad siiski mu armsale pisipojale, kes on viimaste kuude jooksul väga kannatlik olnud ja abikaasale kogu ta toetuse eest!

## KIRJANDUSE LOETELU

- Alberry, M., Maddocks, D., Jones, M., Abdel Hadi, M., Abdel-Fattah, S., jt. (2007). Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 27(5): 415-418.
- Allison, M. (2013). Genomic testing reaches into the womb. *Nat Biotechnol* 31(7): 595-601.
- Ashoor, G., Syngelaki, A., Poon, L. C., Rezende, J. C., Nicolaides, K. H. (2013a). Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 41(1): 26-32.
- Ashoor, G., Syngelaki, A., Wang, E., Struble, C., Oliphant, A., jt. (2013b). Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol* 41(1): 21-25.
- Ayres, A. C., Whitty, J. A., Ellwood, D. A. (2014). A cost-effectiveness analysis comparing different strategies to implement noninvasive prenatal testing into a Down syndrome screening program. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 54(5): 412-417.
- Baker, M. (2012). Digital PCR hits its stride. *Nature Methods* 9(6): 541-544.
- Bayindir, B., Dehaspe, L., Brison, N., Brady, P., Ardui, S., jt. (2015). Noninvasive prenatal testing using a novel analysis pipeline to screen for all autosomal fetal aneuploidies improves pregnancy management. *Eur J Hum Genet*.
- Beulen, L., Grutters, J. P., Faas, B. H., Feenstra, I., van Vugt, J. M., jt. (2014). The consequences of implementing non-invasive prenatal testing in Dutch national health care: a cost-effectiveness analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 182: 53-61.
- Bianchi, D. W., Rava, R. P., Sehnert, A. J. (2014). DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 371(6): 578.
- Bischoff, F. Z., Lewis, D. E., Simpson, J. L. (2005). Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update* 11(1): 59-67.
- Boyd, P. A., Loane, M., Garne, E., Khoshnood, B., Dolk, H. (2011). Sex chromosome trisomies in Europe: prevalence, prenatal detection and outcome of pregnancy. *Eur J Hum Genet* 19(2): 231-234.
- Brady, P., Brison, N., Van Den Bogaert, K., de Ravel, T., Peeters, H., jt. (2015). Clinical implementation of NIPT - technical and biological challenges. *Clin Genet*.

- Calabrese, G., Baldi, M., Fantasia, D., Sessa, M. T., Kalantar, M., jt. (2012). Detection of chromosomal aneuploidies in fetal cells isolated from maternal blood using single-chromosome dual-probe FISH analysis. *Clin Genet* 82(2): 131-139.
- Canick, J. A., Palomaki, G. E., Kloza, E. M., Lambert-Messerlian, G. M., Haddow, J. E. (2013). The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 33(7): 667-674.
- Chan, K. C., Ding, C., Gerovassili, A., Yeung, S. W., Chiu, R. W., jt. (2006). Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 52(12): 2211-2218.
- Chan, K. C., Zhang, J., Hui, A. B., Wong, N., Lau, T. K., jt. (2004). Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 50(1): 88-92.
- Chan, K. C., Yeung, S. W., Lui, W. B., Rainer, T. H., Lo, Y. M. (2005). Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem* 51(4): 781-784.
- Chim, S. S., Jin, S., Lee, T. Y., Lun, F. M., Lee, W. S., jt. (2008a). Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. *Clin Chem* 54(3): 500-511.
- Chim, S. S., Shing, T. K., Hung, E. C., Leung, T. Y., Lau, T. K., jt. (2008b). Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 54(3): 482-490.
- Chim, S. S., Tong, Y. K., Chiu, R. W., Lau, T. K., Leung, T. N., jt. (2005). Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(41): 14753-14758.
- Chitty, L. S., Griffin, D. R., Meaney, C., Barrett, A., Khalil, A., jt. (2011). New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Ultrasound Obstet Gynecol* 37(3): 283-289.
- Chiu, R. W., Chan, K. C., Gao, Y., Lau, V. Y., Zheng, W., jt. (2008). Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(51): 20458-20463.
- Choolani, M., Mahyuddin, A. P., Hahn, S. (2012). The promise of fetal cells in maternal blood. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 26(5): 655-667.

- Chu, T., Bunce, K., Hogge, W. A., Peters, D. G. (2010). A novel approach toward the challenge of accurately quantifying fetal DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 30(12-13): 1226-1229.
- Comstock, C. H., Malone, F. D., Ball, R. H., Nyberg, D. A., Saade, G. R., jt. (2006). Is there a nuchal translucency millimeter measurement above which there is no added benefit from first trimester serum screening? *Am J Obstet Gynecol* 195(3): 843-847.
- Dar, P., Curnow, K. J., Gross, S. J., Hall, M. P., Stosic, M., jt. (2014). Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *Am J Obstet Gynecol* 211(5): 527 e521-527 e517.
- de Graaf, I. M., Pajkrt, E., Bilardo, C. M., Leschot, N. J., Cuckle, H. S., jt. (1999). Early pregnancy screening for fetal aneuploidy with serum markers and nuchal translucency. *Prenat Diagn* 19(5): 458-462.
- Dixit, A., Patel, C., Harrison, R., Jarvis, J., Hulton, S., jt. (2012). 17q12 microdeletion syndrome: three patients illustrating the phenotypic spectrum. *Am J Med Genet A* 158A(9): 2317-2321.
- Dondorp, W., de Wert, G., Bombard, Y., Bianchi, D. W., Bergmann, C., jt. (2015). Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet*.
- Driscoll, D. A. (2004). Second trimester maternal serum screening for fetal open neural tube defects and aneuploidy. *Genet Med* 6(6): 540-541.
- Driscoll, D. A., Gross, S. J. (2008). First trimester diagnosis and screening for fetal aneuploidy. *Genet Med* 10(1): 73-75.
- Evans, M. I., Sonek, J. D., Hallahan, T. W., Krantz, D. A. (2015). Cell-free fetal DNA screening in the USA: a cost analysis of screening strategies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 45(1): 74-83.
- Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L., Quake, S. R. (2008). Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(42): 16266-16271.
- Fan, H. C., Quake, S. R. (2010). Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics. *PLoS One* 5(5): e10439.

- Finning, K. M., Martin, P. G., Soothill, P. W., Avent, N. D. (2002). Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 42(8): 1079-1085.
- Futch, T., Spinosa, J., Bhatt, S., de Feo, E., Rava, R. P., jt. (2013). Initial clinical laboratory experience in noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy from maternal plasma DNA samples. *Prenat Diagn* 33(6): 569-574.
- Gao, Y., Stejskal, D., Jiang, F., Wang, W. (2014). False-negative trisomy 18 non-invasive prenatal test result due to 48,XXX,+18 placental mosaicism. *Ultrasound Obstet Gynecol* 43(4): 477-478.
- Geifman-Holtzman, O., Grotegut, C. A., Gaughan, J. P. (2006). Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood--a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 195(4): 1163-1173.
- Goldstein, I., Weizman, B., Nizar, K., Weiner, Z. (2014). The nuchal translucency examination leading to early diagnosis of structural fetal anomalies. *Early Hum Dev* 90(2): 87-91.
- Gonzalez-Gonzalez, M. C., Garcia-Hoyos, M., Trujillo-Tiebas, M. J., Bustamante Aragonés, A., Rodríguez de Alba, M., jt. (2008). Improvement in strategies for the non-invasive prenatal diagnosis of Huntington disease. *J Assist Reprod Genet* 25(9-10): 477-481.
- Grunau, C., Clark, S. J., Rosenthal, A. (2001). Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 29(13): E65-65.
- Guibert, J., Benachi, A., Grebille, A. G., Ernault, P., Zorn, J. R., jt. (2003). Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 18(8): 1733-1736.
- Gunel, T., Zeybek, Y. G., Akcakaya, P., Kalelioglu, I., Benian, A., jt. (2011). Serum microRNA expression in pregnancies with preeclampsia. *Genet Mol Res* 10(4): 4034-4040.
- Hahn, S., Rusterholz, C., Hosli, I., Lapaire, O. (2011). Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta* 32 Suppl: S17-20.
- Hahnemann, J. M., Vejerslev, L. O. (1997). Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS)--diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992. *Prenat Diagn* 17(9): 801-820.

- Hamada, H., Arinami, T., Kubo, T., Hamaguchi, H., Iwasaki, H. (1993). Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 91(5): 427-432.
- Hatt, L., Brinch, M., Singh, R., Moller, K., Lauridsen, R. H., jt. (2014). A new marker set that identifies fetal cells in maternal circulation with high specificity. *Prenat Diagn* 34(11): 1066-1072.
- Heung, M. M., Jin, S., Tsui, N. B., Ding, C., Leung, T. Y., jt. (2009). Placenta-derived fetal specific mRNA is more readily detectable in maternal plasma than in whole blood. *PLoS One* 4(6): e5858.
- Hill, M., Twiss, P., Verhoef, T. I., Drury, S., McKay, F., jt. (2015). Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis: detection of paternal mutations, exploration of patient preferences and cost analysis. *Prenat Diagn*.
- Hooks, J., Wolfberg, A. J., Wang, E. T., Struble, C. A., Zahn, J., jt. (2014). Non-invasive risk assessment of fetal sex chromosome aneuploidy through directed analysis and incorporation of fetal fraction. *Prenat Diagn* 34(5): 496-499.
- Jorgez, C. J., Simpson, J. L., Bischoff, F. Z. (2006). Recovery and amplification of placental RNA from dried maternal blood spots: utility for non-invasive prenatal diagnosis. *Reprod Biomed Online* 13(4): 558-561.
- Kagan, K. O., Avgidou, K., Molina, F. S., Gajewska, K., Nicolaides, K. H. (2006). Relation between increased fetal nuchal translucency thickness and chromosomal defects. *Obstet Gynecol* 107(1): 6-10.
- Kamhieh-Milz, J., Mofteh, R. F., Bal, G., Futschik, M., Sterzer, V., jt. (2014). Differentially expressed microRNAs in maternal plasma for the noninvasive prenatal diagnosis of Down syndrome (trisomy 21). *Biomed Res Int* 2014: 402475.
- Kotlabova, K., Doucha, J., Hromadnikova, I. (2011). Placental-specific microRNA in maternal circulation--identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *J Reprod Immunol* 89(2): 185-191.
- Krabchi, K., Gros-Louis, F., Yan, J., Bronsard, M., Masse, J., jt. (2001). Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet* 60(2): 145-150.

- Lam, K. W., Jiang, P., Liao, G. J., Chan, K. C., Leung, T. Y., jt. (2012). Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma: application to beta-thalassemia. *Clin Chem* 58(10): 1467-1475.
- Latendresse, G., Deneris, A. (2015). An update on current prenatal testing options: first trimester and noninvasive prenatal testing. *J Midwifery Womens Health* 60(1): 24-36; quiz 111.
- Lau, T. K., Cheung, S. W., Lo, P. S., Pursley, A. N., Chan, M. K., jt. (2014). Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA: review of 1982 consecutive cases in a single center. *Ultrasound Obstet Gynecol* 43(3): 254-264.
- Li, Y., Zimmermann, B., Rusterholz, C., Kang, A., Holzgreve, W., jt. (2004). Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem* 50(6): 1002-1011.
- Liao, G. J., Chan, K. C., Jiang, P., Sun, H., Leung, T. Y., jt. (2012). Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *PLoS One* 7(5): e38154.
- Liao, G. J., Lun, F. M., Zheng, Y. W., Chan, K. C., Leung, T. Y., jt. (2011). Targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA permits efficient and unbiased detection of fetal alleles. *Clin Chem* 57(1): 92-101.
- Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., jt. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350(9076): 485-487.
- Lo, Y. M., Lun, F. M., Chan, K. C., Tsui, N. B., Chong, K. C., jt. (2007a). Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(32): 13116-13121.
- Lo, Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M., jt. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 64(1): 218-224.
- Lo, Y. M., Tein, M. S., Lau, T. K., Haines, C. J., Leung, T. N., jt. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 62(4): 768-775.
- Lo, Y. M., Tsui, N. B., Chiu, R. W., Lau, T. K., Leung, T. N., jt. (2007b). Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 13(2): 218-223.

- Lun, F. M., Chiu, R. W., Chan, K. C., Leung, T. Y., Lau, T. K., jt. (2008a). Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 54(10): 1664-1672.
- Lun, F. M., Tsui, N. B., Chan, K. C., Leung, T. Y., Lau, T. K., jt. (2008b). Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(50): 19920-19925.
- Luo, S. S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Ishikawa, T., Katayama, A., jt. (2009). Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod* 81(4): 717-729.
- Malone, F. D., Canick, J. A., Ball, R. H., Nyberg, D. A., Comstock, C. H., jt. (2005). First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med* 353(19): 2001-2011.
- Maron, J. L., Johnson, K. L., Slonim, D., Lai, C. Q., Ramoni, M., jt. (2007). Gene expression analysis in pregnant women and their infants identifies unique fetal biomarkers that circulate in maternal blood. *J Clin Invest* 117(10): 3007-3019.
- McEwan, A. (2005). Harvesting fetal cells from the maternal circulation. *Fetal and Maternal Medicine Review* 16(02): 151-177.
- Ng, E. K., El-Sheikhah, A., Chiu, R. W., Chan, K. C., Hogg, M., jt. (2004). Evaluation of human chorionic gonadotropin beta-subunit mRNA concentrations in maternal serum in aneuploid pregnancies: a feasibility study. *Clin Chem* 50(6): 1055-1057.
- Ng, E. K., Tsui, N. B., Lau, T. K., Leung, T. N., Chiu, R. W., jt. (2003). mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8): 4748-4753.
- Nicolaidis, K. H., Azar, G., Byrne, D., Mansur, C., Marks, K. (1992). Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ* 304(6831): 867-869.
- Nicolaidis, K. H., Syngelaki, A., Gil, M., Atanasova, V., Markova, D. (2013). Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn* 33(6): 575-579.
- Norbury, G., Norbury, C. J. (2008). Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: how close are we? *Semin Fetal Neonatal Med* 13(2): 76-83.



- Norton, M. E., Brar, H., Weiss, J., Karimi, A., Laurent, L. C., jt. (2012). Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 207(2): 137 e131-138.
- Norton, M. E., Jacobsson, B., Swamy, G. K., Laurent, L. C., Ranzini, A. C., jt. (2015). Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med* 372(17): 1589-1597.
- O'Leary, P., Maxwell, S., Murch, A., Hendrie, D. (2013). Prenatal screening for Down syndrome in Australia: costs and benefits of current and novel screening strategies. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 53(5): 425-433.
- Orlandi, F., Damiani, G., Hallahan, T. W., Krantz, D. A., Macri, J. N. (1997). First-trimester screening for fetal aneuploidy: biochemistry and nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol* 10(6): 381-386.
- Osborne, C. M., Hardisty, E., Devers, P., Kaiser-Rogers, K., Hayden, M. A., jt. (2013). Discordant noninvasive prenatal testing results in a patient subsequently diagnosed with metastatic disease. *Prenat Diagn* 33(6): 609-611.
- Oudejans, C. B., Go, A. T., Visser, A., Mulders, M. A., Westerman, B. A., jt. (2003). Detection of chromosome 21-encoded mRNA of placental origin in maternal plasma. *Clin Chem* 49(9): 1445-1449.
- Papageorgiou, E. A., Fiegler, H., Rakyan, V., Beck, S., Hulten, M., jt. (2009). Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Pathol* 174(5): 1609-1618.
- Papasavva, T., van Ijcken, W. F., Kockx, C. E., van den Hout, M. C., Kountouris, P., jt. (2013). Next generation sequencing of SNPs for non-invasive prenatal diagnosis: challenges and feasibility as illustrated by an application to beta-thalassaemia. *Eur J Hum Genet* 21(12): 1403-1410.
- Poon, L. L., Leung, T. N., Lau, T. K., Lo, Y. M. (2000). Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 46(11): 1832-1834.
- Porreco, R. P., Garite, T. J., Maurel, K., Marusiak, B., Ehrich, M., jt. (2014). Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome

- aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *Am J Obstet Gynecol* 211(4): 365 e361-312.
- Samango-Sprouse, C., Banjevic, M., Ryan, A., Sigurjonsson, S., Zimmermann, B., jt. (2013). SNP-based non-invasive prenatal testing detects sex chromosome aneuploidies with high accuracy. *Prenat Diagn* 33(7): 643-649.
- Scheffer, P. G., van der Schoot, C. E., Page-Christiaens, G. C., Bossers, B., van Erp, F., jt. (2010). Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. *Obstet Gynecol* 115(1): 117-126.
- Sekizawa, A., Samura, O., Zhen, D. K., Falco, V., Farina, A., jt. (2000). Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn* 20(11): 886-889.
- Sepulveda, W., Wong, A. E., Dezerega, V. (2007). First-trimester ultrasonographic screening for trisomy 21 using fetal nuchal translucency and nasal bone. *Obstet Gynecol* 109(5): 1040-1045.
- Sitska, M. (2015). Pärilike haiguste sünnieelne diagnoosimine Eestis 2014 aastal. Ettekanne.
- Sitska, M., Ehrenberg, A., Asser, K., Haldre, K., Reimand, T., jt. (2011). Eesti Naistearstide Selts. Sünnieelne diagnostika. Metoodiline juhend.
- Snyder, M. W., Simmons, L. E., Kitzman, J. O., Coe, B. P., Henson, J. M., jt. (2015). Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results. *N Engl J Med* 372(17): 1639-1645.
- Sparks, A. B., Struble, C. A., Wang, E. T., Song, K., Oliphant, A. (2012a). Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 206(4): 319 e311-319.
- Sparks, A. B., Wang, E. T., Struble, C. A., Barrett, W., Stokowski, R., jt. (2012b). Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 32(1): 3-9.
- Spencer, K. (2007). Aneuploidy screening in the first trimester. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 145C(1): 18-32.
- Susman, M. R., Amor, D. J., Muggli, E., Jaques, A. M., Halliday, J. (2010). Using population-based data to predict the impact of introducing noninvasive prenatal diagnosis for Down syndrome. *Genet Med* 12(5): 298-303.

- Zhong, X. Y., Holzgreve, W., Hahn, S. (2002). Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Mol Hum Reprod* 8(9): 864-870.
- Zimmermann, B., Hill, M., Gemelos, G., Demko, Z., Banjevic, M., jt. (2012). Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn* 32(13): 1233-1241.
- Taglauer, E. S., Wilkins-Haug, L., Bianchi, D. W. (2014). Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta* 35 Suppl: S64-68.
- Tarquini, F., Picchiassi, E., Centra, M., Pennacchi, L., Galeone, F., jt. (2015). Maternal smoking does not affect the amount of cell-free fetal DNA in maternal plasma during the 1st trimester of pregnancy. *J Obstet Gynaecol* 35(1): 42-45.
- Tong, Y. K., Chiu, R. W., Chan, K. C., Leung, T. Y., Lo, Y. M. (2012). Technical concerns about immunoprecipitation of methylated fetal DNA for noninvasive trisomy 21 diagnosis. *Nat Med* 18(9): 1327-1328; author reply 1328-1329.
- Tong, Y. K., Jin, S., Chiu, R. W., Ding, C., Chan, K. C., jt. (2010). Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach. *Clin Chem* 56(1): 90-98.
- Tsaliki, E., Papageorgiou, E. A., Spyrou, C., Koumbaris, G., Kypri, E., jt. (2012). MeDIP real-time qPCR of maternal peripheral blood reliably identifies trisomy 21. *Prenat Diagn* 32(10): 996-1001.
- Tsui, N. B., Kadir, R. A., Chan, K. C., Chi, C., Mellars, G., jt. (2011). Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood* 117(13): 3684-3691.
- Tucker, T., Marra, M., Friedman, J. M. (2009). Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am J Hum Genet* 85(2): 142-154.
- Ura, B., Feriotto, G., Monasta, L., Bilel, S., Zweyer, M., jt. (2014). Potential role of circulating microRNAs as early markers of preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 53(2): 232-234.
- Wagner, A. J., Mitchell, M. E., Tomita-Mitchell, A. (2014). Use of cell-free fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal screening. *Clin Perinatol* 41(4): 957-966.

- Valbuena, H., Ramis, J., Sagala, J., Sanchez, M. A., Aulesa, C. (2015). First-trimester screening biochemical markers (free beta-subunit human chorionic gonadotropin, pregnancy-associated plasma protein-A) and risk of early fetal loss. *J Obstet Gynaecol Res* 41(1): 69-76.
- Vandenbergh, P., Wlodarska, I., Tousseyn, T., Dehaspe, L., Dierickx, D., jt. (2015). Non-invasive detection of genomic imbalances in Hodgkin/Reed-Sternberg cells in early and advanced stage Hodgkin's lymphoma by sequencing of circulating cell-free DNA: a technical proof-of-principle study. *The Lancet Haematology* 2(2): e55-e65.
- Wang, S., Huang, S., Ma, L., Liang, L., Zhang, J., jt. (2015). Maternal X chromosome copy number variations are associated with discordant fetal sex chromosome aneuploidies detected by noninvasive prenatal testing. *Clin Chim Acta* 444: 113-116.
- Wang, Y., Chen, Y., Tian, F., Zhang, J., Song, Z., jt. (2014). Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clin Chem* 60(1): 251-259.
- Weise, A., Mrasek, K., Klein, E., Mulatinho, M., Llerena, J. C., Jr., jt. (2012). Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem* 60(5): 346-358.
- Wright, C. F., Burton, H. (2009). The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 15(1): 139-151.
- Yu, Z., Han, S., Hu, P., Zhu, C., Wang, X., jt. (2011). Potential role of maternal serum microRNAs as a biomarker for fetal congenital heart defects. *Med Hypotheses* 76(3): 424-426.

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. <http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/component/content/article/6/14-ii trimestrisoeluurung>
2. <http://www.kliinikum.ee/naistekliinik/naistenouandla/rasedusaegsed-uuringud/79-raseduse-jaelgmine-naedalate-kaupa>
3. <https://fetalmedicine.org/nuchal-translucency-scan>
4. [http://193.40.10.165/SPC/Hum/SPC\\_21794.pdf](http://193.40.10.165/SPC/Hum/SPC_21794.pdf)
5. <http://www.lifetechnologies.com/ee/en/home/life-science/pcr/digital-pcr.html>
6. <http://www.streck.com/product.aspx?p=Cell-Free%20DNA%20BCT>
7. <http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html>
8. <http://www.panoramatest.com/en/healthcare-provider/our-science>
9. <https://www.genomeweb.com/reproductive-health/nipt-outperforms-standard-screening-t21-false-positives-call-caution-nejm>
10. <http://www.elitekliinik.ee/elite/rasedus/panorama-test/>
11. <http://www.ultraheli.ee/panorama-test>
12. <http://kliinikum.ee/teenused/nimekiri/1210-harmony>
13. <http://www.itk.ee/kliinikud/naistekliinik/naistekliinikust/perinataalkeskus/emadusnouandla/rasedusaegsed-uuringud>

## LIHTLITSENTS

### **Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Janne Aule  
(sünnikuupäev: 12.12.1984)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose  
Mitteinvasiivne sünnieelne diagnostika – tänapäev ja tulevik,  
mille juhendaja on prof. Ants Kurg,

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas  
digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas  
digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega  
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015