

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

Mitteinvasiivne sünnieelne loote DNA uuring – sünnieelse diagnostika tulevik
Bakalaureusetöö
12 EAP
Kaia Hirm

Juhendajad PhD Olga Žilina
PhD Ants Kurg

TARTU 2017

Infoleht

Mitteinvasiivne sünnieelne loote DNA uuring – sünnieelse diagnostika tulevik

Sünnieelset diagnostikat on aastaid kasutatud loote seisundi hindamiseks. Koos tehnika arenguga on muutunud ka sünnieelsed uuringud täpsemaks ja tundlikumaks. Viimase 20 aasta jooksul on välja arendatud uus sünnieelne sõeluuringu tehnoloogia, mitteinvasiivne loote DNA sünnieelne uuring, millel on suur potentsiaal tulevikus asendada teisi vähem tundlike meetodeid. Antud test on olnud laialdasemalt kasutusel vaid peaaegu viis aastat, kuid teise põlvkonna sekveneerimine on muutnud testi kiiremaks, odavamaks ja kättesaadavamaks rasedatele. Kuigi testil on veel mõningaid puuduseid, võib see tulevikus asendada praegused meetodid.

Märksõnad: NIPT, MPS, sünnieelne diagnostika, mitteinvasiivne sünnieelne testimine, teise põlvkonna sekveneerimine

CERCS: B220 Geneetika, tsütogeneetika

Non-invasive prenatal testing – the future of prenatal diagnostics

Prenatal diagnostics has been used for estimating fetal development for years. With technology development, prenatal techniques also become more sensitive and reliable. Within 20 years a new prenatal screening method referred as non-invasive prenatal testing has been developed. This test has great potential to replace less sensible prenatal screening methods used at the moment. The test has been on market for almost five years. The use of massively parallel sequencing has made NIPT faster, cheaper and more accessible to the pregnant women. Although the test has some drawbacks, it may be the only prenatal test in the future.

Keywords: NIPT, MPS, non-invasive prenatal testing, prenatal diagnostics, massively parallel sequencing

CERCS: B220 Genetics, cytogenetics

Sisukord

Infoleht	2
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
Kirjanduse ülevaade	7
1. Kaasasündinud haigused	7
1.1. Kromosoomanomaaliad	7
1.2. Monogeensed haigused	8
2. Kaasasündinud haiguste sõeluuring ja diagnostika	9
2.1. Mitteinvasiivsed meetodid	9
2.1.1. Ultraheliuuring	9
2.1.2. Vereseerumi skriining	10
2.1.3. Loote rakuvaba DNA analüüs raseda verest	10
2.2. Invasiivsed meetodid	11
2.2.1. Koorionibiopsia	11
2.2.2. Amniotsentees	11
2.2.3. Kordotsentees	12
2.2.4. Sünnieelsed diagnostilised uuringud	12
3. Mitteinvasiivne sünnieelne loote DNA testimine	13
3.1. Loote rakuvaba DNA	13
3.2. Loote rakuvaba DNA osakaalu määramise võimalused	14
3.3. Loote rakuvaba DNA osakaalu mõjutavad tegurid	15
3.4. Loote rakuvaba DNA kasutamine diagnostikas	16
3.4.1. Soo määramine	17
3.4.2. Aneuploidiate detekteerimine	17
3.4.3. Monogeensed haigused	18
3.5. Loote rakuvaba DNA sekveneerimine	19
3.5.1. Ülegenoomne sekveneerimine	21

3.5.2. Suunatud sekveneerimine	22
3.6. Valenegatiivsed ja valepositiivsed tulemused NIPT analüüsil	23
3.7. Kommertsiaalsed NIPT testid	23
4. Arutelu	26
Kokkuvõte	30
Summary.....	31
Kirjanduse loetelu.....	32
Kasutatud veebiaadressid	42

Kasutatud lühendid

AFP	α -fetoproteiin
AG	tühja lootemunaga rasedus (<i>anembryonic gestation</i>)
cfDNA	rakuvaba DNA (<i>cell-free DNA</i>)
cffDNA	looterakuvaba DNA (<i>cell-free fetal DNA</i>)
CMA	submikroskoopiline kromosoomanalüüs (<i>chromosomal microarray analysis</i>)
FISH	<i>fluorecence in situ hybridization</i>
hCG	inimese koorioni-gonadotropiin
MPS	teise põlvkonna sekveneerimine (<i>massively parallel sequencing</i>)
NIPT	mitteinvasiivne sünnieelne loote DNA testimine (<i>non-invasive prenatal testing</i>)
NT	loote kuklavoldi läbikumavus (<i>nuchal translucency</i>)
PAPP-A	rasedusega seotud plasma proteiin
RCD	<i>digital relative chromosome dosage</i>
RhD	Rh veregrupi, D antigeen
uE3	konjugeerimata östriool
UH	ultraheli
Vaba β -hCG	vaba beeta-koorioni-gonadotropiin

Sissejuhatus

Sünnieelse uuringu eesmärgiks on hinnata ema ja veel sündimata lapse haigusriske. Kromosoomanomaaliade leidmise puhul on võimalik rasedus katkestada või hakata tegema ettevalmistusi lapse sünniks tema vajadusi arvestades. Kaasasündinud haigusega laps võib vajada ka sünni järgselt meditsiinilist abi. Samuti tuleb arvestada, et umbes 50%-l juhtudest raseduse katkemise põhjuseks on aneuploidia.

Eestis tehakse sünnieelseid uuringuid peamiselt raseduse I ja II trimestril, kuid vajadusel ka III trimestril. Kõige tavapärasemad uuringud on I ja II trimestri kombineeritud sõeluuringud, millega hinnatakse eelkõige kromosoomanomaaliade esinemise riski. Peale riski hindamist võidakse teostada ka invasiivne protseduur anomaalia kinnitamiseks või ümber lükkamiseks, kuid iga invasiivse protseduuriga kaasneb ka risk raseduse katkemiseks. Invasiivsete protseduuride vähendamiseks on oluline leida täpsemaid sõeluuringu meetodeid. Viimastel aastatel on sünnieelse diagnostika valdkonnas toimunud suur läbimurre mitteinvasiivse sünnieelse testimise (*non-invasive prenatal testing*, NIPT) näol, mis põhineb ema verest eraldatud loote rakuvaba DNA uurimisel. Võrreldes teiste tänapäeval kasutusel olevate sõeluuringu meetoditega annab NIPT kromosomaalsete anomaaliade kohta täpsemad tulemused, kuid vajab sarnaselt teistele meetoditele positiivse tulemuse kinnitamiseks invasiivset protseduuri. Tänapäevased testid põhinevad teise põlvkonna sekveneerimisel ning võimaldavad tuvastada muutusi nii kromosoomide arvus kui ka struktuuris ning samuti monogeenseid haiguseid.

Käesoleva töö eesmärgiks on anda ülevaade NIPT testist, ning välja tuua loote rakuvaba DNA kasutamise võimalused kaasasündinud haiguste tuvastamiseks.

Kirjanduse ülevaade

1. Kaasasündinud haigused

Iga raseduse korral on võimalik, et sündival lapsel esineb mõni pärilik haigus. Nende põhjuseks võivad olla muutused geenides või kromosoomides (Heinaru, 2012). Viimaseid põhjustavad rakutsüklis toimunud vead ning kromosoomide segregatsioonil toimunud muutused, mille tagajärjel võib tekkida olukord, kus rakus on ebanormaalne arv kromosooime. Kaasasündinud haiguste puhul on olulised muutused, mis on toimunud meiosis (Potapova and Gorbsky, 2017).

1.1. Kromosoomanomaaliad

Kromosoomanomaalia on rakutuumas oleva geneetilise materjali ebaregulaarsus, mille alla kuuluvad kromosoomide puudumine või liigsus e. aneuploidia, samuti ka kromosoomi struktuursed muutused, nagu deletsioonid, duplikatsioonid, inversioonid ja translokatsioonid (Heinaru, 2012).

Suuremate kromosoomide aneuploidiad on eluga kokku sobimatud ning põhjustavad raseduse katkemist. Näiteks, inimese kõige suurema 1. kromosoomi trisoomia on väga haruldaselt detekteeritav, kuna ta põhjustab sügooti hukkumise juba preimplantatsiooni järgus ega põhjusta kliiniliselt diagnoositud raseduse katkemist (Dunn et al., 2001). Kõige sagedasem lootel esinevatest aneuploidiatest on 16. kromosoomi trisoomia, mis on ka enim raseduse katkemisi põhjustav trisoomia (Benn, 1998). Elusana sündivatel vastsündinutel esinevad kõige sagedamini väiksemate autosoomide (kromosoom 21, 18 ja 13) ja sugukromosoomide aneuploidiad, millest kõige sagedasemad on 21. kromosoomi trisoomia e. Downi sündroom, X kromosoomi trisoomia ja X kromosoomi monosoomia e. Turneri sündroom (Heinaru, 2012).

Struktuursete muutuste korral sõltub kromosomaalse muutuse tagajärg sellest, kus kohas genomis on muutus aset leidnud ning milliseid geene ta haarab. Näitena võib tuua Williamsi sündroomi ja *cri-du-chat* sündroomi, mille puhul on tegemist vastavalt 7. kromosoomis või 5. kromosoomis toimunud deletsiooniga, mis põhjustab kliiniliselt äratuntava pildiga seisundit (Heinaru, 2012; Shaffer and Lupski, 2000).

Kromosoomanomaaliade tekkepõhjuseks peetakse rakkude jagunemisel tekkinud vigu. Kromosoomide ja kromatiidide mittelahknemine meiosis võib viljastumise korral põhjustada kromosoomanomaaliaga sügooti tekkimist. Samuti meiosis tütarchromatiidide vahel toimuva ristsiirde käigus võib ristsiirde äärealadel geneetilist materjali kaduma minna või duplitseerida, mis võib viia kaasasündinud haiguse tekkeni (Celep et al., 2006a). Sugurakke võivad mõjutada ka mitmed mutageenid, näiteks alkohol, röntgenkiirgus jms, ning vanemate vanusest tingitud

sugurakkudes toimunud muutused (Kuliev et al., 2011). Downi sündroomiga sündivate laste tõenäosus kasvab ema vanuse kasvades: naistel, kes on alla 25 aasta vanad, on see tõenäosus 1:1500, aga kui naise vanus on üle 40 aasta, siis tõenäosus on 1:100 (Heinaru, 2012).

Reeglina ei arene kromosoomanomaaliaga looted normaalselt, ning 50% spontaansete abortide põhjuseks on kromosoomanomaalia. Mõnikord on selliseid rasedusi raske kindlaks teha, kuna need võivad katkeda väga varases staadiumis, isegi varem kui naine oma rasedusest teadlikuks saab (Celep et al., 2006b).

Kuigi kromosoomanomaaliad on diagnoositavad, ei leidu neile täielikku ravi (<http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/component/content/article/31>).

1.2. Monogeensed haigused

Monogeensed haigused tekivad ühes geenis toimunud mutatsioonide tulemusel. Võrreldes teiste pärilike haigustega on need võrdlemisi haruldased (Heinaru, 2012). Tänapäeval on OMIM andmebaasi andmetel kirjeldatud 5060 monogeenset haigust (www.omim.org, 18.august 2017).

Monogeenseid haiguseid liigitatakse tunnuse avaldumise järgi autosoomdominantseteks, autosoomretsessiivseteks, X- ja Y-liitelisteks. Autosoomdominantsete haiguste (nt. Huntingtoni tõbi) avaldumiseks piisab ühest muteerunud geenikoopiast. Autosoomretsessiivsete haiguste (nt. tsüstiline fibroos) puhul peab mutatsioon esinema mõlemas geenikoopias. X-kromosoomis toimunud mutatsioonide avaldumine võib erineda nii naistel kui ka meestel. Näiteks hemofiilia on X liiteline retsessiivne haigus mis mutatsiooni olemasolul avaldub meesoost inimesel kindlasti, kuid naistel haiguse avaldumiseks peab antud mutatsioon olema mõlemas X kromosoomis. Y-liitelised haigused on harvad ning põhjustavad üldiselt viljatust (Heinaru, 2012).

2. Kaasasündinud haiguste sõeluuring ja diagnostika

Enamasti saab naine rasedusest teada koduse rasedustesti abil. Pärast seda toimub esimene visiit naistearsti või ämmaemanda juurde. Selleks, et kõiki uuringuid ja analüüse saaks teostada õigeaegselt on oluline, et esmane visiit toimuks enne 12. rasedusnädalat (<http://www.kliinikum.ee/naistekliinik/naistenouandla/rasedusaegsed-uuringud/79-raseduse-jaelgmine-naedalate-kaupa>).

Rasedusaegsed sõeluuringud ja kromosoomuuringud annavad informatsiooni raseduse kulgemise kohta. Loote kaasasündinud haigused on tulevasele emale nii emotsionaalselt kui ka majanduslikult rasked ning isegi kui naine otsustab kaasasündinud haigusega lapse sünnitada, saab ta tulevase lapse sünniks ette valmistada tema haigusega arvestades (Ustav et al., 2016).

Kaasasündinud haiguste riski hindamiseks viiakse läbi sõeluuringud ning haiguse kahtluse korral võib seda kinnitada või välistada uurides loote geneetilist materjali. Loote materjali saadakse invasiivse protseduuri käigus, milleks on koorinibiopsia, amniotsentees või kordotsentees (Ustav et al., 2016).

Eestis on invasiivne sünnieelne diagnostika kasutusel 1990. aastast ning see võimaldas vähendada kromosoomhaigusega laste sündi. Sünnieelseid sõeluuringuid hakati pakkuma 1995. aastast rasedatele naistele, selleks et selgitada välja just need rasedad, kellele oleks täiendavalt vaja teha ka invasiivne protseduur haiguse kinnitamiseks või ümberlükkamiseks. Tänapäeval on sõeluuringud Eestis laialdaselt kasutusel – sõeluuringu hõlmatus on kuni 99% (Sitska, 2012). Kuna invasiivsete protseduuridega kaasneb oht raseduse katkemisele ja tüsistustele ning kuna tänapäeval kasutatavate sõeluuringute täpsus ei ole piisavalt kõrge, otsitakse uusi sõeluuringute meetodeid invasiivsete protseduuride arvu vähendamiseks (Ustav et al., 2016).

2.1. Mitteinvasiivsed meetodid

Mitteinvasiivsed meetodid ehk sõeluuringud on vabatahtlikud, kuid kättesaadavad kõikidele rasedatele. Nende eesmärgiks on hinnata suurenenud riski kromosoomhaigusele või arenguhäirele. Hinnang antakse kolme kõige sagedamini esineva trisoomia suhtes (21., 18. ja 13 kromosoomi trisoomia) (Ustav et al., 2016). Testi tulemus on tõenäosuslik ja positiivne tulemus ei tähenda, et veel sündimata laps oleks haige. Haiguse kinnitamiseks võidakse raseda soovil teha invasiivne uuring, mis annab loote kohta täpsema tulemuse (<http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/suennieelne-diagnostika/12-rasedatesoeluuringud>).

2.1.1. Ultraheliuuring

Ultraheliuuringut (UH) on võimalik teha kõigil raseduse trimestritel, tuvastamaks loote arenguhäireid (Ustav et al., 2016).

Kromosoomanomaaliate seisukohalt on kõige tähtsam 12.–13. rasedusnädalal tehtav loote kuklavoldi läbikumavuse mõõtmine (*nuchal translucency*, NT). Kuklavolt on loote kuklapiirkonnas oleva vedelikukogum, mis on Downi sündroomi puhul normist suurem (<http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/suennieelne-diagnostika/14-iitrimestriskoeluring>). NT mõõtmine on üks vanemaid sünnieelse diagnostika meetodeid. 1992. aastal uuriti 827 rasedat naist, kes läbisid ka invasiivse uuringu, ning leiti, et NT läbimõõt üle 3 mm tõstab riski kromosoomanomaalia esinemiseks (Nicolaides et al., 1992). Samuti võib suurt NT läbimõõtu seostada ka südame defektide ja paljude muude väärarengutega (Nicolaides, 2011).

2.1.2. Vereseerumi skriining

Vereseerumi skriiningut on võimalik teha nii raseduse esimesel kui ka teisel trimestril. Eestis määratakse esimesel trimestril, 9.–11. rasedusnädalal, kahte biomarkerit: rasedusega seotud plasma proteiini (PAPP-A) ja vaba beeta-koorioni-gonadotropiini (vaba β -hCG). Teisel rasedustrimestril, 14.–18. rasedusnädalal, määratakse aga kolme biomarkerit: α -fetoproteiini (AFP), inimese koorion-gonadotropiini (hCG) ja konjugeerimata östriooli (uE3) (<http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/suennieelne-diagnostika/14-iitrimestriskoeluring>).

Mõlemal trimestril tehtavat uuringut on võimalik teha kombineeritult UH uuringuga, mis tõstab nende avastamismäära kuni 79-93% ning vähendab valepositiivsete määra kuni 3% (Baer et al., 2015; Benn et al., 2011). Alates 01.03.2016 on Eestis sünnieelse sõeluuringu standardprotokolliks I trimestri kombineeritud sõeluuring. See tähendab I trimestri raseda seerumis määratavad markerid koos UH-uuringul määratavate markeritega kalkuleeritakse ühtseks riskihinnanguks ja naine saab vastuse raseduse 11.-13⁺⁶ rasedusnädalal UH-spetsialisti juures (Ustav et al., 2016).

2.1.3. Loote rakuvaba DNA analüüs raseda verest

Loote rakuvaba DNA analüüs ehk mitteinvasiivne sünnieelne loote DNA uuring (*non-invasive prenatal testing*, NIPT) on uus suund prenataalses meditsiinis. Tegemist on testiga, kus uuritakse raseda veres leiduvaid fragmente loote rakuvabast DNA-st (*cell-free fetal DNA*, cffDNA). Algselt analüüsiti selliseid gene, mille järjestused emal puuduvad: Y-spetsiifilised geenid loote soo määramiseks, *RhD* geen loote reesusstaatuse määramiseks reesusnegatiivsel emal. Hiljem on hakatud otsima võimalusi kasutada cffDNA analüüsi ka loote kromosoomanomaaliate avastamiseks. NIPT testist räägin põhjalikumalt peatükis „Mitteinvasiivne sünnieelne loote DNA testimine“.

2.2. Invasiivsed meetodid

Kui sõeluuringute eesmärgiks on välja selgitada riskirühm kõigi rasedate hulgast, kellel on suurem oht sünnitada päriliku haiguse või kaasasündinud väärarenguga laps, siis sünnieelne diagnostika on võimalik ainult invasiivse protseduuri teel. Loote geneetilist materjali on võimalik saada amniotsenteesi, koorionibiopsia või kordotsentees abil. Invasiivseid protseduure soovitatakse rasedale kõrgenenud kaasasündinud haiguse riski puhul. Invasiivset uuringut pakutakse umbes 5% rasedatele (Simonazzi et al., 2010). Meetodi valik sõltub patsiendi eelistustest ja raseduse kestvusest (Ustav et al., 2016).

Riskid vanemale on väga väiksed ja haruldased, riskid lootele on aga suuremad. Raseduse katkemine on üks suuremaid riske invasiivsete uuringute teostamisel, 0,5 – 1% protseduuri läbinud rasedustest katkeb (Tabor and Alfirevic, 2010). Raseduse katkemise risk on suurem, kui lootel esineb arenguhäire. Samuti on täheldatud, et I trimestril tehtava protseduuri järel on raseduse katkemiste arv suurem kui II trimestril tehtava protseduuri puhul (Group, 1998).

2.2.1. Koorionibiopsia

Koorionibiopsia on esimesel trimestril, tavaliselt 11.–14. rasedusnädalal, tehtav invasiivne protseduur, kus võetakse tükikesi koorionist ehk arenevast platsentast ultraheli kontrolli all. Platsenta mosaiiksust saadud materjal is leitakse 1%-l juhtudest. Mosaiiksuse esinemisel tehakse täiendav uuring amniotsenteesi abil. Samuti võib materjal is leiduda vähesel määral ema rakke (Jenkins and Wapner, 1999).

Loote jäsemete defekti tekke riski tõttu ei tehta koorionibiopsiat enne 10. rasedusnädalat. Raseduse hilisemas järgus aga võivad platsenta hatud osutada liiga jämedaks, et sealt materjali kätte saada (Tabor and Alfirevic, 2010). Peale biopsiat võib esineda vaginaalset veritsust ja lootevedeliku lekkeid, kuid ei ole täheldatud nende halba mõju rasedusele (Alfirevic et al., 2003).

2.2.2. Amniotsentees

Amniotsentees on lootevee proovi võtmine diagnostika eesmärgil ultraheli kontrolli all. Parim aeg selleks on teisel trimestril, 15.–19. rasedusnädalal (Ustav et al., 2016). Tehes amniotsenteesi enne 15. rasedusnädalat on risk raseduse katkemiseks ja kompjalgsuse tekkeks suurem (Tabor and Alfirevic, 2010). Peale 24. rasedusnädalat tehtud amniotsenteesi puhul oli suurem risk, et rakukultuur ei kasva (O'Donoghue et al., 2007). Peale uuringut võib esineda lootevee eritust (Alfirevic et al., 2003). Raseduse katkemise risk amniotsenteesi puhul on 1% (Simonazzi et al., 2010).

2.2.3. Kordotsentees

Kordotsenteesi ehk loote vere uuringu puhul võetakse ultraheli kontrolli all nabaveenist verd (Bang et al., 1982). Peamiselt viiakse uuringut läbi loote aneemia kahtluse puhul (Berry et al., 2013). Samuti võidakse selle meetodiga edasi uurida kromosomaalset mosaiiksust (Ustav et al., 2016).

Riskid lootele sõltuvad loote seisundist. Kõige enamlevinud probleemid on: veritsus verevõtu kohast ja ebanormaalne loote südamelöökide sagedus (Han and Nava-Ocampo, 2005). Samuti on risk raseduse katkemisele (Sarno and Wilson, 2008).

2.2.4. Sünnieelsed diagnostilised uuringud

Invasiivsetest protseduuridest saadud materjali uurimiseks kasutakse erinevaid meetodeid. Üheks võimaluseks on uurida klassikalise kromosoomanalüüsi abil suuremaid struktuurseid (>5 Mb) ja arvulisi muutuseid valgusmikroskoobis (Ustav et al., 2016). Mikroskoopiat kasutab ka FISH (*fluorescence in situ hybridization*), millega on võimalik fluorestsents märgise abil uurida kindlat kromosoomi piirkonda. Sellega on võimalik diagnoosida 13., 18., 21., X ja Y kromosoomi arvu anomaaliaid ning ka deletsioone ja duplikatsioone, kui on kahtlus kindlale sündroomile (Evans et al., 1999). Neede meetodite abil on võimalik tuvastada ainult suuremaid muutusi kromosoomides.

Lisaks eelnevatele meetoditele on võimalik teostada ka submikroskoopilise kromosoomanalüüsi (*chromosomal microarray analysis*, CMA). CMA lahutusvõime on palju suurem ning selle abil on võimalik tuvastada väiksemaid DNA koopiaarvu muutusi (kuni 50 kb). Uuring on kiibipõhine ning ühe katse käigus uuritakse tervet genoomi. Kuigi on olemas ka suunatud kiibid, mille puhul on kiibil ainult huvipakkuva kromosoomi- või regiooni-spetsiifilised proovid. CMA meetodil on ka ajaline eelis, sest uuritavaks materjaliks on DNA, seega ei vaja CMA rakkude kultiveerimist, ning lisaks paljud etapid on võimalik automatiseerida (Bianchi, 2012).

Monogeensete haiguste kahtluse puhul on võimalik invasiivsetel protseduuridel saadud materjal amplifitseerida PCR-i abil ning seejärel analüüsida seda sekveneerimise teel. See meetod aga eeldab eelnevaid teadmisi antud haiguse põhjuse kohta (Eason, 2010).

3. Mitteinvasiivne sünnieelne loote DNA testimine

3.1. Loote rakuvaba DNA

Loote rakke tuvastati ema organismis juba 1893. aastal (McEwan, 2005), kuid need olid haruldased ning nende vähesuse tõttu ei saanud neid kasutada loote sünnieelseks testimiseks (Herzenberg et al., 1979). Aastaid hiljem kirjeldasid Mandel ja Metais vabu nukleiinhappeid veres (Mandel and Metais, 1948).

Suurem osa veres leiduvast rakuvaba DNast (*cell-free DNA*, cfDNA) pärineb ilmselt nekrootilistest tuumaga vererakkudest (van der Vaart and Pretorius, 2007). cfDNA kasutamine on üks kiiremini arenev suund kaasaegses meditsiinis ning sellel on suur potentsiaal leida endale kasutust onkoloogia, sünnieelse testimise, kardiovaskulaarsete haiguste ja transplantatsiooni valdkonnas (Gravina et al., 2016).

Loote rakuvaba DNA (*cell-free fetal DNA*, cffDNA) tuvastati ema veres esmakordselt 1997. aastal, kui näidati, et meessoost looteid kandvate naiste verest võib leida Y-kromosoomi spetsiifilisi järjestusi (Lo et al., 1997). Analüüsiti 43 raseda naise verd, nendest 30 kandsid meessoost loodet, millest omakorda 24 korral leiti ema vereplasmast Y-spetsiifilise geeni (*DYS14*) olemasolu. Kuna uuriti nii vereplasmat kui ka seerumit siis nähti, et vereplasma on parem cffDNA allikas kui seerum (Lo et al., 1997). Aasta hiljem näitas Lo et al., et meessoost loote *SRY* järjestust on võimalik leida juba 7. rasedusnädalast, ning selle kogus vereplasmas kasvab raseduse edasi arenedes. Näidati, et raseduse esimesel ja teisel trimestril oli cffDNA keskmine kontsentratsioon 25,4 genoomi ekvivalenti/ml ja kolmandal trimestril oli see 292,2 genoomi ekvivalenti/ml, mis moodustasid omakorda kogu plasma cfDNA-st vastavalt 3,4% ja 6,2%. See andis eeldused, et cffDNA analüüsist võiks saada esimese trimestri uuring (Lo et al., 1998). Hiljem näidati, et cffDNA osakaal jäi varasemates töödes allahinnatuks ning tegelikult moodustab cffDNA 3 kuni 20% kogu rakuvaba DNA-st (Ashoor et al., 2013).

Uurides cffDNA-d, tekkis ka küsimus, kui kaua püsib ta ema vereplasmas. Oma töös näitasid Lo et al., et päev pärast sünnitust, enamus juhtudel aga 2 tundi peale sünnitust, ei ole cffDNA enam ema verest leitav. Selleks uuriti *SRY* geeni olemasolu ema veres peale sünnitust ning näidati, et keskmine loote rakuvaba DNA lagunemiskiirus on 2.24×10^4 koopiat/minutis ja poolestusaeg 16,3 minutit (Lo et al., 1999c).

2004. aastal leiti, et emalt pärit cfDNA fragmendid on pikemad kui cffDNA fragmendid. Suuruse kindlaksmääramiseks kasutati leptiini ja *SRY* geene, mida analüüsiti kvantitatiivse PCR-i abil. Nähti, et loote DNA fragmendid ei ole suuremad kui 313bp, samas kui 32% ema DNA fragmentidest olid suuremad kui 392bp (Chan et al., 2004). Li et al. jõudsid samale järeldusele näidates, et ülekaalukalt jäid cffDNA fragmendid vereplasmas alla 300bp, kuid ema

päritolu cfDNA fragmendid olid oluliselt suuremad. Emapoolse cfDNA fragmentide piik tekib 166 bp juurde, samas kui loote päritoluga cfDNA-l on 143 bp juures (Lo et al., 2010). Selline teadmine annab võimaluse eraldada suuruse järgi loote DNA fragmente kogu vereplasma cfDNA-st (Li et al., 2004).

Esialgu arvati, et cffDNA pärineb loote hematopoeetilistest rakkudest (Bianchi, 2004). Kuid arvestades seda, et loote vererakke on väga raske ema veres leida, on see ebatõenäoline. Samuti on näidatud, et cffDNA on ema vereplasmas detekteeritav juba alates 5. rasedusnädalast, enne kui loote ja platsenta vereringe on tekkinud. Lisaks sellele, uurisid Alberry et al. tühja lootemunaga rasedusi (*anembryonic gestation*, AG) ning suutsid tuvastada kõik AG rasedused mille puhul oli koorionibiopsia näidanud meessugu, määrates ema vereplasmast *DYS14* markerit. Kuna nii kontrollgrupis kui ka AG raseduse puhul jäi cffDNA osakaal enamvähem võrdseks, võib arvata, et uuring oli tõene ning tulemused viitavad, et cffDNA pärineb trofoblastist (Alberry et al., 2007).

3.2. Loote rakuvaba DNA osakaalu määramise võimalused

Selleks, et cffDNA-d uurides saaks teha õigeid järeldusi, peab minimaalne loote DNA kogus vereplasmas olema vähemalt 4% kogu cfDNA-st (Canick et al., 2012; Wang et al., 2013). On leitud, et osa aneuploidiatest jääb märkamata (valenegatiivne tulemus) kui cffDNA osakaal on liiga madal, mis näitab cffDNA osakaalu määramise olulisust. Praeguseks on kirjeldatud mitmeid erinevaid meetodeid cffDNA osakaalu määramiseks.

Kõige esimesena kirjeldati Y kromosoomi spetsiifiliste järjestuste kasutamist sellel eesmärgil. Kõige sagedamini kasutatakse loote DNA molekulide identifitseerimiseks vereplasmast PCR-i abil *SRY*, *DYS14* ja *ZFY* geenide järjestusi (Canick et al., 2012; Lo et al., 1998; Lun et al., 2008). Selline lähenemine on võimalik ainult meessoost loodete puhul (Wataganara et al., 2004).

Teine lähenemine põhineb teadmisel, et ema ja loote cfDNA fragmendid on erineva pikkusega, mis võimaldab neid omavahel eristada. Yu et al. näitasid, et aneuploidiate, täpsemalt 21., 13. ja 18. kromosoomi trisoomiate, puhul tõuseb lühemate fragmentide osakaal vereplasmas võrreldes normaalse rasedusega. Sellel meetodil on kõrge tundlikus ja spetsiifilisus, vastavalt 100% ja 95,2% (Yu et al., 2014). Sellele sai ka statistilisel modelleerimisel põhinev edasiarendus nimega SeqFF, mis võimaldab määrata cffDNA osakaalu otse rutiinsetest NIPT sekveneerimisandmetest (Kim et al., 2015).

Kolmas võimalus põhineb loote ja ema cfDNA epigeneetilise mustri erinevusel. Teatud alad kromosoomidel, nagu *RASSF1A* promootor 3. kromosoomil, on hüpermetüleeritud loote DNA-s, samas kui ema DNA-s on see ala hüpometüleeritud. Selleks, et kätte saada cffDNA,

lõigatakse ema hüpometüleeritud cfDNA-d metülatsioon-tundlike restriktasidena, mille tulemusena jääb loote cfDNA puutumata (Chan et al., 2006). Sama meetodit kasutasid ka Nygren et al., et mõõta cffDNA osakaalu vereplasmas. Nad mõõtsid kogu vereplasmas oleva cfDNA (nii ema kui ka loote oma) kogust ning loote cfDNA kogust peale metülatsioon-tundliku restiktsiooniensüümiga lõikamist. Selline analüüsimeetod andis sama tulemuse Y-kromosoomil põhineva analüüsi meetodiga (Nygren et al., 2010). Lisaks on vereplasma DNA metülatsiooni uurimiseks kasutatud kogu genoomi bisulfit sekveneerimist (*bisulfite sequencing*). Kuna igale koele on iseloomulik oma metülatsiooni muster, on võimalik ka cffDNA-d eristada metülatsioonimustri järgi (Lun et al., 2013).

Vanemate genotüübiinfo kasutamine võimaldab eristada loote-spetsiifilisi allele ema vereplasmas. Selleks kasutatakse lookuseid, mille suhtes on loote ema ja isa homosügootid kuid erinevate genotüüpidega (nt. ühel vanemal on A/A ja teisel C/C), mille tulemusena on loote heterosügootne. Loote DNA osakaal saadakse kui loote-spetsiifiliste alleelide suhe kõikidesse alleelidesse vereplasma DNA-s. Selle meetodi puhul peab teadma nii ema kui ka isa genotüüpe, mis mõningal juhul võib takistada meetodi kasutamist (Bellis et al., 2005; Lo et al., 2010). Lisaks on aga välja töötatud FetalQuant ja FetalQuant^{SD} meetodid, mis võimaldavad vältida isapoolse genotüübi vajalikkust. Nende puuduseks on aga see, et on vajalik väga suure sügavusega sekveneerimine, mis tõstab oluliselt NIPT hinda (Jiang et al., 2012).

Meetodid määramaks loote rakuvaba DNA osakaalu on viimaste aastatega palju edasi arenenud ning muutunud täpsemaks, ning erinevates olukordades saab kasutada erinevaid meetodeid määramaks loote rakuvaba DNA osakaalu (Peng and Jiang, 2017). Samuti on leitud seoseid cffDNA osakaalu ja erinevate haiguste vahel, mida käsitlet järgmises peatükis.

3.3. Loote rakuvaba DNA osakaalu mõjutavad tegurid

Loote cfDNA osakaalu mõjutavad mitmed erinevad tegurid. Normaalsele rasedusele on iseloomulik cffDNA kontsentratsiooni tõus raseduse käigus (Lo et al., 1998). Kui 10. rasedusnädalal on keskmiselt 10,2% cfDNA-d ema veres loote oma, siis raseduse lõpuks võib cffDNA osakaal kasvada kuni 40%-ni. Loote cfDNA hulk kasvab 10.–21. rasedusnädala jooksul 0,10% nädalas, peale 21. rasedusnädalat aga 1% nädalas (Wang et al., 2013).

Näidati, et kõige rohkem mõjutab cffDNA osakaalu raseda kaal, kusjuures need on omavahel pöördseoses. Väga kõrge kaalu korral on suurem tõenäosus, et cffDNA osakaal on madalam kui 4%, mis on kriitiline NIPT testimisel. Kuni 90 kg kaaluvate rasedate naiste hulgas oli cffDNA osakaal > 4% enam kui 98% naistel, samas kui üle 140 kg kaaluvate naiste hulgas oli cffDNA osakaal > 4% ainult 71%-l rasedatest (Wang et al., 2013). Huvitaval kombel on

suitsetavatel rasedatel täheldatud suuremat cffDNA osakaalu. Lisaks, on leitud seos cffDNA osakaalu ning ema seerumi vaba β -hCG ja PAPP-A taseme vahel (Ashoor et al., 2013).

On näidatud, et ebanormaalsed cffDNA kontsentratsiooni tõusud ja langused võivad viidata raseduse tüsistustele või loote probleemidele. Nii on olemas seos loote cfDNA hulga suurenemise ja aneuploidse loote vahel (Bianchi et al., 1997). Lo et al. näitasid, et rasedatel, kus oli tegemist loote 21. kromosoomi trisoomiaga, oli cffDNA proportsioon 2 kuni 3 korda kõrgem (Lo et al., 1999a). Samuti on nähtud, et enneaegse sünnituse eel tõuseb cffDNA kontsentratsioon veres kõrgemale kui normaalse raseduse puhul (Leung et al., 1998). Näiteks Dugoff et al. näitasid, et 14.–20. rasedusnädalal võetud vereplasma proovis cffDNA suurenenud hulk on seotud enneaegse sünnitusega (Dugoff et al., 2016).

Preeklampsiat põdevatel naistel on cffDNA kogus veres 5 korda kõrgem kui tavalisel rasedal. Uuringus, kus analüüsiti 20. preeklampsiat põdevat naist ja 20 kontrollrasedat, leiti, et keskmine loote cfDNA kogus vereplasmas preeklampsiat põdeval rasedal oli 381 genoomi ekvivalenti/ml ja kontrollrasedal 76 genoomi ekvivalenti/ml (Lo et al., 1999b). Levine et al. nägid, et juba 3 nädalat enne preeklampsia sümptomite teket hakkab cffDNA kontsentratsioon tõusma (Levine et al., 2004).

Varatoksikoosi (*hyperemesis gravidarumit*) põdevate rasedate cffDNA kogus vereplasmas on ligikaudu kolm korda suurem kontrollgrupi omast (Sugito et al., 2003). Samuti võib cffDNA kontsentratsioon tõusta loote üsasisesse kasvupeetuse ja platsenta eesetsuse puhul (Sifakis et al., 2015). Normaalsest väiksem cffDNA osakaal võib aga viidata väiksemale lootele (Peng and Jiang, 2017).

Kokkuvõtteks on cffDNA tõusud ja langused head indikaatorid loote seisundi hindamiseks.

3.4. Loote rakuvaba DNA kasutamine diagnostikas

Juba alates avastamisest on arvatud, et cffDNA võiks saada heaks diagnostika markeriks, uurimaks loote kaasasündinud haigusi loodet kahjustamata (Lo et al., 1997). Alates 2011. aastast on cffDNA-d hakatud laialdasemalt kasutama ning tänaseks on välja töötatud mitmete firmade poolt vastavad testid, millega on võimalik määrata ära peamisi aneuploidiaid ja ka loote sugu. Samuti liigutakse ka monogeensete haiguste määramise suunas (Agarwal et al., 2013).

Selleks, et cffDNA-d saaks kasutada diagnostikaks on vaja see eraldada verest. Kõigepealt eraldatakse tsentrifuugimise teel vereplasma rakulistest komponentidest. Peale seda aga puhastatakse välja cfDNA, mida analüüsitakse edasi (Mazloom et al., 2013). Rakuvaba DNA eraldamiseks vereplasmast kasutatakse erinevate firmade poolt pakutavaid

kommertsiaalseid komplekte, millest kõige populaarsem ja parimaid tulemusi produtseeriv on Qiagen QIAamp® Circulating Nucleic Acid kit (Repiska et al., 2013). Tulemuseks saadakse ema ja loote DNA fragmentide segu. Lõpptulemust võib mõjutada proovide võtmise viis ja säilitamise tingimused (Chan et al., 2005).

3.4.1. Soo määramine

Juba 1997 suutsid Lo et al. tuvastada Y kromosoomile iseloomulike markereid 80 protsendil meessoost loodet kandvate emade vereplasmast (Lo et al., 1997). Y kromosoomi regioonide, nagu *SRY* ja *DYS14*, olemasolu või puudumist kasutatakse soo määramiseks (Colmant et al., 2013; Kolialexi et al., 2012). Samas peab kindlaks määrama cffDNA olemasolu, et olla kindel testi õigsuses (Page-Christiaens et al., 2006).

Sünnieelne loote soo määramine on kriitiline, kui ühel lapsevanematest esineb X- või Y-liitelise haigus. X-liitelise retsessiivse haiguse puhul tuleks teha invasiivne uuring, kindlaksmääramaks haiguse esinemist või mitteesinemist, vaid juhul kui tegemist on poisslapsel. Samuti on ka haiguseid, mis mõjutavad ainult naissoost loodet ning ei põhjusta kahju meessoost lootele, nagu *Congenital adrenal dysplasia*. Just selliste soost olenevate haiguste puhul on soo määramine ravi või raseduse saatus üle otsustamise jaoks oluline (Colmant et al., 2013).

3.4.2. Aneuploidiate detekteerimine

Kromosomaalsed anomaaliad nagu 13., 18. ja 21. kromosoomi trisoomiad ja sugukromosoomide arvu muutused on sagedasemad põhjused, miks tehakse NIPT uuring (Boon and Faas, 2013).

Paljud aneuploidiat määravad testid põhinevad cffDNA kontsentratsiooni mõõtmisel ema vereplasmast. Lo et al. kasutasid *digital relative chromosome dosage* (RCD) meetodit, kus kasutati kahte erinevatest kromosoomidest pärinevat markerit, s.h. pärines üks nendest uuritavast 21. kromosoomist. Kasutades digitaalset PCRi saadi nende kontsentratsioon ning markerite osakaalu hindamisel leiti, et markerite suhe euploidse kromosoomistiku korral on 1:1 aga 21. kromosoomi trisoomia puhul 2:1 (Everett and Chitty, 2015; Lo et al., 2007). Selle meetodiga on võimalik tuvastada üle 99% Downi sündroomiga loodetest (Sparks et al., 2012a). Samuti on cffDNA kontsentratsioonil põhinevate meetoditega tuvastatud ka teisi anomaaliaid nagu 13. ja 18. kromosoomi trisoomia ja sugukromosomaalseid anomaaliaid (Yu et al., 2014).

Kõige populaarsemad NIPT meetodid aneuploidiate määramiseks põhinevad aga teise põlvkonna sekveneerimisel (*massively parallel sequencing*, MPS), mis on andnud väga head tulemused tuvastamaks 21., 18. ja 13. kromosoomi trisoomiat. Samuti on MPS-l väga kõrge

spetsiifilisuse ja tundlikkuse näitajad, nimetatud kromosoomide suhtes, vastavalt, 100%, 100% ja 99%, ning selle tõttu on ka valepositiivsete ja -negatiivsete määrad madalad (Liang et al., 2013).

MPS abil on suudetud cffDNA-d kasutades tuvastada ka loote sugukromosoomide anomaaliaid nagu Turneri sündroom [45,X], X trisoomia, Klinefelteri sündroom [47, XXY] ja Jacobi sündroom [47, XYY], kuid sugukromosoomide anomaaliate puhul jääb umbes 5% proovidest tulemuseta (Mazloom et al., 2013; Sehnert et al., 2011). Lisaks sagedamate aneuploidiate tuvastamiseks võidakse ülegenoomsete meetodite puhul leida ka teiste kromosoomide aneuploidiaid (Liang et al., 2013).

Samuti on üha enam hakatud uurima võimalusi tuvastamiseks suuremaid deletsioone kromosoomides. Wapner et al. on näidanud oma töös, et NIPT testi abil on võimalik tuvastada ka viit sagedasemat mikrodeletsiooni (22q11.2 deletsioon, 1p36 deletsioon, *Prader-Willi*, *Angelman*'i ja *cri-du-chat* sündroomi) kasutades SNP põhinevat mikrodeletsiooni tuvastamise metoodikat (Wapner et al., 2015).

Nendel testidel on veel mitmeid piiranguid ja ainult nende kasutamist kaasasündinud haiguste kindlaksmääramiseks ei aktsepteerita. See tähendab, et tegemist on pigem sõeluuringutega ning positiivse tulemuse kinnitamiseks tuleb teha veel ka invasiivne uuring (Allyse et al., 2015).

3.4.3. Monogeensed haigused

Monogeenseid haiguseid, nagu tsüstiline fibroos ja talasseemiad, on diagnoositud invasiivsete analüüsidega, samas kui nende diagnoosimine NIPT abil on raskendatud liiga suure tausta DNA olemasolu tõttu (Chiu and Lo, 2011). Kuid sellele vaatamata on töötatud välja mõningad võimalused monogeensete haiguste testimiseks cffDNA abil.

Juba 2000. aastal suutsid Saito et al. tuvastada lootel akondroplaasiat, mida 80% juhtumitest põhjustab *de novo* punktmutatsioon. Kuna tegemist oli mutatsiooniga mida ema keharakkudes ja valgetes vererakkudes ei esinenud, siis oldi kindel, et tegemist on lootel esineva mutatsiooniga (Saito et al., 2000). See andis eelduse ka teiste monogeensete haiguste tuvastamiseks NIPT abil. Tänapäeval on cffDNA abil võimalik määrata ainult osa kaasasündinud monogeensetest haigustest. Erinevate meetoditega, MPS sekveneerimine, RCD jt., on võimalik tuvastada hemofiiliat, lihasdüstroofiat, akondroplaasiat, tanatofoorset düsplaasiat ja veel väheseid haiguseid (Verhoef et al., 2016).

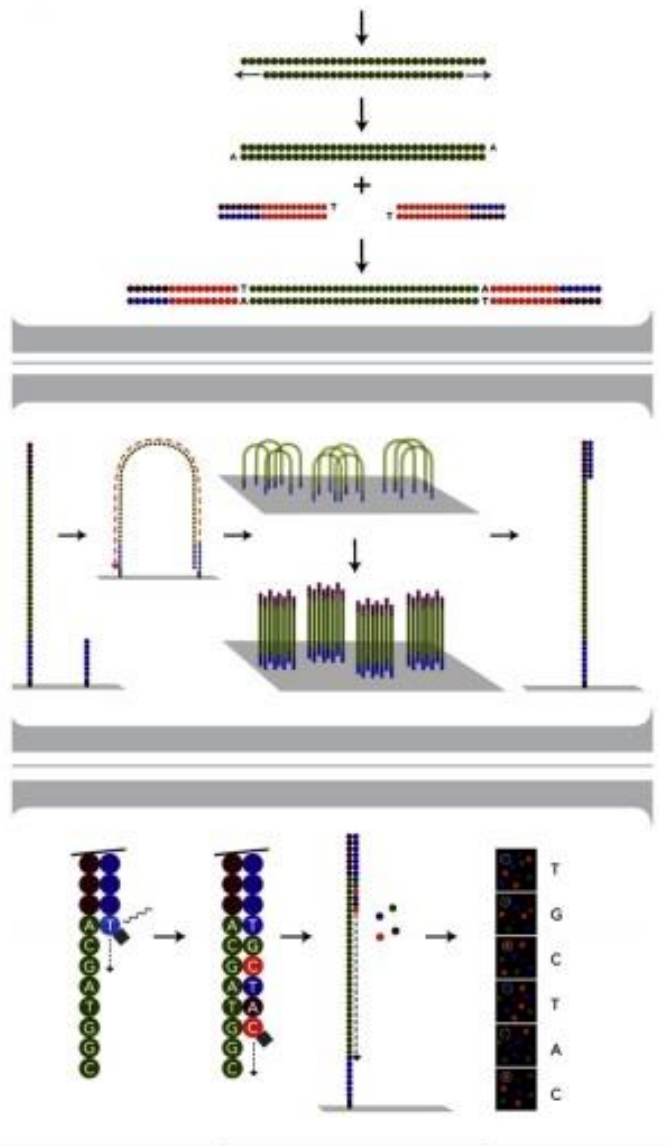
Analüütiliselt keerulisemad on juhtumid, kus ka emal on sama monogeenne haigus või retsessiivse haiguse puhul on ta mutantse alleeli kandja, kuna ei suudeta eristada ema ja loote cfDNA-d (Chiu and Lo, 2011). Uuringu keerukus mõjutab ka analüüsi hinda ning invasiivne

uuring testikaks kõiki monogeenseid haiguseid maksab mõningal juhul vähem kui ühe monogeense haiguse testimine NIPT abil (Verhoef et al., 2016).

3.5. Loote rakuvaba DNA sekveneerimine

Kuni 2008. aastani kasutati peamiselt erinevaid kvantiseerimis meetodeid tuvastamaks kaasasündinud haigusi, ning sekveneerimine polnud nii populaarne. Teise põlvkonna sekveneerimine (Joonis 1) tõi kaasa suuri muutuseid ka NIPT testidel, kuna sekveneerimine muutus odavamaks ja kiiremaks kui klassikaline Sangeri sekveneerimine. Meetod iseenesest on lihtne: paralleelselt amplifitseeritakse miljonid lühikesed DNA fragmendid ning detekteeritakse DNA järjestuses olevad alused. Saadud tulemused joondatakse seejärel referentsi abil genoomiks (Shendure and Ji, 2008). Kuid MPS-il tekkivad lühikesed järjestused on probleemiks kordusjärjestuste kokkupanemisel ning ka kogu genoomi kokkupanek on keerulisem kui Sangeri sekveneerimise puhul. Joonisel 1 on näitena toodud Illumina Inc. (San Diego, CA, USA) MPS sekveneerimise protokoll skeem. MPS väljatöötamine tegi diagnostilised testid, k.a. NIPT, täpsemaks ja spetsiifilisemaks. See tehnoloogia on teinud sünnieelse testimise ohutumaks ja informatiivsemaks (Lo, 2013; Tucker et al., 2009).

MPS on kasutusel kõigis kommertsiaalsetes NIPT testides ning MPS-il on kaks peamist alatüüpi: ülegenoomne sekveneerimine ning suunatud sekveneerimine



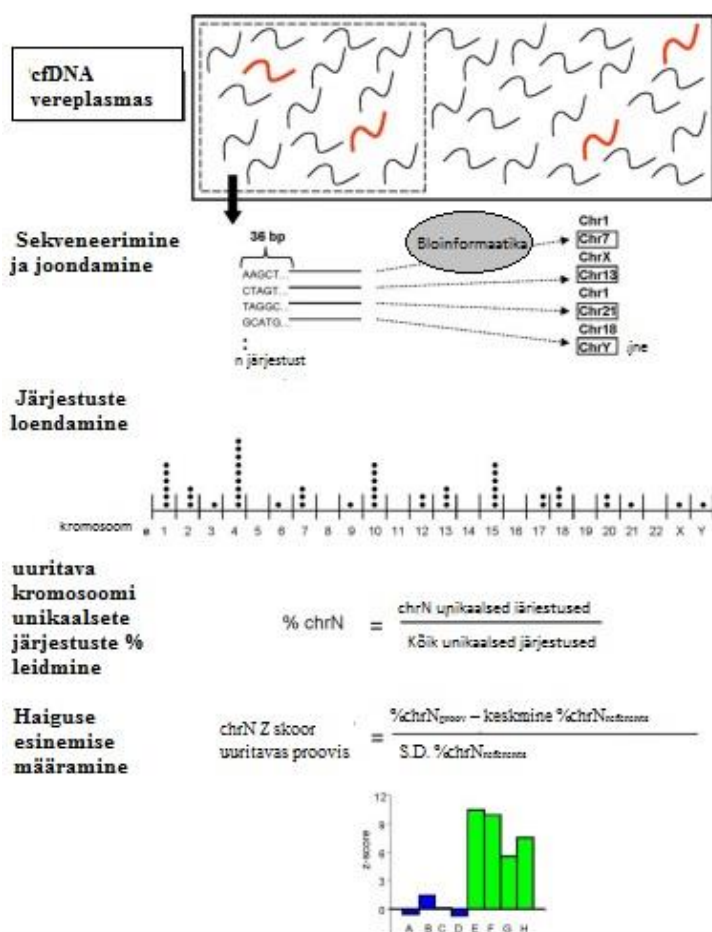
Joonis 1. Illumina MPS tööpõhimõtte ehk DNA sekveneerimine sünteesi käigus. Esmalt DNA fragmenteeritakse, ning saadud fragmendid tõmbistatakse ottest ja 3' ja 5' otstesse lisatakse adapterid. Seejärel kantakse DNA kiibile, kus nii 3' kui ka 5' ots kinnituvad kiibil olevatele komplementaarsetele ahelatele, mis täidavad ka praimerit rolli. Plaadile kinnitunud DNA moodustab silla. Seejärel sünteesib DNA polümeeraas vastas ahela. DNA denatureeritakse ja korratakse tsüklit. Peale mitut amplifikatsiooni tsüklit tekib tuhandeid konkreetseid DNA ahelaid. Peale viimast amplifikatsiooni tsüklit eemaldatakse *reverse* ahelad ja allesjäänud *forward* ahelatelt hakkab toimuma sekveneerimine. Lisatakse praimer ja igas tsüklis lisab polümeeraas ühe fluorestsentsmärgisega nukleotiidi, kuna igal nukleotiidil on oma värv, siis peale ergastamist on võimalik tuvastada lisatud nukleotiidi. Peale nukleotiidi tuvastamist võetakse fluorestsentsmärgis maha ja saab lisada uue märgitud nukleotiidi ja nii kuni kogu ahel on loetud. Selline lugemine toimub tuhandetes klastrites korraga. Tulemuseks saadud järjestused joondatakse referentsgenoomi alusel (Tucker et al., 2009) järgi.

3.5.1. Ülegenoomne sekveneerimine

Ülegenoomse sekveneerimise puhul sekveneeritakse kõik saadud cfDNA fragmendid, kusjuures ei tehta ka vahet loote ja ema cfDNA vahel. CfDNA lõigud sekveneeritakse ja seejärel määratakse iga lõigu asukoht genoomis. Kaardistatud lõigud loendatakse ja võrreldakse euploidse referentsgenoomiga või kõigi unikaalsete lõikude hulgaga (Joonis 2.). Lõikude liigsus viitab aneuploidia esinemisele (Chiu et al., 2008; Fan and Quake, 2010).

Juba 2008. aastal näidati et ülegenoomset sekveneerimist saab kasutada trisoomia detekteerimiseks. Fan et al. uurisid 18. rasedat naist, kellest üheksal tuvastati 21. kromosoomi trisoomia, kahel 18. kromosoomi trisoomia ja ühel 13. kromosoomi trisoomia. Sekveneeritud fragmentide esimese 25 aluspaari järgi joondati lõigud referentsgenoomile ning seejärel analüüsiti. Õigesti määrati kõigi rasedate karüotüübid, kasutades kontrolliks loote kromosoomanalüüsi tulemusi (Fan et al., 2008). Ka Lo et al. kirjeldasid kogu loote genoomi olemasolu ema vereplasmas (Lo et al., 2010).

Kommertsiaalsetest testidest kasutab seda meetodit näiteks Verifi® (<https://www.illumina.com/clinical/reproductive-genetic-health/nip.html>).



Joonis 2. Kromosoomi aneuploidia detekteerimine MPS-i abil. Loote cfDNA (joonisel punased fragmendid) moodustab väga väikse osa kogu cfDNA-st. Iga fragmendi otsast sekveneeritakse osa

kasutades teise põlvkonna sekveneerimist. Seejärel tehakse kindlaks iga sekveneeritud fragmendi kromosomaalne asukoht kasutades referentsgenoomi. Seejärel tehakse kindlaks igale kromosoomile vastavate unikaalsete järjestuste arv. Arvutatakse analüüsitava kromosoomi unikaalsete järjestuste % kõigi unikaalsete järjestuste hulgast. Z-skoor iga kromosoomi jaoks arvutatakse sama valemi abil ning seejärel analüüsitakse saadud tulemusi. Aneuploidia korral on vastav skoor kõrgem või madalam võrreldes euploidse loote skooriga (Chiu et al., 2008) järgi.

Ainukeks kitsaskohaks selle meetodil on andmete töötlus. Leiti, et DNA raamatukogu koostamisel ja fragmentide sekveneerimisel tekkis GC kõrvalekalle, mis tähendab, et GC rikastest aladest saadi vähem lugemeid. Kuid sellest probleemist oli võimalik üle saada kasutades algoritmi, kus GC rikastel fragmentidel on suurem kaal. Seda algoritmi kasutades oli võimalik tuvastada kõikide kromosoomide aneuploidiaid (Fan and Quake, 2010).

3.5.2. Suunatud sekveneerimine

Suunatud teise põlvkonna sekveneerimine (*targeted MPS*) on kindla regiooni või kromosoomi amplifitseerimine, mille koopiaaru tahetakse määrata. Arvatakse, selline meetod võiks olla soodsam kogu genoomi sekveneerimisest (Liao et al., 2011).

Sparks et al. eraldasid 298 raseda cfDNA ema vereplasmast, kelle hulgas oli 39 21. kromosoomi triploidiaga ja üheksa 18. kromosoomi triploidiaga rasedust. Selle meetodi puhul kasutati 18. ja 21. kromosoomi spetsiifilisi lookuseid, mida amplifitseeriti ning seejärel sekveneeriti. Peale analüüsi leiti kõik 18. ja 21. kromosoomi triploidiaga looted (Sparks et al., 2012b).

Suunatud sekveneerimiseks kasutakse ka SNP markereid genoomis. Liao et al. rikastasid vereplasmast saadud cfDNA-d 7., 18. ja 21. kromosoomis asuvate SNP-de suhtes. Kasutati SNP-e, mis olid ema genoomis homosügootsed, kuid loote genoomis heterosügootsed. Selliseid SNP-e kasutades on võimalik eristada loote cfDNA fragmente ema omadest ning neid loendada ja analüüsides näha aneuploidse karüotüüpile iseloomulikke kõrvalekaldeid (Liao et al., 2012).

Zimmermann et al. kasutasid 11 000 SNP-i, uurimaks 13., 18. ja 21. kromosoomi trisoomiaid ja genotüüpe 47,XXY ja 45,X. Nad kaasasid ka vanemate genotüübi informatsiooni antud anomaaliat tuvastamiseks arvutades välja oodatava tulemi. Kuigi isa genotüübi andmed ei ole kohustuslikud annab test parema tulemuse neid kasutades. Seejärel sekveneeritakse cfDNA ja saadud tulemusi võrreldi oodatavatega, ning tehti järeldused (Zimmermann et al., 2012).

Antud meetodi puhul tuvastatakse ainult kindlad regioonid mida uuriti, ning avastamata võivad jääda anomaaliad, mida mille vastu testi ei tehtud (Allyse et al., 2015).

Kommertsiaalsetest testidest kasutavad suunatud sekveneerimis meetodid näiteks Panorama prenatal test ja Harmony prenatal test (<http://www.ariosadx.com/healthcare-professionals/technology/>; <http://www.panoramatest.com/panorama-test/clinical-information>).

3.6. Valenegatiivsed ja valepositiivsed tulemused NIPT analüüsil

Valepositiivsed ja -negatiivsed tulemused võivad esineda sõltumata kasutatud NIPT metoodikast. Valenegatiivsete ja -positiivsete tulemuste põhjusteks võivad olla madal cffDNA osakaal, mosaiiksus, ema kasvaja ja paljud muud põhjused (Brady et al., 2016).

Kuna NIPT põhineb loote cfDNA-l ema veres ning cffDNA pärineb trofoblastist mitte loote enda rakkudest, siis võib olla, et trofoblasti rakud erinevad loote rakkudest. On olnud olukordi, kus trofoblastil esinenud aneuploidia puhul on rasedus katkestatud. Hiljem selgus aga et lootel aneuploidiat ei esinenud (Hochstenbach et al., 2015). Samamoodi on ka võimalik olukord, kus trofoblasti rakkudes kromosomaalne muutus esineb mosaiikses seisundis, andes seega ka valepositiivse tulemuse. Samuti võib esineda ka vastupidi, platsenta kariotüüp on normaalne ja lootel esineb (mosaiikne) aneuploidia (Canick et al., 2013).

Teiseks suuremaks valetulemuste saamise põhjuseks on *vanishing twin*, olukord kus mitmikraseduse korral mingil põhjusel üks loodetest hukub raseduse varasemas staadiumis. Kuna hukkunud lootel võis olla mõni kromosoomaneuploidia, siis võib ka NIPT näidata hukkunud loote kariotüüpi, andes valepositiivset tulemust (Grömminger et al., 2014).

Samuti võivad valetulemuste põhjused olla emapoolised. Ka ema somaatilised rakud võib olla mosaiiksed ja seetõttu võidakse detekteerida seda kui loote kaasasündinud haigust. Wang et al. näitasid oma töös, et ema sugukromosomaalse aneuploidia mosaiiksuse korral, saadi ka NIPT testi tulemuseks sugukromosomaalne aneuploidja. Hiljem aga uurides ema valgeid vererakke nähti, et just emal esineb mosaiiksus (Wang et al., 2014).

cfDNA osakaalu ja valetulemuste põhjuseks võib olla ka emal esinev kasvaja. Kasvaja apoptootiliste rakkude DNA ei pruugi olla normaalne ja selle tulemusena võidakse cfDNA-d uurides saada valepositiivne tulemus (Futch et al., 2013).

3.7. Kommertsiaalsed NIPT testid

NIPT on kasutusel juba rohkem kui 50 riigis (Everett and Chitty, 2015). Kommertsiaalseid teste on tänaseks erinevate firmade poolt loodud palju. Kõik kommertsiaalsed testid põhinevad MPS tehnoloogiatel. Eestis pakutakse järgmisi teste: Panorama[®], Harmony, MaternyT21 Plus, Verifi[®] ja VisibilitiT. Tänaseks on kommertsiaalsete

testidega võimalik diagnoosida 21., 18. ja 13. kromosoomi triploidiaid, sugukromosoomide aneuploidiaid ja loote sugu. Lisaks sellele pakub Panorama test ka mikroleletsioonide tuvastamist. NIPT testid erinevas üksteisest selle poolest, millist MPS tehnoloogiat kasutatakse, mida nendega testitakse ning millised on nende testide näitajad tundlikkuse ja valepositiivsuse määral (Tabel 1). Hetkel ei ole Eestis pakutavad testid haigekassa poolt finantseeritud (<http://www.kliinikum.ee/teenused/1210-harmony>;
<http://www.synnitusmaja.ee/osakonnad/raseduskeskus/rasedusaegsed-uuringud/loote-dna-uuring/>; <http://www.tervelaps.ee/>; <http://www.elitekliinik.ee/elite/rasedus/panorama-test/>).

Tabel 1. Eestis kasutatavad kommertsiaalsed NIPT testid

Firma	Natera	Ariosa Diagnostics	Illumina	Sequenom	Sequenom
Testi nimi	Panorama Prenatal test ¹	Harmony Prenatal test ²	Verifi ³	MaternyT21 Plus ⁴	Visibiliti T ⁵
Mida testitakse?	Trisoomia 21, 18 ja 13, sugu-kromosoomide arvu muutused, loote sugu, mikrodeletsioonid (Prader-Willi sündroom, 22q11.2 deletsioon, Angelman sündroom, 1p36 deletsioon ja Cri-du-chat sündroom)	Trisoomia 21, 18 ja 13	Trisoomia 21, 18 ja 13, loote sugu	Trisoomia 21, 18 ja 13, sugukromosoomide arvu muutused, loote sugu	Trisoomia 21, 18 ja 13, loote sugu
MPS Meetod	Suunatud MPS	Suunatud MPS	Ülegenoomne MPS	Ülegenoomne MPS	Ülegenoomne MPS
Testi tundlikus	trisoomia 21 - 99,9%; trisoomia 18 – 99,9%; trisoomia 13 – 96,2%; X monosoomia – 92,6%; soo määramine - 99,9%; mikrodeletsioonid - >93%	trisoomia 21 - >99%; trisoomia 18 - >97,4%; trisoomia 13 - >93.8%	trisoomia 21 - 100%; trisoomia 18 - 97%; trisoomia 13 - >87%	trisoomia 21 - >99%; trisoomia 18 - 99,9%; trisoomia 13 - >91%; soo määramine - >99%	trisoomia 21 - >99%; trisoomia 18 - >99%; soo määramine - >99%
Valepositiivsete määr	0-0,1 %	<0,1%	<0,1%	< 0,1%	< 0,1%

1. <http://www.panoramatest.com/panorama-test/>

2. <http://www.ariosadx.com/healthcare-professionals/>

3. <https://www.illumina.com/clinical/reproductive-genetic-health/nipt.html>

4. <https://www.sequenom.com/tests/reproductive-health/maternit21-plus#provider-references>

5. <https://www.sequenom.com/tests/reproductive-health/visibilit#patient-test-details>

4. Arutelu

Loote seisundi hindamine ilma kliinilise sekkumiseta on võimatu, aga selleks, et hinnang oleks täpne, on vaja kõrge täpsusega uurimismeetodeid. Kasutusel olevate invasiivsete meetoditega saadud materjali loetakse kõige täpsemaks sünnieelseks loote seisundi hindamise vahendiks, kuid sellega kaasnevate riskide tõttu ei ole see esmane uuring rasedatele. Eestis kasutusel olevad kõigile rasedatele pakutavad sõeluuringud on küll riskivabad kuid tuvastavad vaid kuni 79-93% anomaaliatest (Baer et al., 2015), mis tähendab et on vajadus paremate ja tundlikumate sõeluuringu testide järele. Täpsemad meetodid võimaldaksid mitte ainult vähendada arenguhäiretega sündivate laste arvu, kuid lisaks kärpida invasiivsete protseduuride hulka ja sellega kaasneda võivaid raseduse katkemisi.

Üheks selliseks sõeluuringu testiks võiks olla NIPT, mille tundlikus küünib 99%-ni. Lisaks on turul saadaolevate NPT testide valepositiivsete määraks arvatud alla 1 %, samas kui kombineeritud sõeluuringu puhul on see väärtus 3 % juures (Baer et al., 2015; Benn et al., 2011); Tabel 1). Siiski tegemist on sõeluuringuga, mis näitab kromosoomanomaalia esinemise riski, ning kõik positiivsed tulemused vajavad kinnitamist kasutades invasiivset uuringut. Valepositiivsete ja -negatiivsete tulemuste esinemise pärast ei kasutata NIPT ainsa sünnieelse uuringuna, ega invasiivse protseduuri asemel (Dondorp et al., 2016).

NIPT puhul testitavate genoomi regioonide arv on tänapäeval piiratud. Enamik kommertsiaalseid NIPT teste piirdub trisoomia 21, 18 ja 13 hindamisega ning loote soo määramisega. Osade NIPT testide puhul on lisaks võimalik uurida loodet sagedamate deletsioonide suhtes. Kuid väiksemate kromosomaalsete muutuste puhul on NIPT tundlikus ja täpsus madalam kui 21., 18. ja 13. kromosoomi aneuploidiate puhul (Wapner et al., 2015). Siiski NIPT testi puhul ei ole võimalik hinnata kõigi anomaaliatega esinemise riski. Testitavate anomaaliatega hulk sõltub antud testi analüüsivõimekusest ning sellest millist MPS tehnoloogiat kasutatakse. Kõige rohkem informatsiooni on võimalik saada kogu genoomi MPS-iga, kuid kommertsiaalsete testide puhul on näha, et kõige rohkem anomaaliaid on võimalik vaadata just suunatud MPS abil (Zimmermann et al., 2012). Siiski ei suuda NIPT test tuvastada selliseid arenguhäireid nagu kaasasündinud südamerike või jäsemete arenguhäire, mistõttu ei tohiks ära jätta ka ultraheli uuringuid raseduse ajal (Ermito et al., 2009). Kuigi ultraheli uuringute puhul on anomaaliatega või arenguhäirete tuvastamise määr 10 – 50%, on see siiski vajalik loote arengu jälgimiseks (Grande et al., 2012).

Kuna kõik NIPT meetodid vajavad cfDNA piisavat kontsentratsiooni ema vereplasmas, on tähtis, et teaksime kõiki seda mõjutavaid tegureid, et paremini hinnata testil saadud tulemusi. CfDNA kontsentratsioon vereplasmas peaks jääma üle 4%, et testi tulemus ei oleks kaheldav,

kuna saadavad kogused on väga väiksed ning igasugune kõikumine võib muuta testi tulemust (Canick et al., 2012; Wang et al., 2013). CffDNA osakaalu määramiseks on mitmeid meetodeid, kuid enamik neist nõuab lisakatseid, mis tõstab uuringu hinda (Peng and Jiang, 2017). On ka meetodeid, mis ei nõua lisakatseid vaid kasutavad sekveneerimisel saadud informatsiooni (Kim et al., 2015). Samas, cffDNA ei ole ainuke väli faktorite poolt mõjutav bioloogiline marker. Samaselt cffDNA kontsentratsioonile on ka vaba β -hCG ja PAPP-A kontsentratsioonid mõjutatavad erinevate väliste tegurite poolt. Näiteks, suitsetamine puhul vaba β -hCG ja PAPP-A kontsentratsioonid langevad (Ashoor et al., 2013). Seega ei saa väita, et NIPT test oleks cfDNA kontsentratsiooni kõikumiste pärast ebatäpsem või halvem kui seda on vereseerumi skriiningul põhinevad sõeluuringud.

Selleks, et veelgi edasi arendada NIPT testi tulemuste analüüsimist, tuleb mõista valepositiivsete ja -negatiivsete tulemuste tekkimise põhjuseid, ning leida korrelatsioon tulemuste ja põhjuste vahel. Lisaks sünnieelse uuringule on NIPT abil tuvastatud rasedatel naistel ka kasvajaid ja mosaiiksust, mis üldjuhul viisid sünnieelse uuringu valetulemuseni (Brady et al., 2016; Prasad, 2015). Lisaks emapoolsetele põhjustele võivad tulemust mõjutada ka platsenta mosaiiksus loote suhtes ja *vanishing twin*, kuna need mõjutavad trofoplasti rakke, millest cffDNA pärineb (Canick et al., 2013; Grömminger et al., 2014). Sellised valepositiivsed ja -negatiivsed tulemused mõjutavad sünnieelse uuringu usaldatavust.

Mitmikraseduste puhul on kromosoomanomaaliade tuvastamine nii sõeluuringutega kui ka invasiivsete protseduuridega raskendatud. Üldiselt mitmikraseduste puhul on NIPT testiga võimalik tuvastada peamisi anomaaliaid, kuid see on raskem ja ebatäpsem võrreldes üksikrasedustega. Mitmikraseduste puhul tuvastatakse kromosoomanomaaliaid tavaliselt I trimestri kombineeritud sõeluuringuga. Nii NIPT kui ka klassikalise sõeluuringu suurim probleem seisneb selles, et ei suudeta tuvastada kumma loote puhul kromosoomanomaalia esineb. Samuti pole sõeluuringute tuvastamise määr mitmikraseduste puhul võrreldav üksikrasedusega, ning UH uuringu puhul sõltub uuringu tulemus ka uuringu teostaja kogemusest (Nicolaidis, 2011). See näitab, et mitmikraseduste puhul on vaja leida täpsemad skriiningu meetodid.

Lisaks kõigele muule on raseda jaoks tähtis, et kromosoomanomaalia avastatakse võimalikult varakult. Varajane loote patoloogia avastamine on rasedale emotsionaalselt kergem. Kuna kliiniliste näidustuste puhul on võimalik aborti teha kuni 21. rasedusnädalani, annab varajane avastamine rasedale rohkem aega otsuse langetamiseks (<http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/component/content/article/11-synnieelnediagnostika>). Eestis valdavalt kasutatava I trimestri kombineeritud sõeluuringu puhul saadakse tulemused 12.-13. rasedusnädalal. Praegused NIPT protokollid näevad ette, et

sesta testi tehakse 10 rasedusnädala ajal, nii et vastus on saadaval üks-kaks nädalat varem kui klassikalise sõeluuringu puhul. Enamgi veel, NIPT puhul on täheldatud, et juba 7. rasedusnädalal on võimalik cffDNA-d analüüsida (Lo et al., 1998). Seega võiks välja töötada variante veelgi varasemate meetodite jaoks. Aga selleks, et testimist saaks teostada varem, oleks vaja cffDNA puhastamist muuta täpsemaks ning paremaks. Samuti peaks suutma väiksema hulga materjaliga tuvastada erinevaid anomaaliaid (Benn et al., 2013).

Nagu ka muude sünnieelsete testide puhul, on ka NIPT puhul oluline enne testi läbimist ja ka peale testi vastuste saamist viia läbi konsultatsioon, kus arutatakse läbi võimalikud tulemused ja nende tähendused, et rasedal oleks lihtsam otsust langetada. Igal rasedal on võimalus ise otsustada invasiivse protseduuri või NIPT vahel, sest nii invasiivse protseduuri puhul raseduse katkemine kui NIPT puhul valetulemise saamise tõenäosus on mõlemal juhul üsna väikesed. Sellise otsuse rasedale jätmine eeldab seda, et naine on saanud vastava informatsiooni, ning suudab teha põhjendatud valiku kõigi uuringute hulgast. Samuti on vaja naistearstidel ja ämmaemandatel piisavalt teadmisi kõigi pakutavate uuringute kohta, sealhulgas ka NIPT testi kohta, soovitamaks rasedale võimalikult õiget diagnostilist uuringut (Allyse et al., 2015). Kuid viimane otsus jääb ikkagi naisele, kelle otsust ei tohiks mõjutada keegi.

Kuid kindlasti mõjutab raseda otsust ka antud testi kättesaadavus ja selle hind. Kuna NIPT testi läbiviimist haigekassa hetkel ei toeta ning NIPT testide hinnad võivad küündida kuni 800 euronini (<http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/component/content/article/6-synnieelne-diagnostika/97-nipt>; <http://www.tervelaps.ee/tellimine>; <http://www.synnitusmaja.ee/osakonnad/raseduskeskus/rasedusaegsed-uuringud/loote-dna-uuring/>), antud test on hetkel kättesaamatu enamikule rasedatele. Lisaks kuna täpset diagnoosi ei panda invasiivset protseduuri läbimata, muudab selline korraldus testi kalliks võrreldes teiste praegu kättesaadavate sõeluuringutega. On välja pakutud, et NIPT testi võiks teostada kombineeritult teiste sõeluuringutega veelgi parema tulemuse saamiseks (Nicolaides et al., 2013). Selline võimalus võib küll vähendada invasiivsete protseduuride hulka kuid see ei tähenda, et väheneb ka sünnieelse diagnostika üldhind.

NIPT uuring tõstatab ka palju eetilisi küsimusi. Näiteks, kas loote sekveneerimisel saadud info teadmine võib põhjustada raseduse katkestamisi ka väiksemate ja meditsiiniliselt mittekeerukate kromosomaalsete muutuste puhul. Samas, see oht esineb ka invasiivse protseduuri tagajärjel saadud informatsiooni puhul. Samuti võidakse hakata eelistama kindlat sugu ning „vale“ soo puhul võidakse rasedus katkestada. Kas liigse informatsiooni (lapse haiguste riski või SNP-de) jagamine võib viia „disainer beebideni“. Samuti tekib küsimusi

saadud andmete kohta. Kas peaks säilitama saadud sekveneerimise andmeid ning kas neid saaks kasutada loote personaalses meditsiinis? (Dondorp et al., 2016)

Vaatamata mõningatele probleemidele ja vastamata jäävatele küsimustele on NIPT uuringul suur potentsiaal olla UH uuringu kõrval esmane skriingingu meetod (Allyse et al., 2015), kuid selleks peab leidma täpsemaid ja odavamaid võimalusi ning jõudma kokkuleppele eetilistes küsimustes.

Kokkuvõte

Sünnieelset diagnostikat on loote seisundi uurimiseks kasutatud juba aastaid, ning pidevalt on arenenud ka diagnostilised meetodid ja loote anomaaliate avastamine. Viimase 20 aasta jooksul on välja töötatud uus sünnieelne sõeluuring – mitteinvasiivne sünnieelne loote DNA uuring e. NIPT. See uuring on andnud palju lootust täpsemate sõeluuringu tulemuste saamiseks ning selle kasutusse võtmine võiks vähendada invasiivsete protseduuride hulka ning sellega kaasnevaid riske ja emotsionaalseid üleelamisi rasedatel.

NIPT põhineb loote rakuvaba DNA analüüsil ema vereplasmast. Algselt analüüsiti saadud DNAd erinevate osakaalu ja pikkust määravate meetoditega, kuid peale teise põlvkonna sekveneerimise väljatöötamist on muutunud antud test täpsemaks, paremini kättesaadavaks ja ka odavamaks.

Antud testi tulemusi võivad vähesel määral mõjutada erinevad tegurid nagu loote või vanema mosaiiksuse esinemine, ema kasvaja, *vanishing twin*, raseda kaal ja isegi mitmikrasedus. Samuti võib valetulemuse saada ka vähese loote rakuvaba DNA hulga puhul. Kuid need on erandlikud ja väga harvad juhud. Kõrvale ei saa jätta ka testi eetilist poolt, kuna testiga on võimalik saada väga palju erinevat informatsiooni.

Tänapäeval on võimalik kommertsiaalsete testidega tuvastada erinevaid trisoomiaid ning valitud deletsioone. Kuid erinevate firmade testidel on erinevad võimalused ja ka testi tundlikus. Test on veel vaid sõeluuring ning diagnoosi panemiseks tehakse ka invasiivne protseduur testi tulemuse kinnitamiseks.

Täna on kommertsiaalseid NIPT teste pakutud rasedatele juba peaaegu viis aastat üle 50-s riigis, sealhulgas ka Eestis. Kuigi testi ei ole väga kaua praktiseeritud on sellel suur potentsiaal asendada tulevikus teisi sõeluuringuid.

Summary

Non-invasive prenatal testing – the future of prenatal diagnostics

Kaia Hirv

Prenatal diagnostics have been offered to pregnant women for a long time. The specificity and sensitivity of prenatal diagnostic techniques have improved a lot over the years. Recently, a new method for better and more sensitive screening – non-invasive prenatal testing (NIPT) – has been developed. This method can decrease the need for invasive prenatal testing and with that decrease the risk of miscarriage.

NIPT is a screening method which analyses cell-free fetal DNA in maternal blood serum. The test can detect different fetal aneuploidies, fetal sex and even some common deletions. First NIPT tests were done by measuring the length or volume of cell-free fetal DNA, but massively parallel sequencing made the test more sensitive and affordable to pregnant women.

The test can detect fetal aneuploidies as early as 7-10 gestation week, but test results may be influenced by vanishing twin, the mosaicism of foetus or the mother, cancer, mother's weight or even twin pregnancy. When cell-free fetal DNA fraction is very low you can get a false result. But in general, false-negative and -positive results are rare cases.

Today some companies offer NIPT tests for different trisomy's and even for some deletions. Test sensitivities are claimed to be similar, and the only difference among different commercial tests is the applied technology and regions that are tested. For now, NIPT is a screening test only, which means that every positive NIPT result must be confirmed by invasive procedure.

The commercial NIPT test have been offered for almost five years in over 50 countries, including Estonia. Even though the test has not been out for a long time it has a great potential to replace current screening methods in the future.

Kirjanduse loetelu

Agarwal, A., Sayres, L.C., Cho, M.K., Cook-Deegan, R., and Chandrasekharan, S. (2013). Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States. *Prenat Diagn* 33, 521-531.

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

Alfirevic, Z., Sundberg, K., and Brigham, S. (2003). Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003252.

Allyse, M., Minear, M.A., Berson, E., Sridhar, S., Rote, M., Hung, A., and Chandrasekharan, S. (2015). Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *Int J Womens Health* 7, 113-126.

Ashoor, G., Syngelaki, A., Poon, L.C., Rezende, J.C., and Nicolaides, K.H. (2013). Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 41, 26-32.

Baer, R.J., Flessel, M.C., Jelliffe-Pawlowski, L.L., Goldman, S., Hudgins, L., Hull, A.D., Norton, M.E., and Currier, R.J. (2015). Detection Rates for Aneuploidy by First-Trimester and Sequential Screening. *Obstet Gynecol* 126, 753-759.

Bang, J., Bock, J.E., and Trolle, D. (1982). Ultrasound-guided fetal intravenous transfusion for severe haemolytic disease. *British medical journal* 284, 373 - 374.

Bellis, M.A., Hughes, K., Hughes, S., and Ashton, J.R. (2005). Measuring paternal discrepancy and its public health consequences. *J Epidemiol Community Health* 59, 749-754.

Benn, P. (1998). Trisomy 16 and trisomy 16 Mosaicism: a review. *Am J Med Genet* 79, 121-133.

Benn, P., Borell, A., Crosseley, J., Cuckle, H., Dugoff, L., Gross, S., Johnson, J., Maymon, R., Odibo, A., Schielen, P., *et al.* (2011). Aneuploidy screening: a position statement from a

committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, January 2011. *Prenat Diagn* 31, 519 - 522.

Benn, P., Cuckle, H., and Pergament, E. (2013). Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 42, 15 - 33.

Berry, S.M., Stone, J., Norton, M.E., Johnson, D., and Berghella, V. (2013). Fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol* 209, 170-180.

Bianchi, D.W. (2004). Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta* 25 *Suppl A*, S93-S101.

Bianchi, D.W. (2012). From prenatal genomic diagnosis to fetal personalized medicine: progress and challenges. *Nat Med* 18, 1041-1051.

Bianchi, D.W., Williams, J.M., Sullivan, L.M., Hanson, F.W., Klinger, K.W., and Shuber, A.P. (1997). PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 61, 822-829.

Boon, E.M., and Faas, B.H. (2013). Benefits and limitations of whole genome versus targeted approaches for noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 33, 563-568.

Brady, P., Brison, N., Van Den Bogaert, K., de Ravel, T., Peeters, H., Van Esch, H., Devriendt, K., Legius, E., and Vermeesch, J.R. (2016). Clinical implementation of NIPT - technical and biological challenges. *Clinical Genetics* 89, 523-530.

Canick, J.A., Kloza, E.M., Lambert-Messerlian, G.M., Haddow, J.E., Ehrich, M., van den Boom, D., Bombard, A.T., Deciu, C., and Palomaki, G.E. (2012). DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn* 32, 730-734.

Canick, J.A., Palomaki, G.E., Kloza, E.M., Lambert-Messerlian, G.M., and Haddow, J.E. (2013). The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 33, 667-674.

Celep, F., Karaguzel, A., Ozeren, M., and Bozkaya, H. (2006a). The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 127, 106-109.

Celep, F., Karaguüzel, A., Özeren, M., and Bozkaya, H. (2006b). The frequency of chromosomal abnormalities in patients. *ejogrb* 127, 106 - 109.

Chan, K.C., Ding, C., Gerovassili, A., Yeung, S.W., Chiu, R.W., Leung, T.N., Lau, T.K., Chim, S.S., Chung, G.T., Nicolaidis, K.H., *et al.* (2006). Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 52, 2211-2218.

Chan, K.C., Zhang, J., Hui, A.B., Wong, N., Lau, T.K., Leung, T.N., Lo, K.W., Huang, D.W., and Lo, Y.M. (2004). Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 50, 88-92.

Chan, K.C., Yeung, S.W., Lui, W.B., Rainer, T.H., and Lo, Y.M. (2005). Effects of preanalytical factors on the Molecular size of cell-free DNA in blood. *clinical Chemistry* 51, 781 - 782

Chiu, R.W., Chan, K.C., Gao, Y., Lau, V.Y.M., Zheng, W., Leung, T.Y., Foo, C.H.F., Xie, B., Tsui, N.B.Y., Lun, F.M., *et al.* (2008). Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *PNAS* 105, 20458 - 20463.

Chiu, R.W.K., and Lo, Y.M.D. (2011). Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 16, 88-93.

Colmant, C., Morin-Surroca, M., Fuchs, F., Fernandez, H., and Senat, M.V. (2013). Non-invasive prenatal testing for fetal sex determination: is ultrasound still relevant? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 171, 197-204.

Dondorp, W.J., Page-Christiaens, G.C., and de Wert, G.M. (2016). Genomic futures of prenatal screening: ethical reflection. *Clin Genet* 89, 531-538.

Dugoff, L., Barberio, A., Whittaker, P.G., Schwartz, N., Sehdev, H., and Bastek, J.A. (2016). Cell-free DNA fetal fraction and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 215, 231 e231-237.

Dunn, T.M., Grunfeld, L., and Kardon, N.B. (2001). Trisomy 1 in a clinically recognized IVF pregnancy. *Am J Med Genet* 99, 152-153.

- Eason, J. (2010). Prenatal diagnosis of single gene disorders. *Obstet Gynecol* 20, 155 - 160.
- Ermito, S., Dianatale, A., Carrara, S., Cavalie, A., Imbrugila, L., and Recupero, S. (2009). Prenatal diagnosis of limb abnormalities: role of fetal ultrasonography *Journal of Prenatal Medicine* 3, 18 - 22.
- Evans, M.I., Henry, G.P., Miller, W.A., Bui, T.H., Snidjers, R.J., Wapner, R.J., Miny, P., Johnson, M.P., Peakman, D., Johnson, A., *et al.* (1999). International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent insitu hybridization are used. *Hum Reprod* 14, 1213 - 1216.
- Everett, T.R., and Chitty, L.S. (2015). Cell-free fetal DNA: the new tool in fetal medicine. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 45, 499-507.
- Fan, H.C., Blumenfeld, Y.J., Chitkara, U., Hudgins, L., and Quake, S.R. (2008). Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *PNAS* 105, 16266 - 16271.
- Fan, H.C., and 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, e10439.
- Futch, T., Spinosa, J., Bhatt, S., de Feo, E., Rava, R.P., and Sehnert, A.J. (2013). Initial clinical laboratory experience in noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy from maternal plasma DNA samples. *Prenat Diagn* 33, 569-574.
- Grande, M., Arigita, M., Borobio, V., Jimenez, J.M., Fernandez, S., and Borrell, A. (2012). First-trimester detection of structural abnormalities and the role of aneuploidy markers. *Ultrasound Obstet Gynecol* 39, 157-163.
- Gravina, S., Sedivy, J.M., and Vijg, J. (2016). The dark side of circulating nucleic acids. *Aging Cell* 15, 398-399.
- Group, T.C.E.a.M.-T.A.T.C. (1998). Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. *Lancet* 351.
- Grömminger, S., Yagmur, E., Erkan, S., Nagy, S., Schöck, U., Bonnet, J., Smerdka, P., Ehrich, M., Wegner, W., and Stumm, M. (2014). Fetal aneuploidy detection by cell-free DNA

sequencing for multiple pregnancies and quality issues with vanishing twins. *J Clin Med*, 679 - 692.

Han, J.Y., and Nava-Ocampo, A.A. (2005). Fetal heart rate response to cordocentesis and pregnancy outcome: a prospective cohort. *J Matern Fetal Neonatal Med* 17, 207-211.

Heinaru, A. (2012). *Geneetika*.

Herzenberg, L.A., Bianchi, D.W., Schröder, J., Cann, H.M., and Iverson, G.M. (1979). Fetal cells in the blood of pregnant women: Detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *medical sciences* 76, 1453 - 1455

Hochstenbach, R., Nikkels, P.G.J., Elferink, M.G., Oudijk, M.A., van Oppen, C., van Zon, P., van Harssel, J., Schuring-Blom, H., and Page-Christiaens, G.C.M.L. (2015). Cell-free fetal DNA in the maternal circulation originates from the cytotrophoblast: proof from an unique case. *Clinical Case Reports* 3, 489-491.

Jenkins, T.M., and Wapner, R.J. (1999). First trimester prenatal diagnosis: Chorionic villus sampling. *Seminars in Perinatology* 23, 403 - 413.

Jiang, P., Chan, K.C., Liao, G.J., Zheng, Y.W., Leung, T.Y., Chiu, R.W., Lo, Y.M., and Sun, H. (2012). FetalQuant: deducing fractional fetal DNA concentration from massively parallel sequencing of DNA in maternal plasma. *Bioinformatics* 28, 2883-2890.

Kim, S.K., Hannum, G., Geis, J., Tynan, J., Hogg, G., Zhao, C., Jensen, T.J., Mazloom, A.R., Oeth, P., Ehrich, M., *et al.* (2015). Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenat Diagn* 35, 810-815.

Kolialexi, A., Tounta, G., Apostolou, P., Vrettou, C., Papantoniou, N., Kanavakis, E., Antsaklis, A., and Mavrou, A. (2012). Early non-invasive detection of fetal Y chromosome sequences in maternal plasma using multiplex PCR. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 161, 34-37.

Kuliev, A., Zlatopolsky, Z., Kirillova, I., Spivakova, J., and Cieslak Janzen, J. (2011). Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online* 22, 2-8.

Leung, T.N., Zhang, J., Lau, T.K., Hjelm, N.M., and Lo, Y.M. (1998). Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *The Lancet* 352, 1904-1905.

Levine, R.J., Qian, C., Leshane, E.S., Yu, K.F., England, L.J., Schisterman, E.F., Wataganara, T., Romero, R., and Bianchi, D.W. (2004). Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 190, 707-713.

Li, Y., Zimmermann, B., Rusterholz, C., Kang, A., Holzgreve, W., and Hahn, S. (2004). Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem* 50, 1002-1011.

Liang, D., Lv, W., Wang, H., Xu, L., Liu, J., Li, H., Hu, L., Peng, Y., and Wu, L. (2013). Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing. *Prenat Diagn* 33, 409-415.

Liao, G.J., Chan, K.C., Jiang, P., Sun, H., Leung, T.Y., Chiu, R.W., and Lo, Y.M. (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.

Liao, G.J., Lun, F.M., Zheng, Y.W., Chan, K.C., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W., and Lo, Y.M. (2011). Targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA permits efficient and unbiased detection of fetal alleles. *Clin Chem* 57, 92-101.

Lo, Y.M., Chan, K.C., Sun, H., Chen, E.Z., Jiang, P., Lun, F.M., Zheng, Y.W., Leung, T.Y., Lau, T.K., Cantor, C.R., *et al.* (2010). Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of fetus. *Science translational medicine* 2.

Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., and Wainscoat, J.S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350, 485-487.

Lo, Y.M., Lau, T.K., Zhang, J., Leung, T.N., Chang, A.M., Hjelm, N.M., Elmes, R.S., and Bianchi, D.W. (1999a). Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clinical Chemistry* 45, 1747-1751.

Lo, Y.M., Leung, T.N., Tein, M.S., Sargent, I.L., Zhang, J., Lau, T.K., Haines, C.J., and Redman, C.W.G. (1999b). Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in Preeclampsia. *Clinical Chemistry* 45, 184-188.

Lo, Y.M., Lun, F.M., Chan, K.C., Tsui, N.B.Y., Chong, K.C., Lau, T.K., Leung, T.Y., Zee, B.C.Y., Cantor, C.R., and Chiu, R.W. (2007). Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *PNAS* 104, 13116 - 13121.

- Lo, Y.M., Zhang, J., Leung, T.N., Lau, T.K., Chang, A.M., and Hjelm, N.M. (1999c). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 64, 218-224.
- Lo, Y.M., Tein, M.S., Lau, T.K., Haines, C.J., Leung, T.N., Poon, P.M., Wainscoat, J.S., Johnson, P.J., Chang, A.M., and Hjelm, N.M. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 62, 768-775.
- Lo, Y.M.D. (2013). Non-invasive prenatal testing using massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: from molecular karyotyping to fetal whole-genome sequencing. *Reproductive BioMedicine Online* 27, 593-598.
- Lun, F.M., Chiu, R.W., Chan, K.C., Leung, T.Y., Lau, T.K., and Lo, Y.M. (2008). Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 54, 1664-1672.
- Lun, F.M., Chiu, R.W., Sun, K., Leung, T.Y., Jiang, P., Chan, K.C., Sun, H., and Lo, Y.M. (2013). Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA. *Clin Chem* 59, 1583-1594.
- Mandel, P., and Metais, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 142 241 - 243.
- Mazloom, A.R., Dzakula, Z., Oeth, P., Wang, H., Jensen, T., Tynan, J., McCullough, R., Saldivar, J.S., Ehrich, M., van den Boom, D., *et al.* (2013). Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 33, 591-597.
- McEwan, A. (2005). Harvesting Fetal Cells from the Maternal Circulation. *Fetal and Maternal Medicine Review* 16, 151.
- Nicolaidis, K.H. (2011). Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* 31, 7-15.
- Nicolaidis, K.H., Azar, G., Byrne, D., Mansur, C., and Marks, K. (1992). Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ* 304.

- Nicolaides, K.H., Wright, D., Poon, L.C., Syngelaki, A., and Gil, M.M. (2013). First-trimester contingent screening for trisomy 21 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. *Ultrasound Obstet Gynecol* 42, 41-50.
- Nygren, A.O.H., Dean, J., Jensen, T.J., Kruse, S., Kwong, W., Van den Boom, D., and Ehrich, M. (2010). Quantification of fetal DNA use of methylation-based DNA discrimination. *Clinical Chemistry* 56, 1627 - 1635.
- O'Donoghue, K., Giorgi, L., Pontello, V., Pasquini, L., and Kumar, S. (2007). Amniocentesis in the third trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 27, 1000-1004.
- Page-Christiaens, G.C., Bossers, B., CE, V.D.S., and M, D.E.H. (2006). Use of bi-allelic insertion/deletion polymorphisms as a positive control for fetal genotyping in maternal blood: first clinical experience. *Ann N Y Acad Sci* 1075, 123-129.
- Peng, X.L., and Jiang, P. (2017). Bioinformatics Approaches for Fetal DNA Fraction Estimation in Noninvasive Prenatal Testing. *Int J Mol Sci* 18.
- Potapova, T., and Gorbisky, G.J. (2017). The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology (Basel)* 6.
- Prasad, V. (2015). Non-invasive, serum DNA pregnancy testing leading to incidental discovery of cancer: a good thing? *Eur J Cancer* 51, 2272-2274.
- Repiska, G., Sedlackova, T., Szemes, T., Celec, P., and Minarik, G. (2013). Selection of the optimal manual method of cell free fetal DNA isolation from maternal plasma. *Clin Chem Lab Med* 51, 1185-1189.
- Saito, H., Sekizawa, A., Morimoto, T., Suzuki, M., and Yanaihara, T. (2000). Prenatal DNA diagnosis of single gene disorder from maternal plasma. *The Lancet* 356, 1170
- Sarno, A.P., Jr., and Wilson, R.D. (2008). Fetal cardiocentesis: a review of indications, risks, applications and technique. *Fetal Diagn Ther* 23, 237-244.
- Sehnert, A.J., Rhees, B., Comstock, D., de Feo, E., Heilek, G., Burke, J., and Rava, R.P. (2011). Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem* 57, 1042-1049.

- Shaffer, L.G., and Lupski, J.R. (2000). Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annual review of genetics* 34, 297 - 329.
- Shendure, J., and Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26, 1135-1145.
- Sifakis, S., Koukou, Z., and Spandidos, D.A. (2015). Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications (review). *Mol Med Rep* 11, 2367-2372.
- Simonazzi, G., Curti, A., Farina, A., Pilu, G., Bovicelli, L., and Rizzo, N. (2010). Amniocentesis and chorionic villus sampling in twin gestations: which is the best sampling technique? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 202.
- Sitska, M. (2012). Pärilike haiguste sünnieelne diagnoosimine Eestis. Kokkuvõte tehtud tööst 1990 – 2012.
- Sparks, A.B., Struble, C.A., Wang, E.T., Song, K., and 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, 319 e311-319.
- Sparks, A.B., Wang, E.T., Struble, C.A., Barrett, W., Stokowski, R., McBride, C., Zahn, J., Lee, K., Shen, N., Doshi, J., *et al.* (2012b). Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 32, 3-9.
- Sugito, Y., Sekizawa, A., Farina, A., Yukimoto, Y., Saito, H., Iwasaki, M., Rizzo, N., and Okai, T. (2003). Relationship between severity of hyperemesis gravidarum and fetal DNA concentration in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 49, 1667-1669.
- Zimmermann, B., Hill, M., Gemelos, G., Demko, Z., Banjevic, M., Baner, J., Ryan, A., Sigurjonsson, S., Chopra, N., Dodd, M., *et al.* (2012). Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn* 32, 1233-1241.
- Tabor, A., and Alfirevic, Z. (2010). Update on Procedure-Related Risks for Prenatal Diagnosis Techniques. *Fetal Diagnosis and Therapy* 27, 1-7.
- Tucker, T., Marra, M., and Friedman, J.M. (2009). Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am J Hum Genet* 85, 142-154.

Ustav, E., Asser, K., Haldre, K., Muru, K., Ridnõi, K., Buts, K., Rajasalu, L., and Reimand, T. (2016). Sünnieelse diagnostika juhend: loote kromosoomhaiguste sõeluuring ja diagnoosimine. Loote ultraheliuuringud.

van der Vaart, M., and Pretorius, P.J. (2007). The origin of circulating free DNA. *Clin Chem* 53, 2215.

Wang, E., Batey, A., Struble, C., Musci, T., Song, K., and Oliphant, A. (2013). Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 33, 662-666.

Wang, Y., Chen, Y., Tian, F., Zhang, J., Song, Z., Wu, Y., Han, X., Hu, W., Ma, D., Cram, D., *et al.* (2014). Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clin Chem* 60, 251-259.

Wapner, R.J., Babiarez, J.E., Levy, B., Stosic, M., Zimmermann, B., Sigurjonsson, S., Wayham, N., Ryan, A., Banjevic, M., Lacroute, P., *et al.* (2015). Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndromes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 212, 332.e331-332.e339.

Wataganara, T., Chen, A.Y., LeShane, E.S., Sullivan, L.M., Borgatta, L., Bianchi, D.W., and Johnson, K.L. (2004). Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril* 81, 638-644.

Verhoef, T.I., Hill, M., Drury, S., Mason, S., Jenkins, L., Morris, S., and Chitty, L.S. (2016). Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) for single gene disorders: cost analysis of NIPD and invasive testing pathways. *Prenat Diagn* 36, 636-642.

Yu, S.C., Chan, K.C., Zheng, Y.W., Jiang, P., Liao, G.J., Sun, H., Akolekar, R., Leung, T.Y., Go, A.T., van Vugt, J.M., *et al.* (2014). Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 8583-8588.

Kasutatud veebiaadressid

1. <http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/component/content/article/31>
2. www.omim.org
3. <http://www.kliinikum.ee/naistekliinik/naistenouandla/rasedusaegsed-uuringud/79-raseduse-jaelgmine-naedalate-kaupa>
4. <http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/suennieelne-diagnostika/12-rasedatesoeluuringud>
5. <http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/suennieelne-diagnostika/14-iitrimestrisoeluuring>
6. <https://www.illumina.com/clinical/reproductive-genetic-health/nipt.html>
7. <http://www.ariosadx.com/healthcare-professionals/technology/>
8. <http://www.panoramatest.com/panorama-test/clinical-information>
9. <http://www.kliinikum.ee/teenused/1210-harmony>
10. <http://www.synnitusmaja.ee/osakonnad/raseduskeskus/rasedusaegsed-uuringud/lootedna-uuring/>
11. <http://www.tervelaps.ee/>
12. <http://www.elitekliinik.ee/elite/rasedus/panorama-test/>
13. <http://www.panoramatest.com/panorama-test/>
14. <http://www.ariosadx.com/healthcare-professionals/>
15. <https://www.illumina.com/clinical/reproductive-genetic-health/nipt.html>
16. <https://www.sequenom.com/tests/reproductive-health/maternit21-plus#provider-references>
17. <https://www.sequenom.com/tests/reproductive-health/visibilit#patient-test-details>
18. <http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/component/content/article/11-synnieelnediagnostika>
19. <http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/component/content/article/6-synnieelne-diagnostika/97-nipt>
20. <http://www.tervelaps.ee/tellimine>
21. <http://www.synnitusmaja.ee/osakonnad/raseduskeskus/rasedusaegsed-uuringud/lootedna-uuring/>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kaia Hirv

(sünnikuupäev: 13.02.1995)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Mitteinvasiivne sünnieelne loote DNA uuring – sünnieelse diagnostika tulevik“, mille juhendajad on Olga Žilina ja Ants Kurg,

1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace´i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
3. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 21.08.2017