

# Влияние терапии низкомолекулярными гепаринами на уровень плодовой ДНК при проведении неинвазивного пренатального ДНК-скрининга

И.Ю. Барков, Н.К. Тетруашвили, Ю.С. Булатова, Л.В. Ким, Н.Г. Парсаданян, Е.С. Шубина, А.Ю. Гольцов, Д.Ю. Трофимов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, г. Москва

## РЕЗЮМЕ

**Цель исследования:** оценить влияние терапии низкомолекулярными гепаринами (НМГ) на проведение неинвазивного пренатального ДНК-скрининга (НИПС) хромосомной патологии плода.

**Дизайн:** одномоментное (поперечное) исследование.

**Материалы и методы.** Обследованы две группы беременных женщин: I группа включала 49 пациенток с устойчиво низкой долей плодовой ДНК (дважды менее 4%), отобранных из 1505 женщин, проходивших обследование в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в течение последних 2 лет. Из них 17 участниц получали НМГ и 32 не получали. Во II группу вошли 113 беременных с нормальной фракцией плодовой ДНК (4% и выше), она была сформирована произвольно из женщин, проходивших обследование в тот же период. Из них принимали НМГ 56 беременных, а 57 их не принимали. НИПС проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing). Для определения доли плодовой ДНК осуществлялась амплификация локусов ДНК с однонуклеотидными полиморфизмами.

**Результаты.** В I группе (с низкой фракцией плодовой ДНК) при отсутствии терапии НМГ медиана значений составила 3,5% (3,2–3,8%), при приеме НМГ — 3,6% (3,4–3,9%), во II группе — 7,7% (6,1–9,5%) и 7,9% (6,0–10,5%) соответственно, значимых различий в обоих случаях не было ( $p = 0,29$  и  $p = 0,7$  соответственно).

**Заключение.** Применение НМГ не влияет на успешность НИПС, в связи с чем отсутствует необходимость корректировать тактику лечения беременных НМГ перед проведением НИПС.

**Ключевые слова:** неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг, гепарин, антикоагулянты, низкомолекулярные гепарины, привычный выкидыш, осложнения беременности.

**Вклад авторов:** Барков И.Ю. — разработка дизайна исследования, сбор клинического материала, обработка, анализ и интерпретация данных, статистическая обработка данных; Тетруашвили Н.К. — разработка дизайна исследования, сбор клинического материала, ведение пациентов, интерпретация результатов исследования; Булатова Ю.С., Ким Л.В., Парсаданян Н.Г. — сбор клинического материала, написание текста, статистическая обработка данных; Шубина Е.С., Гольцов А.Ю. — обзор публикаций по теме статьи, написание текста, проверка критически важного содержания; Трофимов Д.Ю. — выбор темы публикации, анализ и интерпретация данных, утверждение рукописи для публикации.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

**Источник финансирования:** исследование выполнено по теме Госзадания «Разработка системы прогнозирования осложнений и исходов беременностей у женщин с привычным выкидышем», тема 16-A21.

**Для цитирования:** Барков И.Ю., Тетруашвили Н.К., Булатова Ю.С., Ким Л.В., Парсаданян Н.Г., Шубина Е.С., Гольцов А.Ю., Трофимов Д.Ю. Влияние терапии низкомолекулярными гепаринами на уровень плодовой ДНК при проведении неинвазивного пренатального ДНК-скрининга. Докт.ру. 2021; 20(8): 19–22. DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-8-19-22

## Effect of the Low Molecular Heparin Therapy on Foetal DNA Level in Non-Invasive Prenatal DNA Screening

I.Yu. Barkov, N.K. Tetruashvili, Yu.S. Bulatova, L.V. Kim, N.G. Parsadanyan, E.S. Shubina, A.Yu. Goltsov, D.Yu. Trofimov

V.I. Kulakov National Medical Scientific Centre of Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation; 4 Academician Oparina Str., Moscow, Russian Federation 117997

## ABSTRACT

**Study Objective:** To evaluate the effect of low molecular heparin (LMH) therapy on non-invasive prenatal DNA screening (NIPS) for chromosomal pathologies.

**Study Design:** cross-sectional study.

**Materials and Methods.** We have examined two groups of pregnant women: group I included 49 patients with constantly low foetal DNA (twice lower than 4%) selected out of 1,505 women examined at Kulakov National Medical Scientific Centre of Obstetrics, Gynaecology and

Барков Илья Юрьевич — к. м. н., заведующий лабораторией пренатального ДНК-скрининга ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 5976-7201. E-mail: i\_barkov@oparina4.ru  
Тетруашвили Нана Картлосовна (автор для переписки) — д. м. н., заведующая вторым акушерским отделением патологии беременности, заместитель директора Института акушерства ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 3803-7764. E-mail: tetrauly@mail.ru  
(Окончание на с. 20.)



Perinatal Medicine of the Ministry of Health of Russia during the last 2 years. 17 women were administered LMH and 32 women did not receive it. Group II included 113 pregnant women with a normal foetal DNA fraction (at least 4%), that were selected randomly out of patients who were examined during the same period. 56 pregnant women were administered LMH and 57 were not. Next Generation Sequencing was used as an NIPS method. In order to determine the foetal DNA level, we amplified DNA loci with single nucleotide polymorphisms.

**Study Results.** In group I (low foetal DNA fraction), where no LMH therapy was initiated, median values were 3.5% (3.2–3.8%); if LMH was administered, these values made 3.6% (3.4–3.9), while in group II — 7.7% (6.1–9.5%) and 7.9% (6.0–10.5%), respectively; no significant differences ( $p = 0.29$  and  $p = 0.7$ , respectively) were recorded in both cases.

**Conclusion.** Use of LMH does not affect NIPS; therefore, it is not necessary to adjust the LMH therapy in pregnant women prior to NIPS.

**Keywords:** non-invasive prenatal DNA screening, heparin, anticoagulants, low molecular heparins, habitual abortion, pregnancy complications.

**Contributions:** Barkov, I.Yu. — study design, clinical material collection, data processing, analysis and interpretation, statistical data processing; Tetrushvili, N.K. — study design, clinical material collection, patient management, results interpretation; Bulatova, Yu.S., Kim, L.V. and Parsadanyan, N.G. — clinical material collection, text of the article, statistical data processing; Shubina, E.S. and Goltsov, A.Yu. — review of thematic publications, text of the article, review of critically important material; Trofimov, D.Yu. — selection of the topic for the article, data analysis and interpretation, approval of the manuscript for publication.

**Conflict of interest:** The authors declare that they do not have any conflict of interests.

**Source of funding:** The study was undertaken within the scope of the state assignment “Development of the system to forecast complications and pregnancy outcomes in women with habitual abortions”, topic 16-A21.

**For citation:** Barkov I.Yu., Tetrushvili N.K., Bulatova Yu.S., Kim L.V., Parsadanyan N.G., Shubina E.S., Goltsov A.Yu., Trofimov D.Yu. Effect of the Low Molecular Heparin Therapy on Foetal DNA Level in Non-Invasive Prenatal DNA Screening. Doctor.Ru. 2021; 20(8): 19–22. (in Russian). DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-8-19-22

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг (НИПС) занимает важное место в программе антенатального обследования беременных [1]. НИПС может быть использован как в качестве скрининга второй линии при высоком риске хромосомной анеуплоидии, не ассоциированной с ультразвуковыми маркерами, так и в качестве самостоятельного исследования по желанию беременной. В то же время растет число женщин старшего репродуктивного возраста с отягощенным акушерским анамнезом, экстрагенитальной патологией, осложненным течением данной беременности, неблагоприятным исходом предыдущих беременностей. В этих клинических ситуациях выполнение НИПС для принятия аргументированного решения о необходимости инвазивных диагностических процедур имеет исключительное значение. Важнейшим параметром при проведении ДНК-скрининга является доля плодовой ДНК в материнском кровотоке. Известно, что при фракции плодовой ДНК менее 4% снижается точность теста либо проведение исследования невозможно, так как не позволяет выдать корректный результат [1].

В течение последних лет группы отечественных и зарубежных исследователей анализировали причины низкой фракции плодовой ДНК и ее взаимосвязь с последующими осложнениями и исходами беременности [2–5].

Среди причин феномена низкой фракции плодовой ДНК указывались избыточная масса тела или ожирение, индивидуальные особенности данной беременности, плод с хромосомной анеуплоидией, а также использование различных групп лекарственных препаратов, среди которых

особое внимание уделяется низкомолекулярным гепаринам (НМГ) [2, 3, 6–8].

Несмотря на то что патогенетический механизм данного феномена представляется неясным, авторы описывают отдельные клинические наблюдения, указывающие на возможную связь лекарственной терапии и низкой фракции плодовой ДНК [4, 9]. В частности, в одной из публикаций отмечено, что через 36 часов после отмены НМГ эноксапарина удалось достигнуть порога 5,74% фракции плодовой ДНК, вследствие чего проведение теста стало возможным и был установлен высокий риск трисомии 21, подтвержденный инвазивной диагностической процедурой [3].

Но в других публикациях четкой связи между приемом лекарственных препаратов и низкой фракцией плодовой ДНК выявить не удалось [7]. Согласно клиническим рекомендациям ведущих акушерских сообществ, НМГ назначают только при тромбофилии высокого риска либо у женщин с перенесенным тромбозом [10]. Однако в последние годы показания для использования НМГ во время беременности расширяются, в частности их назначают для предотвращения плацента-ассоциированных осложнений беременности у женщин с отягощенным акушерским анамнезом и неблагоприятным исходом предыдущей беременности вследствие тяжелой преэклампсии, плацентарной недостаточности, антенатальной гибели плода. В результате увеличивается число беременных, принимающих НМГ с целью профилактики акушерских и тромботических осложнений.

При сочетании со старшим репродуктивным возрастом и отягощенным акушерским анамнезом часто появляется

Булатова Юлия Сергеевна — врач акушер-гинеколог ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: [yu.bulatova@mail.ru](mailto:yu.bulatova@mail.ru)

Ким Людмила Викторовна — к. м. н., врач акушер-гинеколог ФГБУ ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 9521-4596. E-mail: [kimika@list.ru](mailto:kimika@list.ru)

Парсаданян Нанэ Геворковна — к. м. н., врач акушер-гинеколог ФГБУ ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: [n\\_parsadanyan@oparina4.ru](mailto:n_parsadanyan@oparina4.ru)

Шубина Екатерина Сергеевна — заведующая лабораторией анализа геномных данных ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 7994-9637. E-mail: [jekaterina.shubina@gmail.com](mailto:jekaterina.shubina@gmail.com)

Гольцов Андрей Юрьевич — научный сотрудник Института репродуктивной генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 5549-1320. E-mail: [andrey.goltsov@gmail.com](mailto:andrey.goltsov@gmail.com)

Трофимов Дмитрий Юрьевич — д. б. н., профессор РАН, руководитель Института репродуктивной генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 3067-2804. <https://orcid.org/0000-0002-7179-5985> E-mail: [d\\_trofimov@oparina4.ru](mailto:d_trofimov@oparina4.ru)

(Окончание. Начало см. на с. 19.)

необходимость выполнения НИПС именно у женщин, получающих лечение НМГ.

**Цель исследования:** оценка влияния терапии НМГ на проведение НИПС хромосомной патологии плода.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 162 женщины в сроках от 10 до 25 недель беременности, у которых был проведен НИПС за период с 01.01.2019 г. по 31.03.2021 г. Протокол исследования одобрен Комиссией по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. До включения в исследование у всех участниц получено письменное информированное согласие.

Всего за указанное время в лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России НИПС выполнили 1505 пациенткам. Из них нами выбраны 49 беременных с низкой фракцией плодовой ДНК (менее 4%), составивших I группу исследования. Низкая фракция плодовой ДНК подтверждалась при повторном заборе крови получением аналогичных данных, в противном случае пациентки в исследование не включались. Среди участниц I группы 17 получали НМГ и 32 не получали.

Беременные с нормальной фракцией плодовой ДНК — II группа (n = 113) — выбраны произвольно из общей базы данных. Среди них 56 женщин принимали НМГ и 57 их не принимали.

Для определения доли плодовой ДНК осуществлялась амплификация локусов ДНК с однонуклеотидными полиморфизмами, оба аллеля которых встречаются примерно с равной частотой. Амплификация производилась мультиплексно, т. е. все локусы ДНК амплифицировались одновременно в одной пробирке с применением 53 специфических пар олигонуклеотидов (праймеров). В качестве субстрата для амплификации служила внеклеточная ДНК, выделенная из плазмы.

НИПС проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing) на приборах Ion Proton или Ion S5 (Thermo Fisher Scientific, США). Для каждого образца готовили два варианта библиотек для секвенирования: библиотеки для секвенирования внеклеточной ДНК и библиотеки для таргетного секвенирования частотных однонуклеотидных полиморфизмов. Приготовление библиотек для высокопроизводительного секвенирования ДНК осуществляли без этапа разрушения (шеринга) первоначальной ДНК, поскольку свободно циркулирующая ДНК в значительной степени фрагментирована.

Статистическая обработка материала проводилась с помощью пакетов программ IBM SPSS Statistics (версия 23). Нормальность распределения значений в выборках определяли с использованием тестов Колмогорова — Смирнова и Шапиро — Уилка. При нормальном распределении количественные данные представляли как среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD). При распределении, не соответствующем нормальному, данные представляли медианой (Me) с 95%-ным ДИ, минимальным и максимальным значениями. Статистическую значимость различий между частотными показателями оценивали с помощью  $\chi^2$ -теста, между непрерывными величинами — с помощью U-теста Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Доля беременных с низкой фракцией плодовой ДНК — 3,2% от числа всех протестированных пациенток (49 из 1505).

Сроки забора крови для определения плодовой ДНК значимо не различались и составили  $13,8 \pm 2,2$  нед в I группе и  $13,9 \pm 2,4$  нед во II группе ( $p = 0,9$ ). Большинство женщин проходили НИПС по собственному желанию, настаивая на выполнении более точного скринингового обследования, исходя из отягощенного акушерского анамнеза и осложненного течения данной беременности. Необходимо отметить, что у женщин с предшествующим бесплодием, привычным выкидышем чаще отмечаются отклонения в биохимических маркерах комбинированного скрининга I триместра, что повышает тревогу будущих родителей.

Лечение НМГ проводилось по следующим показаниям: тромбофилия высокого риска, тромботические осложнения в анамнезе, наличие потерь беременности в анамнезе после 22 недель, раннее развитие и тяжелое течение преэклампсии и задержки роста плода в исходе предыдущих беременностей.

Доля плодовой ДНК во II группе колебалась от 4% до 25,2%. Проанализированы два клинических наблюдения с экстремально высоким уровнем плодовой ДНК (превышающим 25%). В одном случае беременность у женщины с привычным выкидышем сопровождалась неоднократными кровотечениями на сроках беременности до 22 недель и закончилась преждевременными родами. Второе клиническое наблюдение представляет больший интерес в связи с неясным генезом неоднократных потерь беременности при развитии раннего маловодия, ранней задержки роста плода с последующим прерыванием беременности с нормальным кариотипом до 22 недель. Подобный исход наблюдался у женщины 5 раз, включая текущую беременность. Полученные данные позволяют предположить, что крайне высокие показатели плодовой ДНК могут служить маркером развития плацента-ассоциированных осложнений беременности.

Проанализированы значения низкой фракции плодовой ДНК в I группе, которые колебались от 1,2% до 3,9%.

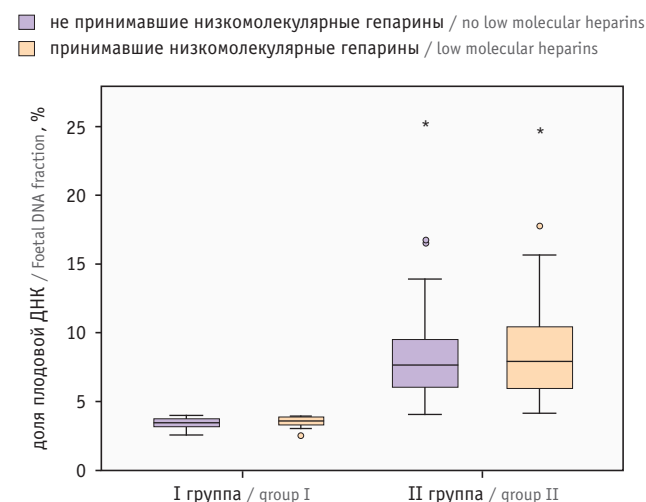
Уровни плодовой ДНК у женщин, получавших и не получавших терапию НМГ, представлены на рисунке.

Рис. Доля плодовой ДНК у обследованных пациенток.

\* Отличия от I группы статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Fig Foetal DNA fraction in examined patients.

\* Statistically significant differences vs group I ( $p < 0.05$ )



В I группе (с низкой фракцией плодовой ДНК) при отсутствии терапии НМГ медиана значений составила 3,5% (3,2–3,8%), при приеме НМГ — 3,6% (3,4–3,9%), во II группе — 7,7% (6,1–9,5%) и 7,9% (6,0–10,5%) соответственно, значимых различий в обоих случаях не было ( $p = 0,29$  и  $p = 0,7$  соответственно).


Особенностью данного исследования является относительно большое число женщин, получавших терапию НМГ по различным показаниям, прошедших НИПС, — 73 (56 беременных с нормальной фракцией и 17 с низкой фракцией плодовой ДНК).

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сухих Г.Т., Трофимов Д.Ю., Барков И.Ю. и др. Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери методом высокопроизводительного секвенирования. Клинические рекомендации. Акушерство и гинекология. 2016; 6: 1–22. [Sukhikh G.T., Trofimov D.Yu., Barkov I.Yu. et al. Non-invasive prenatal DNA screening of foetal aneuploidies using maternal blood (high throughput sequencing). Clinical recommendations. Obstetrics and Gynaecology. 2016; 6: 1–22. (in Russian)]. DOI: 10.18565/aig.2016.6.recomendations
2. Burns W., Koelper N., Barberio A. et al. The association between anticoagulation therapy, maternal characteristics, and a failed cfDNA test due to a low fetal fraction. Prenatal Diagn. 2017; 37(11): 1125–9. DOI: 10.1002/pd.5152
3. Ma G.-C., Wu W.-J., Lee M.-H. et al. Low-molecular-weight heparin associated with reduced fetal fraction and subsequent false-negative cell-free DNA test result for trisomy. Ultrasound Obstet. Gynecol. 2018; 51(2): 276–7. DOI: 10.1002/uog.17473
4. Hui L., Bianchi D.W. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: what clinicians need to know. Prenat. Diagn. 2020; 40(2): 155–63. DOI: 10.1002/pd.5620

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании показано, что лечение низкомолекулярными гепаринами (НМГ) не оказывает воздействия на долю плодовой ДНК в крови беременной при проведении неинвазивного пренатального ДНК-скрининга (НИПС). Следовательно, отсутствует необходимость отменять НМГ перед проведением НИПС либо воздерживаться от назначения НМГ до его выполнения. Необходимы дальнейшие исследования для определения факторов, приводящих к низкой доле плодовой ДНК в периферической крови беременных.

5. Guy G.P., Hargrave J., Dunn R. et al.; SAFE test collaborative. Secondary non-invasive prenatal screening for fetal trisomy: an effectiveness study in a public health setting. BJOG. 2021; 128(2): 440–6. DOI: 10.1111/1471-0528.16464
6. Grömminger S., Erkan S., Schöck U. et al. The influence of low molecular weight heparin medication on plasma DNA in pregnant women. Prenat. Diagn. 2015; 35(11): 1155–7. DOI: 10.1002/pd.4668
7. Dabi Y., Guterman S., Jani J.C. et al. Autoimmune disorders but not heparin are associated with cell-free fetal DNA test failure. J. Transl. Med. 2018; 16(1): 335. DOI: 10.1186/s12967-018-1705-2
8. Nakamura N., Sasaki A., Mikami M. et al. Nonreportable rates and cell-free DNA profiles in noninvasive prenatal testing among women with heparin treatment. Prenat. Diagn. 2020; 40(7): 838–45. DOI: 10.1002/pd.5695
9. Liu S., Liu H., Liu J. et al. Follow-up in patients with non-invasive prenatal screening failures: a reflection on the choice of further prenatal diagnosis. Front. Genet. 2021; 12: 666648. DOI: 10.3389/fgene.2021.666648
10. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Reducing the risk of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium. Green-top Guideline No. 37a. April 2015. 

Поступила / Received: 03.09.2021

Принята к публикации / Accepted: 13.09.2021