

УДК 618.29-07:616-056.716:618.2:616.15-097.34

**ВОЗМОЖНОСТЬ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ РЕЗУС-ФАКТОРА ПЛОДА ПО КРОВИ БЕРЕМЕННОЙ РЕЗУС-ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ ЖЕНЩИНЫ****<sup>1</sup>Маркелова А.Н., <sup>1</sup>Мельников В.А., <sup>2</sup>Тюмина О.В.**<sup>1</sup>*ГБОУ Самарский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Самара;*<sup>2</sup>*ГБУЗ Самарской области «Клинический центр клеточных технологий», Самара, e-mail: markelova-an@mail.ru*

Возможности пренатальной диагностики постоянно растут и совершенствуются. К одному из видов пренатальной диагностики можно смело отнести инновационное направление – неинвазивную пренатальную диагностику по крови беременной женщины. Это новый метод, который открывает широкие возможности для современной медицины. Определение резус-фактора плода по крови резус-отрицательной матери – наиболее хорошо изученная его часть. Диагностика резус-фактора плода ранее вызывала затруднения и была возможна с 20 недели беременности путем амниоцентеза или кордоцентеза. Данная процедура опасна как для матери, так и для плода. Благодаря новому инновационному методу неинвазивной пренатальной диагностики резус-фактора плода по крови матери удастся улучшить качество оказания медицинской помощи резус-отрицательным беременным женщинам и снизить процент резус-сенсibilизированных женщин в России.

**Ключевые слова:** резус-фактор плода, неинвазивная диагностика**ABILITIES OF DIAGNOSTIC FETAL RHESUS- FACTOR ON BLOOD FOR PREGNANT RH-NEGATIVE WOMEN****<sup>1</sup>Markelova A.N., <sup>1</sup>Melnikov V.A., <sup>2</sup>Tyumina O.V.**<sup>1</sup>*The state budgetary educational institution of high professional education «The Samara's state medical university» the Ministry of Health and social development of Russia Federation, Samara;*<sup>2</sup>*The state budgetary institution of Health Samara region « Clinical center of cellular technologies», Samara, e-mail: markelova-an@mail.ru*

Availability of prenatal diagnostic are constantly growing and improving. To one of the types of prenatal diagnostic can be safely attributed innovative direction – the non-invasive prenatal diagnostic by blood of pregnant women. It is a new method, which offers great opportunities for modern medicine. Determination of fetal Rh factor by blood Rh-negative mother – the most well-studied part of it. Diagnostic of fetal rhesus previously caused trouble and was able from 20 weeks of pregnancy by amniocentesis or cordocentesis. This procedure is dangerous for both the mother and the fetus. A new innovative method of non-invasive prenatal diagnostic of fetal Rh-factor by the mother's blood can improve the quality of care Rh-negative pregnant women and reduce the percentage of Rh-sensibilisation women in Russia.

**Keywords:** an Rh factor, non-invasive diagnostics

В России процент резус-сенсibilизированных женщин достигает 1,2% (Сидельникова В.М. и соавт. 2004; Савельева Г.М. и соавт., 2004). В развитых странах мира количество женщин с Rh-сенсibilизацией равно 0,1–0,2%. Столь низкий процент достигнут благодаря внедрению в клиническую практику специфической профилактики путем введения антирезус-иммуноглобулина несенсibilизированным резус-отрицательным женщинам. Разница в количестве сенсibilизированных женщин возникла по нескольким причинам, одна из которых – высокая стоимость антирезус-иммуноглобулина, покупать который приходится за свой счет. Хотя вводить данный препарат необходимо только тем резус-отрицательным беременным женщинам, чей плод является резус-положительным.

Вопреки мнению, что плацента образует барьер между матерью и ребенком, это не так (Loetal., 1996). Многочисленные ис-

следования показали, что как целые клетки плода, так и внеклеточные фетальные ДНК проходят через плаценту и циркулируют в материнском кровотоке.

Интakтные фетальные клетки, циркулирующие в материнском кровотоке, являются привлекательной мишенью для неинвазивной пренатальной диагностики, а именно для диагностики резус-фактора плода, пола плода и хромосомных аномалий путем простого кариотипирования. Хотя существование фетальных клеток в материнской крови известно более века, непосредственно интактные фетальные ядерные красные кровяные клетки с целью пренатальной диагностики не использовались до 1990 года. С этого времени выделение и обнаружение клеток плода из крови матери начали интенсивно исследоваться, и стали появляться различные методы выделения фетальных клеток, которые были в разной степени успешными. Однако результаты исследова-

ний были неутешительные. Это было обусловлено недостаточностью интактных клеток плода, циркулирующих в материнском кровотоке (около 1 клетки в миллилитре материнской крови) (Bianchi и соавт., 1997), низкой эффективностью исследований (Bianchi и соавт., 1997). Хотя некоторые клетки плода (в частности ядерные красные кровяные клетки плода) имеют сравнительно короткую продолжительность жизни в материнской крови, фетальные клетки других типов могут сохраняться в материнской крови десятилетия после беременности и потенциально способны вызвать ложноположительные результаты при последующих беременностях. Таким образом, несмотря на то, что современные исследования пытаются улучшить технику сортировки клеток, большинство последних научных исследований сосредоточены на бесклеточной ДНК плода в крови матери, которая представлена в достаточном количестве (Lo и соавт. 1998).

Огромное количество человеческой ДНК расположено внутри клетки, но присутствие небольшого количества вкДНК в циркуляции и здоровых, и больных женщин было открыто в 1947 г. Хотя их биологический источник и потенциальная функция остаются неопределенными, предполагают, что это продукт апоптоза, в результате которого происходят фрагментация и выход хромосомных ДНК из клетки. Присутствие ДНК плода в материнской циркуляции была продемонстрировано Lo и соавторами в 1998 году.

Фетальные ДНК образуются путем апоптоза плацентарных клеток (трофобласта), полученных от и составляют примерно 3–6% от общих бкДНК в материнском кровотоке в начале и конце беременности соответственно (Lo и соавт. 1998) (оставшиеся 94–97% составляют материнские вкДНК).

ДНК плода можно обнаружить с 4-й недели гестации, хотя надежно только с 8 недели концентрация его возрастает с увеличением гестационного возраста - от 16 фетальных геномов на миллилитре крови матери в первом триместре беременности до 80 в третьем триместре) - с острым пиком в течение последних 8 недель беременности (Lo и др., 1998). В отличие от фетальных клеток, вкДНК быстро выводится из крови матери с периодом полураспада 16 мин и не определяется через 2 ч после родов.

**Цель исследования** – оценить метод неинвазивной диагностики резус-фактора плода по крови беременной женщины.

#### **Материалы и методы исследования**

Для определения резус-фактора плода была использована фетальная ДНК из плазмы крови беремен-

ной резус-отрицательной женщины. В исследовании принимали участие 150 беременных резус-отрицательных женщин. Были использованы образцы венозной крови объемом 7 мл. В каждом случае женщины подписывали информированное согласие.

Для выявления гена резус-фактора применялась ПЦР в реальном времени с использованием диагностических наборов для идентификации гена резус-фактора плода в крови матери «ДНК-резус ребенка» производства ООО «Ген-технология» (Россия, РУ № ФСР2010/09565).

Определение резус-фактора плода по крови беременной резус-отрицательной женщины основывается на том, что в плазме крови беременной женщины присутствует внеклеточная фетальная ДНК.

Для правильного определения резус-фактора плода по крови беременной женщины необходимо соблюдение следующих условий:

1. Срок беременности – с 10 недель.
2. Правильное обращение с плазмой, выделение ДНК в максимально быстрые сроки.
3. Выделение ДНК с использованием надёжной технологии.
4. Организация работы в ПЦР-лаборатории согласно действующим национальным нормам.
5. Чёткое следование инструкции.

Исследование проводится в несколько этапов:

1. Взятие крови и выделение плазмы. Исследуемым материалом для проведения анализа является венозная кровь беременной резус-отрицательной женщины. Кровь сдаётся натощак, собирается в пробирку с антикоагулянтом EDTA в количестве 7–10 мл. В течение 24 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Плазма должна доставляться в лабораторию в течение 16–24 ч после взятия материала.

2. Выделение ДНК. Проводится колоночно-адсорбционным методом с использованием рекомендуемых комплектов наборов, предназначенных для выделения циркулирующих нуклеиновых кислот из биологических жидкостей согласно методике производителя.

3. Проведение амплификации с детекцией в режиме реального времени. Пробоподготовка – стандартная для проведения ПЦР. Подготавливаются реакции для непосредственного выявления гена резус-фактора в исследуемой пробе, а также контрольные реакции, подтверждающие правильность выполнения исследования. Реакция занимает от 1,5 до 2 часов (в зависимости от скорости изменения температуры амплификатором).

4. Регистрация и учёт результатов анализа.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

Все 150 женщин, вступившие в исследование, были резус-отрицательные по результатам серологического анализа. Для 115 из них стал известен резус-фактор рожденного ребенка.

Резус-фактор рожденных детей оценивался серологическим методом в роддоме.

ДНК-анализ 76 образцов указал на положительный резус-фактор плода, в 39 случаях был установлен отрицательный резус-фактор. Результаты анализа были

подтверждены анализом крови детей после их рождения. В одном случае результат анализа не совпал (при отрицательном резус-факторе по данным тест-системы фактический резус-фактор оказался резус-положительным). Следует отметить, что срок беременности для этой пациентки составил 9 недель, в то время, как минимальным сроком, гарантирующим правильность результатов анализа, является срок 10 недель. Следовательно, данный результат не может использоваться при оценке аналитических характеристик тест-системы. У двух детей резус фактор был определен неправильно в роддоме. После получения результата анализа на определение резус-фактора этих детей, не совпадающего с нашими результатами, у них был взят буккальный соскоб и проведено генетическое определение резус-фактора. Результат данного анализа подтвердил правильность определенного нами резус-фактора плода по крови беременной женщины. 1,8% (2 ребенка) – неправильное определение резус-фактора детей в роддоме. Таким образом, чувствительность и специфичность применяемого метода диагностики составили 100%.

#### Выводы

– новые диагностические наборы для идентификации гена резус-фактора (RHD) «ДНК-резус ребенка» российского производства можно рекомендовать для внедрения в медицинскую практику акушерам-гинекологам для ранней неинвазивной диагностики резус-фактора по крови беременной женщины;

– определение резус-фактора на раннем сроке беременности позволяет избежать долевой медикаментозной профилактики;

– введение антирезус-иммуноглобулина всем резус-отрицательным женщинам, беременным резус-положительным плодом, в дальнейшем приведет к снижению процента резус-сенситизированных женщин в России.

#### Список литературы

1. Конопляников А.Г. Новые технологии в диагностике, лечении и профилактике гемолитической болезни плода и новорожденного: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2009. – 48 с.
2. Маркелова А.Н., Тюмина О.В., Тороповский А.Н. Новый подход к ведению беременных женщин с резус-отрицательной кровью с ранних сроков беременности // *Фундаментальные исследования*. – 2011 – № 11 (Ч. 2) – С. 330–332.
3. Митря И.В. Оптимизация методов профилактики, диагностики и лечения резус-сенситизации: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2010. – 21 с.
4. Современные методы диагностики, лечения гемолитической болезни плода и новорожденного при резус-сенситизации: пособие для врачей / Г.М. Савельева, М.А. Курцер, О.Б. Панина, Л.Г. Сичинова, Р.И. Шалина,

П.А. Клименко, А.Г. Конопляников и др. – М.: Изд-во МФ, 2004. – 28 с.

5. Сидельникова В.М. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного. – М.: Изд-во «Триада-Х», 2004. – 192 с.

6. Bianchi D.W., Williams J.M., Sulivan L.M., Hanson F.W., Klinger K.W., Shuber A.P. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploidy pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 822–829

7. Lo Y.M.D., Lo E.S., Watson N., Noakes L., Sargent I.L., Thiaganathan B., Wainscoat J.S.. Two-day cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood*. 1996; 88: 4390–4395.

8. Lo Y.M.D., Hjelm N.M., Fidler C., Sargent I.L., Murphy M.F., Chambelain P.F., Poon P.M.K., Redman C.W.G., Wainscoat J.S.. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma National England journal of medicine. 1998; 339: 1734–1738.

#### References

1. Konoplyannikov A.G. *Novyetechnologii v diagnostike, lechenii i profilaktike gemoliticheskoy bolezni ploda i novorozhdennogo. Avtoreferat dissertacii doktora medicinskih nauk. New technologies for diagnosis, treatment and prevention of hemolytic disease of fetus and newborn. Dissertation of Doctor of Medical Sciences* Moscow, 2009, 48p.

2. Markelova A.N., Tyumina O.V., Melnikov V.A. *Fundamental'nye issledovaniya- Fundamental research*, 2011, no. 11 (part 2), pp. 330–332

3. Mitrya I.V. *Optimizaciya metodov profilaktiki, diagnostiki i lecheniya rezus-sensibilizacii. Avtoreferat dissertacii kandidata medicinskih nauk. Optimization methods for the prevention, diagnosis and treatment of Rh sensitization. Dissertation of Candidate of Medical Sciences* Moscow. 2010. 21p.

4. Savel'eva G.M., Kurcer M.A., Panina O.B., Sichinva L.G., Shalina R.I., Klimenko P.A., Konoplyannikov A.G. i dr. *Sovremennyye metody diagnostiki, lecheniya gemoliticheskoy bolezni ploda i novorozhdennogo pri rezus-sensibilizacii: Pособie dlya vrachev. Modern methods of diagnosis and treatment of hemolytic disease of fetus and newborn with Rh sensitization: A Manual for Physicians* – Moscow. Publisher Ministry of Health of Russia Federation, 2004. 28 p.

5. Sidel'nikova V.M. *Gemoliticheskaya bolezni' ploda i novorozhdennogo. Hemolytic disease of fetus and newborn. Moscow. Publisher Triada-X, 2004. 192p.*

6. Bianchi D.W., Williams J.M., Sulivan L.M., Hanson F.W., Klinger K.W., Shuber A.P. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploidy pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 822–829

7. Lo Y.M.D., Lo E.S., Watson N., Noakes L., Sargent I.L., Thiaganathan B., Wainscoat J.S.. Two-day cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood*. 1996; 88: 4390–4395.

8. Lo Y.M.D., Hjelm N.M., Fidler C., Sargent I.L., Murphy M.F., Chambelain P.F., Poon P.M.K., Redman C.W.G., Wainscoat J.S.. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma National England journal of medicine. 1998; 339: 1734–1738.

#### Рецензенты:

Шатунова Е.П., д.м.н., доцент, заведующая отделением гинекологии Клиник Сам ГМУ, г. Самара;

Шляпников М.Е., д.м.н., доцент, зам. главного врача по акушерству и гинекологии ММБУ ГКБ № 2 им. Н.А. Семашко, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 17.10.2012.