ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۱۵۰-۱۳۵

روش‌های غیرتهاجمی غربالگری سندرم داون از طریق خون مادر

Non-invasive screening methods of down syndrome through maternal circulation

فاطمه کرمی[۱]، محمدرضا نوری دلویی[۱]، محمدحسین مدرسی[*۱]

۱- دانشجوی دکتری، استادان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

Karami F[1], Noori-Daloii MR[1], Modarressi MH[*1]

1. PhD Student, Professors, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Modaresi@tums.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۸- تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

سندرم داون شایع‌ترین علت عقب ماندگی ذهنی در بین تولدهای زنده است که شیوع و بروز افزایش یابنده‌ای را در سال‌های اخیر نشان می‌دهد. بنابراین غربالگری موثر و به موقع پیش از تولد این اختلال می‌تواند میزان تولد آن را به طور چشمگیری کاهش دهد. در این راستا روش‌های غربالگری غیر تهاجمی بسیاری معرفی شده‌اند که موفق-ترین آنها از DNA آزاد جنینی در خون مادر بهره برده‌اند. در این راستا روش‌های مختلفی مبتنی بر توالی‌های تکراری یا پلی‌مورفیسم‌ها و یا استفاده از تکنیک‌هایی همچون Digital PCR و Mass spectrometry ارائه و معرفی شدند. اما در میان مطالعات انجام شده، دو روش موثر برای جداسازی DNA جنینی از DNA کل موجود در سرم مادر وجود دارند که بیش از همه مورد توجه قرار گرفته‌اند که شامل روش‌های مبتنی بر تفاوت الگوی متیلاسیون مادری و جنینی و توالی‌یابی DNA است. در این مطالعه سعی بر آن است که پس از مروری اجمالی بر انواع روش‌های تهاجمی و غیر تهاجمی غربالگری سندرم داون، به تفصیل در مورد تکنیک‌های انجام شده در دو روش فوق پرداخته شود.

واژه‌های کلیدی

خون مادر
سندرم داون
غربالگری
غیرتهاجمی
DNA آزاد جنینی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

مقدمه

سندرم داون رایج‌ترین علت ژنتیکی عقب ماندگی ذهنی و ناهنجاری کروموزومی در تولدهای زنده است که با افزایش سن باروری در زنان میزان شیوع آن به ویژه در کشور ما افزایش یافته است. میزان شیوع این سندرم، ۱۴-۱۱ در هر ۱۰۰۰۰ تولد است. بدون در نظر گرفتن ختم حاملگی‌های مبتلا به سندرم داون، میزان بروز این سندرم در همه جمعیت‌ها تقریبا یک در ۶۳۴ تولد است (Hulten et al. 2003). قریب به ۴۰ درصد حاملگی‌ها در حد فاصل زمانی یا نمونه‌برداری از پرزهای کوریونی (CVS) و تولد خودبخود سقط می‌شوند (Morris et al. 1999). بیش از ۸۰ نوع علائم و عوارض در این سندرم مشاهده می‌شود. شاخص شناسایی اولیه این بیماران شامل عقب ماندگی ذهنی خفیف تا متوسط و عقب ماندگی رشد فیزیکی به علاوه مشخصات ویژه صورتی از جمله صورت صاف و پهن، زبان بزرگ، پل بینی پهن، چانه کوچک، شیار میمونی کف دست، گردن کوتاه و چشم‌های مغولی می‌باشد (Weijerman et al. 2010). از جمله مهمترین عوارض این سندرم بیماری مادرزادی قلبی، آترزی یا تنگی دوازدهه، مقعد سوراخ نشده یا بسته[1]، بیماری هیرشپرونگ، هیپوتونی یا شلی عضلانی، نقایص سیستم ایمنی، افزایش خطر بروز لوکمی و بیماری آلزایمر، می‌باشد (Epstein et al. 1991). به علاوه، به دلیل عدم تعادل مفصل atlantoaxial که در ۲۰ درصد این بیماران مشاهده می‌شود، خطر صدمات طناب نخاعی حدود ۲-۱ درصد است (Weijerman et al. 2010).

غربالگری غیر تهاجمی سنتی پیش از تولد تریزومی ۲۱

در حال حاضر غربالگری برای این سندرم به دو صورت تهاجمی[2] و غیرتهاجمی[3] (جدول ۱) انجام می شود. افرادی که آزمون غربالگری غیر تهاجمی‌شان مثبت شده است برای انجام روش‌های تهاجمی کاندید می‌شوند تا تشخیص قطعی انجام گیرد. در روش‌های غیرتهاجمی فعلی تعدادی از مارکرهای بیوشیمیایی در خون مادر همراه با یا بدون بررسی‌های سونوگرافی مورد توجه و اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. در تخمین میزان خطر در همه این روش‌ها سن مادر (بالای ۳۵ سال) نیز در نظر گرفته می‌شود (جدول ۱). از جمله مهمترین مارکرهای سونوگرافیکی که در برنامه‌های غربالگری‌ها مورد توجه و اندازه‌گیری قرار می‌گیرد میزان شفافیت پشت گردنی[4] یا NT است. اندازه طبیعی NT در حد فاصل هفته‌های ۱۳-۱۱ بین ۲/۶-۲ میلی‌متر می‌باشد که افزایش اندازه آن با افزایش خطر سندرم ترنر، تریزومی ۱۳ / ۱۸ و تریپلوئیدی‌ها نیز علاوه بر سندرم داون همراه است (Snijders et al. 1999). با این وجود NT تنها یک مارکر اختصاصی برای اختلالات کروموزومی نیست و حتی در صورت طبیعی بودن سایر مارکرهای غربالگری، افزایش میزان NT به حد بالاتر از صدک ۹۵ درصد میزان تولد نوزاد سالم را به طور کلی کاهش می‌دهد. افزایش میزان NT با افزایش میزان فراوانی سندرم‌ها و بدشکلی‌های متعدد ژنتیکی به ویژه نقایص قلبی و عروقی همراهی نشان داده است (Bahado-Singh et al. 2005). با این وجود این نکته نیز قابل تاکید است که افزایش کم NT یک بدشکلی در نظر گرفته نمی‌شود و در حدود ۹۰ درصد تمامی حاملگی‌هایی که در آنها میزان NT کمتر از ۴/۵ میلی‌متر است منجر به تولد نوزاد سالم می‌شوند. در صورت ترکیب انواع غربالگری فوق، میزان کلی مبتلایان به سندرم داونی که یافت می‌شوند با میزان غربال مثبت ۵ درصد، به ۹۳ درصد می‌رسد. برای تعیین میزان خطر علاوه بر نتایج تست‌های بیوشیمیایی فوق‌الذکر و مارکرهای سونوگرافی، اطلاعات دموگرافیک مادر شامل سن، وزن، سن حاملگی، وضعیت دیابتی و نژاد نیز به نرم‌افزار غربالگری پیش از تولد داده می‌شود. تمام اطلاعات بر اساس Multiple of Mediam (MoM) به نرم‌افزار داده می‌شود. در واقع MoM، مقادیر مربوط به هر یک از ماکرها را برای دیگر متغیرها نظیر وزن مادری و نژاد و به ویژه سن حاملگی اصلاح می‌کند. میزان طبیعی MoM برای تمام مارکرهای شیمیایی به طور متوسط ۰/۱ در نظر گرفته می‌شود. چنانچه خطر محاسبه شده از Cut off بالاتر باشد غربالگری مثبت و چنانچه کمتر باشد منفی گزارش می‌شود (Milunsky et al. 1988).

غربالگری تهاجمی پیش از تولد تریزومی ۲۱

مهمترین روش‌های تهاجمی غربالگری آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی از جمله سندرم داون که روش‌های تشخیصی نیز

[1] Imperforated anus
[2] Invasive
[3] Non-invasive
[4] Nuchal translucency

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

جدول ۱- انواع بررسی های سنتی غیرتهاجمی سندرم داون

فاصله اطمینان ۹۵ درصد (٪)	میزان مثبت کاذب با در نظر گرفتن ۸۵ درصد میزان شناسایی موارد سندرم داون	نحوه اندازه گیری	نوع بررسی
1.0–1.4 (1.2–1.4a)	1.2 (1.3a)	NT و PAPP-A در هفته‌ی دهم حاملگی/ AFP و uE3 و βhCG آزاد و Inhibin A در حدفاصل هفته‌های ۲۰-۱۴	بررسی یکپارچه
2.4–3.0 (4.4–5.4a)	2.7 (4.9a)	بررسی جامع بدون اندازه‌گیری NT. PAPP_A در هفته‌ی دهم حاملگی	آزمایش جامع سرمی
5.6–6.5 (5.5–6.5a)	6.1 (6.0a)	NT، βhCG آزاد و PAPP_A در انتهای هفته‌ی دهم حاملگی	آزمایش ترکیبی
5.8–6.6	6.2	بررسی جامع به جز اندازه‌گیری NT و PAPP-A در هفته‌ی دهم حاملگی	آزمایش چهارگانه
8.8–9.8	9.3	آزمایش چهارگانه به جز اندازه‌گیری Inhibin-A	آزمایش سه گانه
12.5–13.7	13.1	اندازه‌گیری βhCG آزاد و AFP در حدفاصل هفته‌های ۲۰-۱۴	آزمایش دوگانه
18.6–21.4	20.0	اندازه‌گیری NT در هفته‌های ۱۳-۱۲	اندازه‌گیری NT

جدول ۲- تغییرات مارکرهای بیوشیمیایی و سونوگرافی در حاملگی مبتلا به تریزومی ۲۱

تست بیوشمیایی/ سونوگرافی	تغییر در حاملگی مبتلا به تریزومی ۲۱	مقادیر تغییریافته در حاملگی مبتلا به تریزومی ۲۱ (MoM)	Cut off غربالگری مثبت
AFP	کاهش	<0.4	
uE3	کاهش	<0.5	
Inhibin A	افزایش	>2.5	>1.270
hCG	افزایش	>2.5	
PAPP-A	کاهش	<0.4	
NT	افزایش		
	(>3 mm)	1.8-2	

می‌باشند شامل آمنیوسنتز و Chorionic villus sampling (CVS) می‌باشد که در آنها کاریوتیپ جنین با گرفتن نمونه‌های به ترتیب مایع آمنیون و پرزهای کوریونی تعیین می شود. در این دو روش میزان سقط به ترتیب برابر ۰/۵ و یک درصد خواهد بود که البته تا حدود زیادی به مهارت متخصص مربوطه نیز بستگی دارد. موارد انجام این دو آزمایش تشخیصی عبارتند از: الف) سابقه قبلی داشتن حاملگی مبتلا به سندرم داون؛ ب) سن بالای ۳۵ سال؛ ج) پدر و مادر حامل ترانسلوکاسیون یا جابجایی کروموزومی؛ د) افرادی‌که در غربالگری اولیه مثبت در نظر گرفته شدند و ه) وجود یکی از مارکرهای اختلالات کروموزومی در بررسی‌های سونوگرافی (Shulman et al. 1993). CVS به دلیل احتمال بروز نقایص عضوی این فرآیند نباید زودتر از هفته ۱۰ انجام شود و معمولا حدود هفته‌های ۱۳-۱۱ انجام می‌شود. با کشت مستقیم کوتاه مدت بافت سیتوتروفوبلاستیک پرزهای جفتی که فعالانه در حال تقسیم هستند، نتایج اولیه بررسی طی مدت ۲-۱ روز پس از نمونه‌گیری آماده می‌شود. اما در کشت بلند مدت، سلول‌های مزانشیمال پرزهای جفتی پاسخ بررسی کاریوتایپ جنینی به طور معمول ۱۴-۱۰ روز به طول می‌انجامد. در مواردی‌که این روش توسط افراد خبره انجام نشود ممکن است خطر سقط بیش از یک درصد باشد (Gnys-Wiercioch et al. 2012; Jorge P 2014). یکی از مهمترین محدودیت‌های استفاده از CVS این است که نمونه‌ای که بررسی می‌شود معمولا از بخش خارج رویانی جفت یا تروفواکتودرم تهیه می‌شود. اگر چه هر دوی جفت و جنین از تخم مشابهی منشا می‌گیرند، در برخی موارد (۲-۱ درصد) میان توزیع کروموزومی سلول‌ها در جفت و جنین ناهمگونی وجود دارد که به عنوان موزائیسم کروموزومی اطلاق می‌شود که می‌تواند موجب ابهام در تشخیص نهایی شود (Ledbetter et al. 1992). آمنیوسنتز معمولا حدود هفته ۱۵ حاملگی انجام می‌شود ممکن است به دلیل تاخیر در انجام و پاسخ غربالگری سه ماهه دوم تا هفته ۲۰-۱۹ به تاخیر افتد. انجام این تست زودتر از هفته ۱۵ نیز امکانپذیر است اما با خطر بیشتر سقط و کاهش مایع آمنیون همراه خواهد بود. در این

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

نوع بررسی نمونه از سلول‌های موجود در مایع آمنیوتیک تهیه می‌شود و جهت انجام کاریوتایپ یا بررسی‌های بیوشیمیایی ارسال می‌شود. یکی از مهمترین معایب آمنیوسنتز این است که به دلیل دست‌یابی به تعداد اندکی از سلول‌های جنینی ممکن است قادر به تشخیص موزائیسم نباشد. از طرف دیگر علیرغم اینکه احتمال سقط کمتری نسبت به CVS دارد انجام و تهیه دیررس پاسخ آزمایش می‌تواند تصمیم‌گیری برای حاملگی مبتلا را در سنین بالای حاملگی مشکل سازد (Gnys-Wiercioch et al. 2012). اگرچه انجام هیبریداسیون درجای فلورسنت (FISH) می‌تواند پاسخ سریع‌تری نسبت به کاریوتایپ ظرف ۲-۱ روز فراهم کند اما وجود میزان نسبتا زیاد موارد مثبت کاذب نتیجه-گیری را مشکل می‌سازد که اغلب نیاز به تایید دارد. از طرف دیگر FISH در تشخیص موزائیسم روش قدرتمندی نیست (Elsayed et al. 2013; Zhu et al. 2014). با وجود اینکه این روش‌های ترکیبی غربالگری غیرتهاجمی حساسیت نسبتا بالایی دارد اما با توجه به این که نیاز به انجام غربالگری در سه ماهه دوم بارداری دارد، زمان طلایی برای دادن پاسخ به والدین جنین و اقدامات لازم برای سقط جنین مبتلا را محدودتر می‌کند. بنابراین هنوز آزمون غیرتهاجمی صد یا نزدیک به صددرصد وجود ندارد که بتواند سندرم داون را بویژه در اوایل بارداری شناسایی کند.

غربالگری غیرتهاجمی پیش از تولد تریزومی ۲۱ از طریق خون مادر

در چند سال اخیر تلاش‌های بسیاری در جهت دستیابی و بررسی نوکلئیک اسیدهای آزاد شده از سلول جنینی موجود در خون مادر (cffDNA) به منظور غربالگری و تشخیص بیماری‌های جنینی به ویژه بیماری‌های ژنتیکی و کروموزومی انجام گرفته است. علیرغم تصور اولیه مبنی بر غیرقابل نفوذ بودن جفت، ترافیک دو طرفه‌ای میان جنین و مادر در دوران حاملگی وجود دارد (Lo et al. 1996). توسعه روش‌های غیرتهاجمی تشخیص پیش از تولد با شناسایی سلول‌های جنینی در خون مادر توسط Bianchi et al. (1997) آغاز شد آنها نشان دادند که میزان انتقال سلول‌های جنینی از جنین به مادر در آنیوپلوئیدی‌های جنینی افزایش می‌یابد. پس از آن نیز مطالعات بسیاری در جهت جداسازی انواع سلول‌های جنینی هسته‌دار از جمله سلول‌های اریتروسیتی هسته‌دار، گرانولوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و احتمالا سلول‌های بنیادی مزانشیمال صورت گرفت (Jackson 2003; Sekizawa et al. 2007). شناسایی برخی آنیوپلوئیدی‌های جنینی با استفاده از FISH به کمک پروب‌های DNA اختصاصی کروموزوم که به دنبال آن روش‌های متعدد دسته‌بندی و غنی-سازی انجام می‌شود نیز امکانپذیر به نظر می‌رسید (Pezzolo et al. 1997). اما چندین مشکل بر سر راه بررسی سلول جنینی از طریق خون مادری وجود داشت. اول اینکه تعداد سلول های جنینی در خون مادری بسیار کم است (یک سلول در هر میلی-لیتر خون مادر)؛ دوم، مشکلاتی است که در جداسازی سلول جنینی وجود دارد. به علاوه اینکه معمولا بررسی کروموزومی یک هسته متراکم مربوط به سلول جنینی که در میان چندین سلول مادری محصور شده است تفسیر نتایج را مشکل می‌سازد (Babochkina et al. 2005). از طرف دیگر بجز سلول‌های هسته دار اریتروسیتی، دیگر سلول‌های جنینی می‌توانند تا ده‌ها سال در خون مادر باقی بمانند که می‌تواند منجر به نتایج کاذب مثبت در حاملگی‌های بعدی شود (Bianchi et al. 1997). به علاوه، کمبود مارکرهای اختصاصی جنینی یکی دیگر از مهمترین محدودیت-های استفاده از سلول‌های جنینی است (Avent et al. 2008). از اسیدهای نوکلئیک آزاد در خون می‌توان به عنوان مارکرهای مناسب جهت تشخیص و غربالگری استفاده کرد هم چنان که اسیدهای نوکلئیک آزاد می‌توانند مارکر مناسبی برای غربالگری، تشخیص و پیگیری سرطان‌های مختلف باشند (Ghafouri-Fard et al. 2009). شناسایی اسیدهای نوکلئیک آزاد جنینی راه را برای تشخیص و غربالگری موفق‌تر پیش از تولد اختلالات جنینی هموارتر کرد. مدتی بعد Lo et al. (1996) توانستند DNA جنینی در سرم (cffDNA)، پلاسما و گلبول‌های سفید ۴۳ زن حامله را با روش Y-PCR شناسایی کنند. مقدار DNA جنینی به صورت آزاد تقریبا ۱۰۰۰ برابر مقداری بود که از سلول آزاد جنینی موجود در خون مادر به دست می‌آمد. منشا DNA جنینی سلول-های تروفوبلاست جفت هستند که دچار آپوپتوز شده‌اند (Alberry et al. 2007). همان گروه پژوهشی پس از طی مطالعات بسیاری نشان دادند که با استفاده از cffDNA می‌توان برخی اختلالات جنینی مانند اختلالات وابسته به X از جمله هموفیلی (Tsui et al. 2011)، وضعیت Rh یا Rhesus D

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

جدول ۳- مقایسه روش های مختلف استفاده شده در غربالگری غیرتهاجمی سندرم داون از طریق خون مادر

نوع روش	حساسیت (٪)	ویژگی (٪)	معایب	محاسن
Digital PCR	میزان دقت شناسایی برابر ۹۷-۹۹		بهینه‌سازی طاقت‌فرسا، نیازمند کسر بالایی از DNA ی جنینی و در نتیجه سکوهای اتوماتیک برای انجام همزمان هزاران PCR، نیازمند تجهیزات ویژه	نیاز به جداسازی DNA ی جنینی ندارد، نیاز به ژن استاندارد یا مرجع ندارد
Next generation sequencing (NGS)	۹۴-۱۰۰	۹۶-۱۰۰	تجهیزات گران قیمت، عدم سهولت دسترسی، فرآیند پیچیده‌ی آماده‌سازی نمونه	امکان پاسخ‌دهی سریع، نیاز به جداسازی DNA ی جنینی ندارد، هزینه‌ی زیاد
MeDIP-Real time PCR	۱۰۰	۱۰۰		قابل انجام در هر نقطه از دنیا، عدم نیاز به تجهیزات گران‌قیمت و پیچیده، امکان پاسخ‌دهی سریع به بیمار حتی در سه ماهه‌ی اول بارداری، هزینه ی کم

(Daniels et al. 2010) و برخی اختلالات تک ژنی مانند β-تالاسمی (Li et al. 2005)، هیپرپلازی مادرزادی آدرنال (Chiu et al. 2002) و دیستروفی میوتونیک (Amicucci et al. 2000) را تشخیص داد. اگرچه DNA جنینی از هفته چهارم حاملگی قابل تشخیص است اما استفاده از آن برای تشخیص و غربالگری از هفته هفتم حاملگی قابل قبول و اعتماد است. غلظت DNA جنینی در سه ماهه اول حاملگی برابر ۱۶ ژنوم در میلی‌لیتر خون مادر است که در هفته هشتم حاملگی به اوج خود می‌رسد (Birch et al. 2005). با وجود اینکه ممکن است DNA آزاد جنینی تا چند روز پس از ختم حاملگی در خون مادر یافت شود اما نیمه عمر DNA جنینی برابر ۱۶ دقیقه است و معمولا ظرف مدت دو ساعت پس از زایمان از خون مادر کاملا حذف می‌شود و بنابراین مشکل باقی ماندن سلول جنینی تا حاملگی‌های بعدی را ندارد (Lo et al. 1999).

استفاده از RNA آزاد جنینی در غربالگری غیرتهاجمی

Poon et al. (2000) نشان دادند که علاوه بر DNA جنینی، RNA جنینی نیز در خون مادر یافت می‌شود که در واقع ناشی از ژن‌هایی است که به طور انحصاری در جفت بیان می‌شوند (Poon et al. 2000). وجود RNA جنین پسر در خون مادر به دلیل بیان ژن‌های مختص کروموزوم Y موجود در جفت بود که شناسایی شد. پس از آن مجموعه ترانسکریپتوم جنینی حاصل از بیان کروموزوم‌های اتوزومی نیز برای شناسایی توالی‌های اختصاصی جنینی موجود در خون مادر مورد استفاده قرار گرفت (Tsui et al. 2006). RNA آزاد جنینی (cffRNA) نیز همانند cffDNA از سه ماهه اول حاملگی در خون مادر قابل تشخیص است و بلافاصله پس از زایمان با نیمه عمر ۱۴ دقیقه از خون مادر حذف می‌شود (Chiu et al. 2006). نکته قابل توجه در مورد cffRNA این است که مقدار کل آن در کل حاملگی حتی بعد از انجام روش‌های تهاجمی مثل CVS یا آمنیوسنتز ثابت است و تغییر نمی‌کند. همچنین به طور معمول cffRNA موجود در خون مادر از نوع قطعات ۵'mRNA می‌باشد (Wong et al. 2005). اگرچه علت این مساله مشخص نیست اما از این طریق می‌توان تعیین کرد که کدام نوع mRNA جنینی را می‌توان در خون مادر یافت. در مقایسه‌ای که روی نمونه‌های بندناف جنینی، جفتی و مادری انجام شد مشخص شد که hPL mRNA در هردو نمونه مادری و جفتی یافت می‌شود اما در نمونه بندناف جنین وجود ندارد (Ng et al. 2003). این نتیجه نشان داد که انتقال hPL mRNA از جفت به درون گردش خون مادری یک طرفه بوده که برخلاف جریان انتقال cffDNA دو طرفه است. در تحقیق دیگری Maron et al. (2007) نقش ژن‌هایی که به طور اختصاصی در جفت بیان می‌شوند را بررسی کردند. نتیجه مطالعه نشان داد که از بین ۱۵۷ رونوشتی که تفاوت معناداری بعد و قبل از تولد جنین در خون مادر دارند، ۷۰ رونوشت نقش عملکردی و تکاملی داشتند و در فرآیند های مهم زیستی دخیل بودند. از بین این ۷۰ رونوشت، ۲۷ ژن در تکامل سیستم‌های عضلانی اسکلتی، عصبی و اپیدرم نقش داشتند، ۵ ژن در دریافت حواس بینایی و بویایی دخیل بودند. به علاوه ۲۲ ژن نقش بسزایی در عملکردهای فیزیولوژیک جنینی داشتند و ۱۷ ژن مربوط به سیستم دفاعی بدن بودند. در مجموع، بررسی این دسته از ژن‌های اختصاصی جفت بیانگر این مهم است که جنین در حال آماده‌سازی برای ترک رحم است. *ROBO4* از

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

جمله ژن‌هایی است که در فرآیندهای تکاملی دخیل است و دو ژن *NPR1* و *GDF9* که بیان انحصاری و بسیار بالایی در جنین و نوزاد دارند احتمالا در پاسخ‌های فیزیولوژیکی نوزاد نقش دارند (Maron et al. 2007).

در بررسی حاملگی‌های مبتلا به تریزومی ۱۸ گزارش شده که میزان رونوشت β–hCG در سه ماهه اول حاملگی کاهش می‌یابد (Ng et al. 2004). در مطالعه دیگری که نتایج آن با استفاده از تکنیک میکروآرایه مشخص شد Lo et al. (2007) بیان کردند که mRNA مربوط به ژنی که به طور اختصاصی در جفت بیان می‌شود با نام اختصاصی جفت ۴ یا *PLAC4* در سرم مادر قابل شناسایی و تشخیص می‌باشد و بلافاصله پس از زایمان از خون مادر حذف می‌شود (Lo et al. 2007). بر این اساس، Lo et al. (2007) راهکار جدیدی برای شناسایی آنیوپلوئیدی‌های جنینی ارائه کردند که بر مبنای نسبت آللی SNP–RNA بود که مطابق آن میزان دوز کروموزوم ۲۱ از طریق mRNA مربوط به ژن *PLAC4* که در خون مادر آزاد می‌شود تعیین می‌شد. چنانچه جنین برای SNPای که در ناحیه رمزگردان ژن *PLAC4* قرار دارد هتروزیگوت باشد، در توالی DNA آن دو آلل مجزا قابل تشخیص خواهد بود و در صورتی‌که جنین یوپلوئید و نرمال باشد طبیعتا دو نسخه از کروموزوم ۲۱ و در نتیجه دو نسخه از ژن *PLAC4* خواهد داشت. در این حالت با در نظر گرفتن این نکته که هیچ گونه برتری و ترجیح اختصاصی برای بیان این ژن در هر یک از دو آلل وجود ندارد و میزان mRNA نسخه‌برداری شده از هر دو آلل به میزان یکسانی است، نسبت SNP در هر دو آلل ۱:۱ خواهد بود (Lo et al. 2007). اما اگر نسبت آللی SNP، ۱:۲ یا ۲:۱ باشد به این معناست که جنین مبتلا به تریزومی ۲۱ است. Lo et al. (2007) نشان دادند که این روش به ترتیب حساسیت و ویژگی برابر ۹۰ درصد و ۹۵/۶ درصد خواهد داشت اما مهمترین مشکل این رویکرد این است که لازم است SNP مورد نظر هتروزیگوت باشد و بنابراین در همه حاملگی‌ها قابل استفاده نخواهد بود. در آخرین بررسی که تاکنون انجام شده، Hua R et al. (2014) نشان دادند که با استفاده از تکثیر ژنومی و توالی‌یابی نسل جدید، می‌توان با استخراج گلبول قرمز هسته‌دار جنینی از خون مادر آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی را تشخیص داد (Hua et al. 2014). از آنجا که RNAهایی وجود دارند که به طور اختصاصی فقط در حاملگی بیان می‌شوند بررسی‌های بیشتر و دقیقتر روی این منشا جنینی می‌تواند افق‌های جدیدی برای تشخیص غیرتهاجمی اختلالات جنینی فراهم آورد.

راهکارهای ارائه شده برای استفاده از cffDNA درغربالگری غیرتهاجمی

تاکنون اکثریت مطالعات روی روش‌های مختلف غربالگری و تشخیص اختلالات جنینی از طریق DNA آزاد جنینی صورت گرفته است و حجم بررسی‌های RNA جنینی کم و محدود به اختلالات خاص جنینی است. اما استفاده از DNA آزاد جنینی نیز با چندین مشکل مواجه شد که عبارتند از:

۱) میزان نسبتا کم cffDNA در خون مادر به ویژه در هفته‌های اول حاملگی

۲) تفاوت در میزان کل cffDNA موجود در خون بین افراد مختلف

۳) جنین تنها نصف ژنوم خود را از مادر به ارث می‌برد.

از میان این مشکلات، مهمترین چالش میزان بسیار کم cffDNA در خون مادر است به‌نحوی‌که تنها ۱۰–۳ درصد از کل DNA موجود در خون مادر را DNA جنینی تشکیل می‌دهد (Lun FM 2008). بنابراین مهمترین نکته اولیه در بررسی cffDNA جداسازی DNA آزاد مادری از DNA آزاد جنینی است. دو راهکار اولیه برای کاهش میزان DNA مادری در cfDNA استخراج شده از خون مادر ارائه شد. راهکار اول بر اساس تفاوت در اندازه DNA جنینی و مادری بود. از آنجا که اندازه DNA جنینی معمولا کوچک و کمتر از ۳۰۰ جفت باز است، می‌توان آن را از DNA مادری بر اساس اندازه جدا کرد (Li et al. 2004). در این راستا کیت‌ها و ستون‌های متعددی ارائه شدند که DNAهای بزرگ مادری عبور می‌دهند و در عوض DNAهای کوچک جنینی را حفظ می‌کنند (Legler et al. 2007). اما مهمترین معایب این روش عبارتند از: ۱) روش‌های فعلی الکتروفورز سخت و طاقت فرسا، معمولا زمان بر و مستعد آلودگی هستند; ۲) معلوم نیست که DNA به دست آمده با این روش تا چه اندازه واقعا مربوط به جنین است و می‌تواند برای بررسی‌های کروموزومی کافی باشد (Lo 2008). راهکار دوم، جلوگیری از رها شدن DNA مادری از سلول‌های گلبول سفید خون با استفاده از افزودن مواد تثبیت

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

کننده غشایی مانند فرمالدهید به نمونه سرم مادر قبل از سانتریفیوژ بود تا نسبت نهایی DNA جنینی به DNA مادری افزایش یابد. جهت غلبه بر آلودگی حاصل از روش‌های سنتی الکتروفورز، برای اولین بار پروتکل جدیدی برای الکتروفورز موئینه‌ای طراحی شد تا بر اساس آن غنی‌سازی قطعات جنینی در نمونه‌های DNA آزاد تام استخراج شده از خون مادر بر اساس اندازه تایید شود (Karami 2014). با استفاده از این پروتکل ساده و سریع، مشخص شد که روش استخراج DNA معرفی شده قادر است قطعات DNA مربوط به جنین را که به طور متوسط کمتر از ۱۵۰ جفت باز هستند را جدا کند. تلاش‌های بعدی در جهت کشف مارکرهای اختصاصی جنینی بود تا بدین وسیله بتوان بر کم بودن میزان DNA جنینی در DNA استخراج شده از سرم مادر غلبه کرد و میزان موارد منفی کاذب را کاهش داد. استفاده از تفاوت در تعداد تکرار توالی‌های تکراری مانند توالی‌های تکراری کوتاه (STR) و پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) یا جهش-های نقطه‌ای دو استراتژی بعدی بودند که بسیار مورد توجه قرار گرفتند.

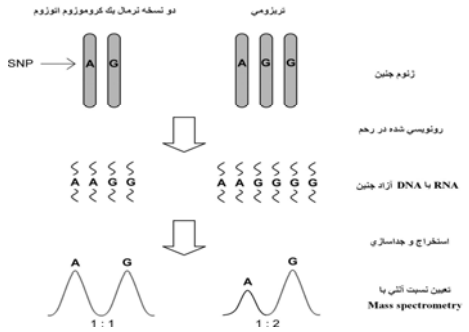
روش‌های غربالگری غیرتهاجمی مبتنی بر SNP و STR

از آنجا که هر جنین آلل‌های متفاوتی با تعداد تکرار متفاوت از توالی‌های STR به ارث می‌برد با مقایسه تعداد تکرار موجود در مادر و پدر، از نواحی DNA تکراری مختلفی می‌توان برای شناسایی توالی‌های به ارث رسیده از پدر استفاده کرد. به این ترتیب که تکثیر توالی‌های STR منجر به ایجاد دو محصول می-شود، یکی توالی‌های تکراری مادری که در DNA تکثیر شده مادر نیز وجود دارد و دیگری توالی‌های تکثیر شده به ارث رسیده از پدر (شکل۱). این روش ابتدا توسط Pertl et al. (2000) معرفی شد و تا سال ۲۰۰۷ تا تکثیر توالی‌های تکراری متفاوت با استفاده از Real Time PCR توسعه یافت (Liu et al. 2007). تاکنون حساسیت و ویژگی این روش به خوبی مشخص نشده و برای اینکه برای تشخیص به کارگرفته شود نیازمند بهینه‌سازی بیشتری است. روش دوم استفاده از جهش‌های نقطه‌ای یا SNPهایی است که بین ژنوم مادری و پدری تفاوت ایجاد می‌کند (Dhallan et al. 2007). در این روش، SNPهای پدری، مادری و جنینی موجود در به ترتیب خون پدر، بافی کوت مادر و سرم مادری به صورت باندهایی روی ژل‌های توالی‌یابی ارزیابی می‌شوند. با مقایسه شدت باندهای مربوط به جنین به اضافه مادر با باند منحصر به جنین می‌توان دوز مربوط به کروموزوم ۲۱ را تخمین زد (Dhallan et al. 2007). گروه دیگری ترکیبی از SNP های جفت در نواحی ژنومی که بسیار آموزنده هستند را شناسایی کردند و سپس با استفاده از الکتروفورز موئینه‌ای[1] دمایی چرخشی کسر دوز مربوط به جنین را ارزیابی کردند. این محققین دریافتند که این روش حتی زمانی که کسر جنینی حتی حدود دو درصد است نیز قابل استفاده است (Ghanta et al. 2010). در روش پیچیده-تری که توسط Zimmermann et al. (2012) معرفی شد، به طور همزمان توالی مربوط به ۱۱۰۰۰ SNP تکثیر و سپس تعیین توالی شدند (Zimmermann et al. 2012). هر محصول تکثیر بر اساس این فرضیه که جنین موزومیک، دیزومیک و یا تریزومیک است ارزیابی می‌شد. بعد از در نظر گرفتن مکان هر SNP روی کروموزوم مربوطه و با در نظر گرفتن احتمال نوترکیبی، حداکثر احتمال اینکه جنین نرمال، آنیوپلوئید برای هریک از کروموزوم-های ۱۳، ۱۸، ۲۱ و کروموزوم‌های جنسی و یا تریپلوئید باشد، محاسبه می‌شد. به لحاظ تئوری، استفاده از SNPها بایستی برتر از شمارش کل توالی باشد. به علاوه ممکن است SNPها اطلاعات مهمی در مورد خاستگاه آنیوپلوئیدی، نوترکیبی و وراثت جهش‌ها فراهم آورد. از طرف دیگر، SNPها تنها ۱/۶ درصد کل ژنوم انسان را تشکیل می‌دهند و بنابراین غنی‌سازی DNA جنینی، توالی‌یابی دقیق‌تر و عمیق‌تر و سطح بالایی از تکثیر برای شناسایی حاملگی‌های حامل عدم تعادل‌های خفیف ضروری است (Liao et al. 2012). زمانی‌که تعداد جایگاه‌های محدودی برای تحلیل استفاده می‌شود، توجه زیادی لازم است که نواحی ژنومی‌ای که ممکن است در آنها CNVهای نادر و خوش‌خیم رخ دهد در نظر گرفته نشوند. رویکرد استفاده از SNP می‌تواند منجر به شناسایی غیرعمدی ناپدری یا حتی ازدواج فامیلی شود. همچنین، در مواردی که باروری به کمک تخمک اهدایی از یک فرد دهنده غیر خویشاوند صورت می‌گیرد، رویکردهایی که بر مبنای SNP هستند جهت در نظر گرفتن احتمال وجود آلل‌های اضافی جنینی که از مادر منشا می‌گیرند و در نامادری وجود ندارد ممکن است

[1] Cycling temperature capillary electrophoresis (CTCE)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

نیاز به تغییر و اصلاح داشته باشند. نکته مهم دیگر این است که روش‌های آزمایشگاهی و تحلیل داده‌ها در روش‌های مبتنی بر SNP و روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی و شمارش هدف‌دار توالی-های DNA متفاوت است.



شکل۱- اصول محاسبه دوز کروموزومی با استفاده از نسبت آللی یک SNP هتروزیگوت روی cffDNA یا cffRNA استخراج شده از خون مادر (Wright 2009).

با وجود اینکه از آلل‌های پدری موجود بر روی کروموزوم‌های اتوزوم نیز می‌توان استفاده کرد، اما مهمترین محدودیت استفاده از این روش این است که نیازمند دانستن جزئیات توالی مربوط به ژنوم پدری و استفاده از تکنیک‌هایی است که بتواند تفاوت حتی یک نوکلئوتید را تشخیص دهد. علیرغم معرفی روش‌های قدرتمندتری نظیر میکروآرایه هیبریداسیون مقایسه‌ای ژنومی یا aCGH همراه با میکروآرایه SNP مطالعه چند مرکزی NIH بیانگر مشکل استفاده همزمان از میکروآرایه SNP و aCGH نیز بود که در نتیجه این روش‌ها معمولا واریانت‌های ژنتیکی متعددی نیز شناسایی می‌شوند که اهمیت آنها مشخص نیست و تاکنون با بیماری یا علائم خاصی گزارش نشده‌اند.

معرفی Mass spectrometry و Digital PCR برای غربالگری غیرتهاجمی جنین

تکنیک‌های نظیر Mass spectrometry (MS) و Digital polymerization chain reaction (Digital PCR) نیز قادرند توالی مربوط به DNA آزاد جنینی را تشخیص دهند. با استفاده از این تکنیک‌ها دیگر نیازی به شناسایی و تعیین پلی‌مورفیسم‌ها در جنین نیست و بنابراین قابل استفاده در تمام انواع آینوپلوئیدی‌ها هستند. در این روش‌ها، دوز کروموزومی مستقیما با مقایسه نسبت کروموزوم مورد نظر به کروموزوم مرجع تعیین می‌شود به طوری-که چنانچه این نسبت ۱:۱ باشد جنین نرمال و اگر ۲:۳ باشد جنین مبتلا به آنیوپلوئیدی است. لازم به ذکر است که در تکنیک Digital PCR، مولکول‌های DNA الگوی منفرد با رقت‌های سریال استخراج و سپس تکثیر می‌شود. سپس میان رقت‌هایی که تکثیر یافته‌اند نسبتی گرفته می‌شود که بر اساس آن می‌توان غلظت DNA الگو را در نمونه اولیه‌ای که رقیق نشده بود تخمین زد. با استفاده از این روش می‌توان حتی افزایش کمتر از دو برابر در تعداد نسخه‌های یک ژن را شناسایی کرد. زمانی که از این تکنیک در NIPT استفاده می‌شود DNA مادری تا اندازه یک مولکول DNA رقیق می‌شود. بعد از آن، جایگاه هدف تکثیر می‌شود و مقدار آن اندازه‌گیری می‌شود تا میزان دقیق مولکول‌های DNA مشتق شده از کروموزوم‌های کاندید بررسی، مشخص شود. در Digital PCR دیگر نیاز به استفاده از ژن استاندارد یا مرجع نیست (Hall Sedlak et al. 2014). Lo et al. (2007) نشان دادند که با استفاده از Digital PCR می‌توان عدم تعادل آللی یک SNP را روی PLAC4 mRNA در خون مادران حامل جنین‌های مبتلا به تریزومی ۲۱ مشخص کرد. به علاوه این محققین روش Digital PCR دیگری را که فارغ از SNP بود با عنوان روش تعیین دیجیتال دوز نسبی کروموزومی یا Digital relative chromosome dosage (RCD) را نیز بهینه‌سازی کردند (Lo et al. 2007). آنها نشان دادند که روش مورد استفاده در شناسایی صحیح ۹۷ درصد موارد نرمال و مبتلا به تریزومی ۲۱ از طریق خون مادر موفق خواهد بود. Fan et al. (2007) با استفاده از رده‌های سلولی نرمال و تریزومی ۲۱ نشان دادند که استفاده از Digital PCR می‌تواند روش قدرتمندی برای شناسایی حاملگی‌های مبتلا به تریزومی ۲۱ باشد (Fan et al. 2007). در بررسی دیگری که توسط Evans et al. (2012) انجام شد، مشخص شد که روش Digital PCR می-تواند ۹۹ درصد دقت در شناسایی موارد مبتلا به تریزومی ۲۱ و نرمال داشته باشد (Evans et al. 2012). روش MS، بر مبنای گسترش تک آللی یا SABER است که در نهایت آلل تکثیر یافته، تحت MS قرار می‌گیرد. با استفاده از این روش تنها آلل‌های به ارث رسیده پدری شناسایی می‌شوند که حامل جهش نقطه‌ای یا SNP مشخصی هستند و در سرم مادر یافت می‌شوند. در واقع با استفاده از SABER، تنها آلل‌های اختصاصی جنینی که حامل جهش نقطه‌ای یا SNP هستند ترجیحا تکثیر می‌شوند که شناسایی آنها با استفاده از MS در نهایت بهینه می‌شود (Ding et al. 2004)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

(شکل۱). بنابراین به صورت تئوری این تکنیک قادر خواهد بود طیف گسترده‌ای از اختلالات جنینی را تنها با استفاده از وجود یک جهش نقطه‌ای یا SNP که وضعیت متفاوتی میان مادر و جنین دارد و باعث افتراق آنها از یکدیگر می‌شود، تشخیص دهد. با این وجود MS نیازمند تجهیزات گران قیمت است که در هر نقطه از دنیا دسترسی به آن ممکن نیست. بکارگیری Digital PCR نیز بهینه‌سازی بسیار پیچیده و طاقت فرسایی دارد و برای اینکه بتوان با آن به پاسخ قابل اطمینانی برای تشخیص غیرتهاجمی پیش از تولد دست یافت نیازمند استخراج cffDNA به روش مطمئن و قابل اعتمادی دارد که به وسیله آن بتوان حداکثر ممکن DNA جنینی (بیش از ۲۵ درصد) را غنی سازی و جدا کرد (Lo et al. 2007). این در حالیست که به طور معمول کسر DNA جنینی در سه ماهه اول و دوم حاملگی معمولا کمتر از ۲۵ درصد است. از طرف دیگر هر تست Digital PCR لازم است چهار مرتبه تکرار شود زیرا معمولا هزاران نسخه از DNA مادری در هر میلی‌لیتر خون وجود دارد و بنابراین ۱۰ میلی‌لیتر خون مادر برای انجام ده‌ها هزار Digital PCR نیاز است. به همین منظور برای پاسخ‌دهی سریع‌تر به بیمار ممکن است نیاز به Platform یا سکوهای اتوماتیک برای انجام حدود ۸۰۰۰ PCR به ازای هر نمونه باشد. به علاوه، از آنجاکه DNA آزاد در پلاسمای مادری به صورت قطعات کوچک است در Digital PCR به جای هدف‌گیری تنها یک محصول PCR مربوط به کروموزوم ۲۱، چندین محصول تکثیریافته از کروموزوم ۲۱ حاصل می‌شود که در نهایت باعث افزایش تعداد نقاط داده‌ای در حجم ثابت و مشابهی از نمونه خون مادری می‌شود (Lo et al. 2007). اما از آنجا که معمولا مارکرهای جنینی که استفاده می‌شود پدری هستند، تایید تعداد کل کروموزوم‌های جنینی تا سال ۲۰۱۰ به صورت یک چالش باقی مانده بود. جهت تمایز توالی‌های مربوط به جنین از توالی‌های مادری، اولین راه پیشنهاد شده استفاده از مارکرهای ژنتیکی تمایزدهنده مانند جایگاه‌های اختصاصی کروموزوم Y و چند شکل به ارث رسیده پدری بود که یا در ژنوم مادر وجود ندارد یا متفاوت است (Finning et al. 2008). اما این نوع مارکرها تنها محدود به بارداری‌هایی است که جنین پسر است و نتایج منفی آزمون باید با احتیاط فراوان تفسیر شود. به عنوان مثال چنانچه سیگنال مارکر Y وجود نداشته باشد این نتیجه منفی می‌تواند مربوط به جنین مونث باشد، یا میزان cffDNA بسیار کمتر از حد قابل شناسایی در خون مادر باشد و یا DNA به خوبی از خون مادر ایزوله نشده است. از طرف دیگر، شناسایی چندشکلی‌های به ارث رسیده پدری نیاز به دانش قبلی در مورد وضعیت چندشکل والدین دارد و تنها می‌توان برای افرادی استفاده کرد که آن چندشکلی خاص را داشته باشند. بنابراین نیاز به مارکری است که بتواند میان توالی‌های مادری و جنینی افتراق دهد و مستقل از جنسیت و وضعیت پلی مورفیک جنین باشد. در دهه اخیر روش‌های مختلفی بر مبنای توالی یابی DNA گزارش شده که در مجموع حساسیت و ویژگی قابل توجهی در شناسایی موارد مبتلا به انواع آنیوپلوئیدی‌ها داشته است و توانسته بر مشکلات فوق فائق آید.

غربالگری غیرتهاجمی پیش از تولد تریزومی ۲۱ با استفاده از Massively parallel sequencing (MPS)

با استفاده از massively parallel Shotgun sequencing (MPSS)، دیگر نیازی به جدا کردن DNA مادری از جنینی نیست. این تکنیک بر اساس تعیین دیجیتال مقدار کمی DNA با استفاده از توالی‌یابی مستقیم Shotgun نمونه‌های DNA استخراج شده از سرم مادر است. استفاده از Shotgun به این دلیل است که این روش بر اساس توالی‌یابی و شمارش همه نواحی آموزنده کروموزومی است. از آنجا که توالی کل ژنوم انسانی مشخص شده، در ادامه آن منشا کروموزومی قطعات DNA نقشه‌یابی می‌شود و سپس تعداد کل قطعات چه مادری و چه جنینی، به ازای هر کروموزوم تعیین می‌شود. ابتدا کل ژنوم cffDNA از سرم مادر استخراج می‌شود و سپس به قطعات کوچک شکسته می‌شود تا میلیون‌ها واحدهای خوانش مربوط به توالی‌های کوتاه یا برچسب‌ها ایجاد شود. سپس این واحدهای خوانش کنار یکدیگر ردیف می‌شوند و به نقشه ژنوم انسانی نقشه‌یابی می‌شوند تا توالی مرجع انسانی قطعات مشخص شود. در نهایت واحدهای خوانش نقشه‌یابی شده به کروموزوم ۲۱ شمارش می‌شوند و با شمارش مربوط به یک نمونه یوپلوئید نرمال مقایسه می‌شود تا میزان ژنومیک این واحدهای خوانش محاسبه شود. همچنین برای اینکه جواب‌های به دست آمده قابل اطمینان باشد، می‌توان شمارش قطعات مربوط به کروموزوم مورد نظر را با یک کروموزوم دیگری که به نظر می‌رسد در همان دور آزمون، دیزومیک است

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

نرمالایز کرد (Fan et al. 2008). اما یک نکته مهم آن است که تعداد بر چسب‌های توالی‌های کوتاه DNA در هر کروموزوم متفاوت است و به بیان دیگر توزیع غیر یکنواختی در بین کروموزوم‌های مختلف دارند. اگرچه Fan et al. (2008) اینطور گزارش کردند که این تفاوت در الگوی تعداد برچسب‌های توالی-های کوتاه در بین کروموزوم‌ها در همه نمونه‌ها مشترک است که نشان می‌دهد که این تفاوت به احتمال زیاد مربوط به آرتیفکت‌ها یا خطاهای توالی‌یابی است. به علاوه، میانگین چگالی مربوط به هر برچسب توالی در هر کروموزوم با محتوای CG هر کروموزوم ارتباط دارد. اما به نظر می‌رسد که MPSS بسیار حساس است و قادر است افزایش و یا کاهش مقدار توالی‌های مربوط به هر کروموزوم را تشخیص دهد (Fan et al. 2008). قابلیت استفاده از روش MPSS در غربالگری آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی به ویژه سندرم داون در مطالعات بسیاری مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعات در جهت نیل به توالی‌یابی سریع‌تر و کارآمدتر الگوریتم‌های متفاوتی مورد ارزیابی قرار گرفته‌است. Chiu et al. (2011) کارایی بالینی و احتمال عملی روش MPSS را در غربالگری سندرم داون با استفاده از cffDNA موجود در خون مادران حامله پرخطری که جهت انجام CVS یا آمنیوسنتز ارجاع داده شده بودند بررسی کردند. این بررسی روی ۷۵۳ حاملگی از طریق پروتکل توالی‌یابی ۸ گانه و روی ۳۱۴ حاملگی از طریق پروتکل توالی‌یابی دو گانه انجام شد. نتیجه این مطالعه نشان داد که پروتکل دوگانه توالی‌یابی برتر از پروتکل ۸ گانه بود به طوری‌که به ترتیب حساسیت و ویژگی برابر صددرصد و ۹۷/۹ درصد همراه با ارزش پیشگویی مثبت ۹۶/۶ درصد و ارزش پیشگویی منفی صددرصد نشان داد. حساسیت و ویژگی پروتکل ۸ گانه در شناسایی حاملگی‌های سندرم‌داون به ترتیب برابر ۷۹/۱ درصد و ۹۸/۹ درصد همراه با ارزش پیشگویی مثبت و منفی معادل ۹۱/۹ درصد و ۹۶/۹ درصد بود (Chiu et al. 2011). این درحالی بود که Enrich et al. (2011) در مطالعه دیگری در همان سال درصد شکست بیشتری نسبت به گروه قبلی در شناسایی حاملگی‌های مبتلا به تریزومی ۲۱ با استفاده از توالی‌یابی ۴ گانه نشان دادند. مطالعه این گروه روی نمونه‌های سرم مربوط به ۴۴۹ زن حامله پرخطر، مشخص کرد که استفاده از روش MPSS، صددرصد حساسیت و ۹۹/۷ درصد ویژگی در غربالگری سندرم داون دارد (Ehrich et al. 2011).

Chen et al. (2011) نیز روش MPS روی ۳۹۲ زن حامله ارزیابی کردند. با استفاده از رویکرد Z- score، آنها نشان دادند که این روش قادر است ۳۶ درصد موارد تریزومی ۱۳ و ۷۳ درصد تریزومی‌های ۱۸ را با حساسیت و ویژگی به ترتیب برابر ۹۲/۴ درصد و ۹۷/۲ درصد شناسایی کند. اگرچه حساسیت و ویژگی روش MPS با به کار گرفتن روش‌های بیوانفورماتیک برای اصلاح خطای مربوط به محتوای GC ژنومی به صددرصد و ۹۸/۹ درصد برای تریزومی ۱۳ و ۹۱/۹ درصد و ۹۸ درصد برای تریزومی ۱۸ افزایش یافت (Chen et al. 2011).

Faas et al. (2012) به جای استفاده از روش MPS با سنتز، روش MPS با الحاق را با به کارگیری از سکوهای SOLiD ساخت شرکت Applied Biosystems در تشخیص پیش از تولد ۵۲ زن حامله به کار بستند. در این مطالعه، cffDNA استخراج شده از خون مادران حامله تحت دورهای چندتایی ۴، ۸ یا ۱۲ تایی توالی‌یابی شدند. سپس واحدهای خوانش به ژنوم مرجع انسانی نقشه‌یابی شدند و مقدار آنها طبق مکان ژنومی‌شان تعیین شد. تمامی موارد نرمال و مبتلا به آنیوپلوئیدی‌ها به طور کاملا صحیح طبقه‌بندی شدند بنابراین استفاده از روش MPS با الحاق جایگزین مناسبی به نظر می‌رسید (Faas et al. 2012). پس از آن، Lau TK et al. (2012) نیز در بررسی ۱۰۸ زن حامله‌ای که جهت انجام CVS یا آمنیوسنتز ارجاع داده شده بودند روش MPS ۱۲ گانه جدیدی را بر مبنای روش جدید Z-score همراه با کروموزوم ارجای داخلی ارائه کردند. این محققین نشان دادند که چنانچه از توالی‌یابی Z-score و کروموزوم ارجای داخلی همراه با اصلاح GC استفاده کنند، روش MPS قادر به شناسایی تمامی موارد آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی خواهد بود (Lau et al. 2012). Lau et al. (2012) بار دیگر قابلیت روش MPS را روی ۵۶۷ زن حامله‌ای که غالبا از نژاد چینی بودند ارزیابی کردند. این بار نیز با استفاده از روش MPS تمام موارد آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی به درستی دسته‌بندی شدند به‌طوری‌که هیچ مورد مثبت یا منفی کاذب در نتایج آزمون وجود نداشت (Lau et al. 2012).

Spark et al. (2012) نیز در دو مطالعه پی در پی طی سال ۲۰۱۲، قابلیت روش MPSS را در غربالگری پیش از تولد سندرم داون با

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

معرفی دو روش نوین بررسی کردند. در مطالعه اول روی ۲۹۸ نمونه زن حامله، نوعی روش چندگانه موسوم به تحلیل دیجیتال نواحی انتخابی (DANSR) را معرفی کردند که قادر به شناسایی تمام نمونه‌های مبتلا به تریزومی ۱۸ و ۲۱ و نرمال بود (Sparks et al. 2012). در مطالعه دوم، این گروه علاوه بر الگوریتم پیشنهادی قبلی خود، از الگوریتم جدید دیگری با عنوان خطر بهینه‌شده کسر جنینی برای ارزیابی تریزومی (FORTE) برای شناسایی موارد مبتلا استفاده کردند. این محققین دریافتند که استفاده از این دو الگوریتم می‌تواند تمام موارد مبتلا به تریزومی ۲۱ و ۱۸ را به درستی و بدون هیچ مورد مثبت یا منفی کاذبی تشخیص دهد (Sparks et al. 2012).Nicolaides et al. (2013) در مطالعه دیگری روی ۲۴۲ زن حامله‌ای که تحت CVS قرار گرفته بودند، ۱۹۴۸۸ جایگاه پلی‌مورفیک مربوط به کروموزوم‌های ۱۳، ۱۸، ۲۱، X و Y را تکثیر و سپس توالی‌یابی کردند. در نهایت داده‌های حاصل از توالی‌یابی را با استفاده از الگوریتم NATUS تحلیل کردند. این الگوریتم، تعداد نسخه‌های مربوط به هر کروموزوم را تعیین می‌کند و سپس دقت اختصاصی مربوط به هر نمونه را برای هر یک از ۵ کروموزوم مذکور محاسبه می‌کند. بدون هیچ‌گونه نتیجه مثبت یا منفی کاذب، تمامی موارد تریزومی ۲۱، ۱۸ و ۱۳، مونوزومی X و تریپلوئیدی تشخیص داده شدند (Nicolaides et al. 2013). در بررسی قابلیت روش MPS در غربالگری آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی در حاملگی‌های دو قلو، Huang et al. (2014) نشان دادند که ویژگی این روش در شناسایی تریزومی ۲۱ و ۱۸ برابر صددرصد و حساسیت آن برابر ۵۰ درصد بود (Huang et al. 2014). پس از آن Yeang et al. (2014) جهت افزایش دقت توالی‌یابی به روش MPSS، الگوریتم جدیدی را با عنوان نمره نرمالایز شده در سطح ژنومی (GWNS) برای غربالگری آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی از طریق خون ۸۶ مادر معرفی کردند. در واقع این الگوریتم تعداد شمارش‌های خوانش را با ایجاد نسبت میان قطعات DNA مربوط به کروموزوم ۲۱ در افراد کنترل سالم، نرمالایز می‌کند. آنها نشان دادند که الگوریتم GWNS قادر است اختلالات کروموزومی جنین را زمانی‌که کسر کمتری از DNA جنین موجود است بسیار دقیقتر و بهتر از الگوهایی نظیر NCV و Z-score تشخیص دهد (Yeang et al. 2014).

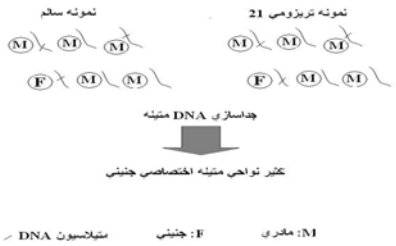
Liao et al. (2014) برای تشخیص غیرتهاجمی پیش از تولد آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی در ۲۲۷۵ زن حامله، در روش MPS از سکوی جدیدی با عنوان سکوی توالی‌یابی نیمه هدایت کننده یا SSP استفاده کردند. در این بررسی ۵۱۵ نفر به صورت گذشته نگر و ۱۷۶۰ نفر به صورت آینده‌نگر مورد بررسی قرار گرفتند. حساسیت و ویژگی استفاده از این سکوی توالی‌یابی برای شناسایی موارد تریزومی ۲۱ به ترتیب برابر ۹۹/۹۴ درصد و ۹۹/۴۶ درصد، برای تریزومی ۱۸ برابر صددرصد و ۹۹/۲۴ درصد و برای تریزومی ۱۳ ۱۰۰ درصد و صددرصد بود (Liao et al. 2014). Willems et al. (2014) اخیرا ارزش انجام تست تجاری هارمونی که توسط شرکت Ariosa Diagnostics انجام می‌شود را روی ۳۰۰۰ نمونه مربوط به زنان هلندی و بلژیکی بررسی کردند. این تست شامل توالی‌یابی cffDNA بر اساس DANSR است با این تفاوت که میزان کسر DNA جنینی در نمونه استخراج شده ارزیابی می‌شود و چنانچه مقدار آن کافی نباشد (کمتر از ۴ درصد کل DNA آزاد استخراج شده) نمونه به بیمار بازگردانده می‌شود. ۱/۸۳ درصد موارد به دلیل کم بودن کسر DNA جنینی از مطالعه خارج شدند. نتیجه این بررسی تشخیص دو مورد منفی کاذب، یکی مربوط به تریزومی ۲۱ و دیگری مربوط به تریزومی ۱۸ بود. همچنین یک مورد مبتلا به تریپلوئیدی که دو بار با استفاده از تست هارمونی نرمال تشخیص داده شده بود، با انجام روش‌های تهاجمی و کاریوتایپ تایید شد (Willems et al. 2014). مطابق آخرین مرجع موجود، در نهایت با توجه به هزینه‌های نسبتا بالای روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی و در دسترس نبودن آنها در تمامی نقاط دنیا هنوز هم نیاز به روش‌های سهل الوصول‌تر و ارزان‌تری هست که بتوان استفاده از آنها را به عنوان جایگزینی برای روش-های غربالگری سنتی که قیمت مناسب‌تری دارند توجیه کرد (Michaelson-Cohen et al. 2014). یکی دیگر از راهکارهایی که برای افتراق DNA جنینی از مادری مورد بررسی قرار گرفته‌است استفاده از تفاوت‌های اپی‌ژنتیک است.

استفاده از تغییرات اپی‌ژنتیکی برای غربالگری غیرتهاجمی حاملگی

اپی‌ژنتیک به طورکلی علم مطالعه تغییرات قابل توارث در بیان ژن یا فنوتیپ سلولی حاصل از مکانیسم‌هایی غیر از تغییرات موجود در توالی DNA است. این مکانیسم‌ها به طور عمده شامل متیله

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

شدن DNA و اصلاحات هیستونی است که هر دوی آنها می‌توانند بدون تغییر توالی DNA بیان ژن را تنظیم کنند. این تغییرات که برگشت‌پذیر هستند، ممکن است در طی تقسیم سلولی و حتی در طی نسل‌های متمادی باقی بمانند و منتقل شوند. به طورکلی در سرتاسر ژنوم انسانی تغییراتی در الگوی متیلاسیون وجود دارد که منجر به تفاوت بیان ژن‌ها در بافت‌های مختلف می‌شود که بسته به نوع بافت متفاوت است (Poon et al. 2002). نوع الگوی متیلاسیون معمولا به دو شکل هیپو یا هیپرمتیلاسیون ژن‌هاست.



شکل۲- استفاده از روش MeDIP-Real time PCR در جداسازی و تکثیر DNA متیله جنینی

برخی از ژن‌های موجود در سلول‌های جفتی به ویژه تروفوبلاست‌ها الگوی متیلاسیون متفاوتی نسبت به سلول‌های مادری دارند. متیله شدن DNA در مطالعات انسانی به ویژه سرطانها به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است و پس از آنکه تعیین شد که متیله شدن DNA می‌تواند مارکر غیرتهاجمی مهمی برای سرطان باشد استفاده از آن در NIPD یا تشخیص پیش از تولد غیرتهاجمی نیز خیلی زود مورد توجه قرار گرفت. اساس آن نیز در نظر گرفتن نواحی ژنومی بود که تحت نقش‌گذاری (Imprinting) اختصاصی یک والد قرار می‌گیرند. به‌علاوه، با استفاده از توالی‌های پلی‌مورفیک موجود در آلل‌های جنینی، از بهم خوردن نسبت ۱:۱ می‌توان برای شناسایی و تشخیص موارد مبتلا به تریزومی استفاده کرد. این نوع رویکرد تنها برای شناسایی تریزومی ۱۸ مورد استفاده قرار گرفت اگرچه در بررسی‌های بالینی دیگر مورد استفاده و مطالعه بیشتر قرار نگرفت (Tong et al. 2006). چنانچه یک زن باردار یک نسخه متیله شده از یک ناحیه نقش‌گذاری شده را از پدرش به ارث ببرد، نسخه متیله نشده را به جنین خود منتقل می‌کند و بنابراین می‌توان بر این اساس میان DNA مادری و جنینی افتراق داد. (Poon et al.(2002 این فرضیه را روی نواحی نقش‌گذاری شده ژن‌های عامل رشد شبه انسولینی دو (Insuline like growth factor 2) و H19 آزمون کردند و با تعیین ژنوتیپ یک چندشکل دوآللی در ناحیه‌ای که متیله شدن متفاوت داشت، آن را ثابت کردند (Poon et al. 2002). به این ترتیب راه برای استفاده از تمایز متیله شدن برای NIPD باز شد اگرچه تلاش‌ها برای یافتن توالی جنینی یا جفتی آغاز شد که الگوی متیله شدن اختصاصی دارند. Chim et al. (2005) دریافتند که پروموتر ژن *maspin* (*SERPINB5*) در جفت هیپومتیله است درحالی‌که در ژنوم مادری به شدت متیله است (Chim et al. 2005). تحلیل ژنوتیپی با استفاده از SNP نشان داد که توالی‌های هیپومتیله *maspin* از جفت نشات می‌گیرد. مثال‌های دیگری از مارکرهای اپی‌ژنتیکی را Chan et al. (2006) (Chan et al. 2006) در ژن *RASSF1A* (*Ras association domain family 1A*) و Tong et al. (2010) در ژن *HLCS* (*holocarboxylase synthetase*) یافتند که هر دو ژن در ژنوم جفتی یا جنینی هیپرمتیله است درحالی‌که در ژنوم مادری متیله نشده‌است. به طور کلی برای شناسایی ژنوم مادری از جنینی با استفاده از مارکرهای اپی ژنتیکی لازم بود که در ابتدا توالی‌های متیله از غیر متیله جدا می‌شد و سپس الگوی متیله شدن اختصاصی جنینی با استفاده از روش‌های مختلف PCR (quantitative real-time PCR یا quantitative methylation-specific PCR) اندازه‌گیری می‌شد. برای انجام مرحله اول دو راه مرسوم وجود داشت که شامل بیسولفیت کردن و استفاده از آنزیم‌های محدودکننده که می‌توانند میان توالی‌های متیله شده و نشده افتراق دهند. استفاده از نمک بیسولفیت موجب تبدیل سیتوزین‌های غیر متیله به یوراسیل می‌شود که در نهایت با Methylation specific PCR و بررسی کمی با Sequencing میزان DNAهای متیله شده موجود در DNA مادری و جنینی با یکدیگر مقایسه می‌شود. اشکال این روش این است که بیسولفیت کردن DNA با تخریب تا ۹۰ درصد آن همراه است که به ویژه با توجه به میزان بسیار کم DNA جنینی در خون مادر روش مناسبی به نظر نمی‌رسد. در روش دوم ابتدا DNA تخلیص شده از خون مادر توسط آنزیم‌های حساس به متیله شدن مانند *Hpa*II بریده می‌شود تا بدینوسیله توالی‌های غیرمتیله مادری حذف شود. سپس DNA متیله جنینی با استفاده از آنتی‌بادی بر علیه پروتئین‌های همراه با DNA متیله مانند MBD2 تفکیک می‌شود. اما در روش جدیدتر که بیش از یک دهه از معرفی آن برای

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

اولین بار می‌گذرد استفاده از آنتی بادی اختصاصی متیل سیتوزین است که در نواحی متیله ژنومی به وفور وجود دارد و به این ترتیب می‌توان DNA متیله را بدون نیاز به اصلاحات شیمیایی و یا آنزیمی غنی‌سازی و جدا کرد و سپس مورد بررسی‌های بیشتر قرار داد. Weber et al. (2005) با استفاده از این تکنیک که MeDIP نام دارد نشان دادند که نواحی ژنومی در در سلول‌های نرمال و سرطانی متفاوت است (Weber et al. 2005). et al. Papageorgiou (2009) با استفاده از تکنیک MeDIP برای اولین بار نشان دادند که می‌توان برخی از توالی‌های جنینی را که به لحاظ الگوی متیلاسیون با DNA معادل مادری خود واقع در کروموزوم ۲۱ متفاوتند را غنی‌سازی و جدا کرد (Papageorgiou et al. 2009). دو سال بعد همین گروه مطالعاتی از همین روش برای غربالگری غیرتهاجمی سندرم‌داون از طریق خون مادر استفاده کردند و به نتایج بسیار جالب توجهی رسیدند (Papageorgiou et al. 2011). در این بررسی، ۱۲ ناحیه از نواحی که در DNA جنینی هیپرمتیله و در DNA مادری هیپومتیله هستند و روی کروموزوم ۲۱ واقع هستند تحت آزمون MeDIP-Real time PCR قرار گرفتند. در نهایت، برای هر نمونه وضعیت نرمال یا تریزومیک بودن کروموزوم ۲۱ با مقایسه ارزش‌های نسبتی حاصل از مقایسه میزان نواحی متیله جنینی بین فرد سالم و فرد مبتلا به تریزومی ۲۱، مشخص شد. با توجه به اینکه روش مورد استفاده توانست تمامی موارد تریزومی ۲۱ و سالم را با حساسیت و ویژگی صددرصد به درستی طبقه‌بندی کند این گروه نتیجه گرفتند که با بررسی ترکیبی از همه ۱۲ ناحیه متیله می‌توان تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد دقیقی برای موارد تریزومی ۲۱ فراهم آورد. اهمیت این روش در مقایسه با انواع روش‌های توالی‌یابی هزینه کم، دقت بالا و سرعت زیاد آن است. بنابراین این روش میزان هزینه غربالگری را به حدود ۱/۳ می‌رساند. از طرف دیگر این روش نسبت به روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی سهل‌الوصول‌تر است و نیاز به نرم‌افزارها و تجهیزات پیچیده ندارد.

نتیجه‌گیری

با وجود اینکه شواهد به نفع استفاده روز افزون از روش MeDIP Real time qPCR -در غربالگری غیرتهاجمی سندرم داون است اما گسترش بی نظیر روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی نیز آنها را در رقابت تنگاتنگی با روش فوق در سرتاسر دنیا قرار می‌دهد. نکته مهم و قابل توجه در بکارگیری هر روش این است که علاوه بر امکان پاسخ‌دهی سریع به والدین نگران و در انتظار، میزان گزارشات مثبت یا منفی کاذب در حداقل باشد. همچنین امکان انجام روش غربالگری در هر نقطه از جهان وجود داشته باشد تا امکان پاسخ‌دهی سریع‌تر را در کنار هزینه کمتر فراهم آورد (جدول۳). میزان هزینه برآورد شده برای غربالگری هر نمونه توسط روش MeDIP- Real time qPCR حدود ۴۰۰ یورو و با روش فعلی Sequencing که در سرتاسر دنیا استفاده می‌شود ۱۹۰۰ دلار آمریکا است. به علاوه برای انجام روش MeDIP-Real time qPCR نیاز به استفاده از دستگاه و تجهیزات خاص و گران قیمتی نیست و بنابراین حتی در آزمایشگاه‌های معمولی نیز قابل انجام است. از طرف دیگر با توجه به این که متیلاسیون ژن-هایی که الگوی متفاوتی میان جنین و مادر دارند از هفته‌های اول حاملگی وجود دارد بنابراین می‌توان با استفاده از این روش پاسخ بسیار سریعی به والدین نگران ارائه کرد. این در حالیست که روش Digital PCR نیز نیازمند تهیه تجهیزات اولیه گران قیمت است که با در نظر گرفتن نیاز به انجام حدود ۸۰۰۰ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای هر نمونه در مقایسه با روش MeDIP- Real time qPCR به لحاظ اقتصادی خیلی به صرفه به نظر نمی‌رسد. با این وجود استفاده از روش MeDIP- Real time qPCR در غربالگری سندرم داون نیازمند انجام مطالعات در سطح وسیع‌تری است تا بتوان با اطمینان بیشتری از آن به جای روش Sequencing استفاده کرد. در هر حال هنوز استفاده از روش‌های غربالگری غیرتهاجمی با استفاده از خون مادر هنوز در مرحله‌ی کودکی است که نیازمند انجام مطالعات وسیع‌تری است تا جایگاه خود را در برنامه‌های روتین غربالگری پیش از تولد در آینده‌ای نه چندان دور بیابد.

منابع

Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW (2007) Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. Prenatal Diagnosis 27: 415-418 .

Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B (2000) Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. Clinical Chemistry 46: 301-302.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

Avent ND, Plummer ZE, Madgett TE, Maddocks DG, Soothill PW (2008) Post-genomics studies and their application to non-invasive prenatal diagnosis. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine 13: 91-98.
Babochkina T, Mergenthaler S, De Napoli G, Hristoskova S, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S (2005) Numerous erythroblasts in maternal blood are impervious to fluorescent in situ hybridization analysis, a feature related to a dense compact nucleus with apoptotic character. Haematologica 90: 740-745.
Bahado-Singh RO, Wapner R, Thom E, Zachary J, Platt L, Mahoney MJ, Johnson A, Silver RK, Pergament E, Filkins K, Hogge WA, Wilson RD, Jackson LG (2005) Elevated first-trimester nuchal translucency increases the risk of congenital heart defects. Amerian Journal of Obstetrics and Gynecology 192: 1357-1361.
Bianchi DW (1999) Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. British Journal of Haematology 105: 574-583.
Birch L, English CA, O'donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT (2005) Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. Clinical Chemistry 51: 312-320.
Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaides KH, Lo YM (2006) Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. Clinical Chemistry 52: 2211-2218.
Chen EZ, Chiu RW, Sun H, Akolekar R, Chan KC ,Leung TY, Jiang P, Zheng YW, Lun FM, Chan LY, Jin Y, Go AT, Lau ET, To WW, Leung WC, Tang RY, Au-Yeung SK, Lam H, Kung YY, Zhang X, Van Vugt JM, Minekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM (2011) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. PLoS One 6: e21791.
Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, Oudejans CB, Ding C, Lo YM (2005) Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 14753-14758.
Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC, Lun FM, Go AT, Lau ET, To WW, Leung WC, Tang RY, Au-Yeung SK, Lam H, Kung YY, Zhang X, Van Vugt JM, Minekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM (2011) Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. British Medical Journal 342: c7401.
Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM (2002) Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. Clinical Chemistry 48: 778-780.
Chiu RW, Lui WB, Cheung MC, Kumta N, Farina A, Banzola I, Grotti S, Rizzo N, Haines CJ, Lo YM (2006) Time profile of appearance and disappearance of circulating placenta-derived mRNA in maternal plasma. Clinical Chemistry 52: 313-316.
Daniels G, Finning K, Martin P (2010) Noninvasive fetal blood grouping: present and future. Clinics in Laboratory Medicine 30: 431-442.
Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood M, Bayliss P, Cronin M, Barry J, Betz J, Franz K, Gold K, Vallecillo B,Varney J (2007) A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. Lancet 369: 474-481.
Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, Lu V, Mccullough R, Mccarthy E, Nygren AO, Dean J, Tang L, Hutchison D, Lu T, Wang H, Angkachatchai V, Oeth P, Cantor CR, Bombard A,Van Den Boom D (2011) Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. America Journal of Obstetrics and Gynecology 204: 205 e201-211.
Elsayed GM, El Assiouty L, El Sobky ES (2013) The importance of rapid aneuploidy screening and prenatal diagnosis in the detection of numerical chromosomal abnormalities. Springerplus 2: 490.
Epstein CJ, Korenberg JR, Anneren G, Antonarakis SE, Ayme S, Courchesne E, Epstein LB, Fowler A, Groner Y, Huret JL, et al. (1991) Protocols to establish genotype-phenotype correlations in Down syndrome. American Journal of Human Genetics 49: 207-235.
Evans MI, Wright DA, Pergament E, Cuckle HS, Nicolaides KH (2012) Digital PCR for noninvasive detection of aneuploidy: power analysis equations for feasibility. Fetal Diagnosis and Therapy 31: 244-247.
Faas BH, De Ligt J, Janssen I, Eggink AJ, Wijnberger LD, Van Vugt JM, Vissers L, Geurts Van Kessel A (2012) Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. Expert Opinion on Biological Therapy 12: S19-S26.
Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR (2008) Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 105: 16266-16271.
Fan HC, Quake SR (2007) Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. Analitical Chemistry 79: 7576-7579.
Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G (2008) Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. British Medical Journal 336: 816-818.
Ghafouri-Fard S, Modarressi MH (2009) Cancer-testis antigens: potential targets for cancer immunotherapy. Archives of Iranian Medicine 12: 395-404.
Ghanta S, Mitchell ME, Ames M, Hidestrand M, Simpson P, Goetsch M, Thilly WG, Struble CA,Tomita-Mitchell A (2010) Non-invasive prenatal detection of trisomy 21

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

using tandem single nucleotide polymorphisms. PLoS One 5: e13184.
Gnys-Wiercioch A, Bloch R, Grolik B, Hadas J, Kania A, Szoltysik-Szot M, Sodowska H (2012) Chorionic Villus Sampling in cytogenetic analysis-disadvantages and advantages. Ginekologia Polska 83: 368-372.
Hall Sedlak R, Jerome KR (2014) The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics. Expert review of molecular diagnostics 14: 501-507.
Hua R, Barrett AN, Tan TZ, Huang Z, Mahyuddin AP, Ponnusamy S, Sandhu JS, Ho SS, Chan JK, Chong S, Quan S,Choolani M (2014) Detection of aneuploidy from single fetal nucleated red blood cells using whole genome sequencing. Prenatal Diagnosis 34:1-8.
Huang X, Zheng J, Chen M, Zhao Y, Zhang C, Liu L, Xie W, Shi S, Wei Y, Lei D, Xu C, Wu Q, Guo X, Shi X, Zhou Y, Liu Q, Gao Y, Jiang F, Zhang H, Su F, Ge H, Li X, Pan X, Chen S, Chen F, Fang Q, Jiang H, Lau TK,Wang W (2014) Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies. Prenatal Diagnosis 34: 335-340.
Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B (2003) Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. Reproduction 126: 279-297.
Jackson L (2003) Fetal cells and DNA in maternal blood. Prenatal Diagnosis 23: 837-846.
Jorge P M-F M, Santos R, Silva Ml, Soares G, Fortuna Am (2014) A 26-Year Experience in Chorionic Villus Sampling Prenatal Genetic Diagnosis. Journal of Clinical Medicine 3: 838-848.
Karami F, Noori-Daloii MR, Modarressi MH (2014) Introducing a new and simple protocol for capillary electrophoresis of cell free fetal double stranded DNA. Journal of sciences, Islamic Republic of Iran 25:305-308.
Lau TK, Chan MK, Lo PS, Chan HY, Chan WS, Koo TY, Ng HY, Pooh RK (2012) Clinical utility of noninvasive fetal trisomy (NIFTY) test--early experience. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 25: 1856-1859.
Lau TK, Chen F, Pan X, Pooh RK, Jiang F, Li Y, Jiang H, Li X, Chen S, Zhang X (2012) Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 25: 1370-1374.
Ledbetter DH, Zachary JM, Simpson JL, Golbus MS, Pergament E, Jackson L, Mahoney MJ, Desnick RJ, Schulman J, Copeland KL, Et Al (1992) Cytogenetic results from the US Collaborative Study on CVS. Prenatal Diagnosis 12: 317-345.
Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Galbiati S, Meaney C, Hulten MA, Crea F, Olsson ML, Maddocks DG, Huang D, Fisher SA, Sprenger-Haussels M, Soussan AA,Van Der Schoot CE (2007) Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. Prenatal Diagnosis 27: 824-829.
Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S (2005) Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. Journal of the American Medical Association 293: 843-849.
Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S (2004) Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. Clinical Chemistry 50: 1002-1011.
Liao C, Yin AH, Peng CF, FuF, Yang JX, LiR, Chen YY, Luo DH, Zhang YL, Ou YM, Li J, Wu J, Mai MQ, Hou R, Wu F, Luo H ,Li DZ, Liu HL, Zhang XZ, Zhang K (2014) Noninvasive prenatal diagnosis of common aneuploidies by semiconductor sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 111: 7415-7420.
Liao GJ, Chan KC, Jiang P, Sun H, Leung TY, Chiu RW, Lo YM (2012) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. PLoS One 7: e38154.
Liu F M, Wang XY, Feng X, Wang W, Ye YX,Chen H (2007) Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica 86: 535-541.
Lo YM (2008) Fetal nucleic acids in maternal plasma. Annals of the New York Academy of Sciences 1137: 140-143.
Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, Wainscoat JS (1996) Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. Blood 88: 4390-4395.
Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BC, Cantor CR, Chiu RW (2007) Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 104: 13116-13121.
Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM (1999) Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. American Journal of Human Genetics 64: 218-224.
Lun Fm CR, Allen Chan Kc, Yeung Leung T, Kin Lau T, Dennis Lo Ym. (2008) Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. Clinical Chemistry 54: 1664-1672.
Maron JL, Johnson KL, Slonim D, Lai CQ, Ramoni M, Alterovitz G, Jarrah Z, Yang Z, Bianchi DW (2007) Gene expression analysis in pregnant women and their infants identifies unique fetal biomarkers that circulate in maternal blood. Journal of Clinical Investigation 117: 3007-3019.
Michaelson-Cohen R, Gershoni-Baruch R, Sharoni R, Shochat M, Yaron Y, Singer A (2014) Israeli society of medical genetics NIPT committee opinion 072013: Non-invasive prenatal testing of Cell-Free DNA in maternal plasma for detection of fetal aneuploidy. Fetal Diagnosis and Therapy 36: 242-244.
Milunsky A, Wands J, Brambati B, Bonacchi I, Currie K (1988) First-trimester maternal serum alpha-fetoprotein screening for chromosome defects. American Journal of Obstetrics and Gynecology 159: 1209-1213.
Morris JK, Wald NJ, Watt HC (1999) Fetal loss in Down syndrome pregnancies. Prenatal Diagnosis 19: 142-145.
Ng EK, El-Sheikhah A, Chiu RW, Chan K C, Hogg M, Bindra R, Leung TN, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]

(2004) Evaluation of human chorionic gonadotropin beta-subunit mRNA concentrations in maternal serum in aneuploid pregnancies: a feasibility study. Clinical Chemistry 50: 1055-1057.

Ng EK, Tsui NB ,Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, Lit LC, Chan KW, Lo YM (2003) mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 100: 4748-4753.

Nicolaides KH, 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. Prenatal Diagnosis 33: 575-579.

Papageorgiou EA, Fiegler H, Rakyan V, Beck S, Hulten M, Lamnissou K, Carter NP, Patsalis PC (2009) Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. Americal Journal of Pathology 174: 1609-1618.

Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC (2011) Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. Nature Medicine 17: 510-513.

Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW (2000) Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. Human Genetics 106: 45-49.

Pezzolo A, Santi F, Pistoia V, De Biasio P (1997) Prenatal diagnosis of triploidy using fetal cells in the maternal circulation. Prenatal Diagnosis 17: 389.

Poon LL, Leung TN, Lau TK, Chow KC, Lo YM (2002) Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. Clinical Chemistry 48: 35-41.

Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM (2000) Presence of fetal RNA in maternal plasma. Clinical Chemistry 46: 1832-1834.

Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Okai T, Takabayashi H, Kita M, Yura H, Kitagawa M (2007) Development of noninvasive fetal DNA diagnosis from nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. Prenatal Diagnosis 27: 846-848.

Shulman LP, Elias S (1993) Amniocentesis and chorionic villus sampling. Western Journal of Medicine 159: 260-268.

Snijders RJ, Sebire NJ, Nayar R, Souka A, Nicolaides KH (1999) Increased nuchal translucency in trisomy 13 fetuses at 10-14 weeks of gestation. American Journal of Medical Genetics 86: 205-207.

Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A (2012) Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. American Journal of Obstetrics and Gynecology 206: 319 e311-319.

Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barrett W, Stokowski R, Mcbride C, Zahn J, Lee K, Shen N, Doshi J, Sun M, Garrison J, Sandler J, Hollemon D, Pattee P, Tomita-Mitchell A, Mitchell M, Stuelpnagel J, Song K, Oliphant A (2012) Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. Prenatal Diagnosis 32: 3-9.

Tong YK, Ding C, Chiu RW, Gerovassili A, Chim SS, Leung TY, Leung TN, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM (2006) Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. Clinical Chemistry 52: 2194-2202.

Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM (2011) Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. Blood 117: 3684-3691.

Tsui NB, Lo YM (2006) Placental RNA in maternal plasma: toward noninvasive fetal gene expression profiling. Annals of the New York Academy of Sciences 1075: 96-102.

Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M , Lam WL, Schubeler D (2005) Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. Nature Genetics 37: 853-862.

Weijerman ME, De Winter JP (2010) Clinical practice. The care of children with down syndrome. European Journal of Pediatrics 169: 1445-1452.

Willems PJ, Dierickx H, Vandenakker E, Bekedam D, Segers N, Deboulle K,Vereecken A (2014) The first 3,000 Non-Invasive Prenatal Tests (NIPT) with the Harmony test in Belgium and the Netherlands. Facts, views & visions in ObGyn 6: 7-12.

Wong BC, Chiu RW, Tsui NB, Chan KC, Chan LW, Lau TK, Leung TN, Lo YM (2005) Circulating placental RNA in maternal plasma is associated with a preponderance of 5' mRNA fragments: implications for noninvasive prenatal diagnosis and monitoring. Clinical Chemistry 51: 1786-1795.

Wright Cf BH (2009) The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. Human Reproduction Update 15: 139-151.

Yeang CH, Ma GC, Hsu HW, Lin YS, Chang SM, Cheng PJ, Chen CA, Ni YH, Chen M (2014) Genome-wide normalized score: a novel algorithm to detect fetal trisomy 21 during non-invasive prenatal testing. Ultrasound in Obstetrics and Gynecology 44: 25-30.

Zhu R, Zhu X, Yang Y, Duan H, Zhang Y, Wu X, Wang W, Li J (2014) Application of different technologies for distinguishing true and pseudo mosaicisms during prenatal diagnosis. Zhonghua yixue yichuanxue zazhi 31: 636-640.

Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, Ryan A, Sigurjonsson S, Chopra N, Dodd M, Levy B, Rabinowitz M (2012) Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. Prenatal Diagnosis 32: 1233-1241.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.1.9]