

ارزیابی ارزش تشخیصی ردیابی DNA آزاد جنینی در پلاسمای مادری جهت بررسی نارسایی های جنینی

• دکتر صدیقه شریف زاده

دکترای علوم آزمایشگاهی، دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات

علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاه، دانشکده پیراپزشکی،

دانشگاه علوم پزشکی شیراز

sharifsd@sums.ac.ir

• زینب کشاورز

کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی

دانشگاه علوم پزشکی شیراز



خلاصه

در این مقاله سعی شده است جنبه‌های مختلف DNA آزاد جنینی در خون مادر از جمله منشأ، اندازه و درصد آن در خون مادر بررسی شود. درصد کمی از DNA استخراج شده از پلاسمای مادر منشأ جنینی دارد که مهم ترین مانع در استفاده از DNA آزاد جنینی در خون مادر برای تشخیص قبل از زایمان است. پس از کشف DNA آزاد جنینی در خون مادر، محققان زیادی سعی در راه اندازی روش‌های دقیق استخراج و ردیابی DNA جنینی از پلاسمای مادر کردند و اکنون استفاده از DNA آزاد جنینی در خون مادر

برای تشخیص غیر تهاجمی قبل از زایمان آینده روشنی را انتظار می‌کشد.

کلمات کلیدی: DNA آزاد جنینی، تشخیص قبل از زایمان، پلاسمای مادری

پیش زمینه

مراقبت‌ها و تشخیص‌های قبل از زایمان (prenatal screening and prenatal diagnosis) نقش مهمی در مدیریت حاملگی‌ها توسط پزشکان را دارد و این فرصت را به والدین می‌دهد که در صورت وجود ناهنجاری شدید جنین، تصمیم مناسب پیرامون ادامه دادن یا



خاتمه حاملگی بگیرند. روش‌های متفاوتی برای اطمینان از وضعیت سلامتی جنین به کار می‌رود.

روش‌های تهاجمی تشخیص قبل از زایمان

دو روش معمول برای انجام تست‌های تشخیص قبل از زایمان آمنیوسنتز (amniocentesis) و نمونه‌گیری از پرزهای کوریونی (CVS:chorionic villous sampling) است. آمنیوسنتز قبل از هفته ۱۵ حاملگی انجام می‌شود و طی آن یک سوزن از طریق دیواره شکم وارد رحم شده و مقداری از مایع آمنیوتیک به عنوان نمونه جهت بررسی خارج می‌شود. با انجام آمنیوسنتز احتمال سقط جنین نسبت به یک حاملگی طبیعی ۱٪ افزایش می‌یابد. نمونه‌گیری از پرزهای کوریونی بین هفته‌های ۱۱-۱۴ حاملگی انجام می‌گیرد و طی آن سلول‌های بافت جفت جهت بررسی خارج می‌شود. احتمال سقط بعد از انجام کوریوسنتز بیشتر و حدود ۲-۱٪ بیشتر از حالت نرمال است. (۴-۱)

تشخیص غیر تهاجمی قبل از زایمان

روش‌های تهاجمی تشخیص قبل از زایمان تا قبل از هفته ۱۱ حاملگی قابل انجام نیست و اگرچه کوریوسنتز در سه ماه اول حاملگی قابل انجام است ولی با افزایش خطر سقط جنین همراه است (۷-۵). خطرات روش‌های تهاجمی قبل از زایمان برای مادر و جنین، راه‌اندازی یک روش ایمن و دقیق را برای تشخیص غیر تهاجمی قبل از زایمان ضروری می‌کند. اساس این روش‌ها بر ردیابی ماده ژنتیکی جنینی در جریان خون مادر استوار است (۸).

DNA آزاد جنینی در خون مادر

برخلاف عقیده غالب که تصور می‌شود جفت مانند یک سد بین جریان خون مادر و جنین عمل می‌کند، Lo et al. (۱۹۹۶) در مطالعه خود جابه‌جایی دو طرفه سلول و اجزای آن را بین جریان خون مادر و جنین نشان داد. (۹) مطالعات بعدی نشان دادند که سلول‌های جنینی، DNA آزاد جنینی می‌توانند از جفت عبور کرده و وارد جریان خون مادر شوند. (۱۰، ۱۱)

سه دیدگاه درباره منشأ DNA آزاد جنینی در خون مادر وجود دارد: بافت جفت، سلول‌های جنینی و انتقال مستقیم DNA جنینی به خون مادر است. (۱۲) هر چند

شواهد نشان می‌دهد که سلول‌های تروفوبلاست جنینی با بیشترین احتمال منبع DNA آزاد جنینی در خون مادر است. بعضی از این دلایل شامل ناپدید شدن سریع DNA جنینی از خون مادر پس از زایمان و خروج جفت (۱۳) قابلیت ردیابی DNA آزاد جنینی در خون مادر در هفته‌های اول حاملگی و قبل از تشکیل جریان خون جنینی - جفتی (۱۴) ردیابی DNA آزاد جنینی در حاملگی‌های بدون جنین (an embryonic pregnancy) که فقط کیسه آمنیون و سلول‌های تروفوبلاست وجود دارد (۱۲، ۱۵).

بخش زیادی از DNA آزاد جنینی در جریان خون مادر، منشأ مادری دارد و تنها ۱۰-۵٪ از آن مربوط به جنین است. میزان DNA آزاد جنینی در افراد مختلف متفاوت است که به تفاوت‌های بیولوژیک افراد مربوط است. DNA آزاد جنینی تقریباً از هفته هفتم حاملگی قابل تشخیص است. با افزایش سن حاملگی میزان آن افزایش می‌یابد. متوسط نیمه عمر آن در خون مادر ۱۶ دقیقه (۳۰-۴) است و به همین دلیل ۲ ساعت پس از زایمان از خون مادر قابل ردیابی نیست. نیمه عمر کوتاه DNA آزاد جنینی نشان می‌دهد که DNA جنینی به صورت دائم وارد خون مادر می‌شود و می‌تواند منبع خوبی برای انجام تست‌های تشخیص غیر تهاجمی قبل از زایمان باشد (۸، ۱۸-۱۶).

کاربردهای بالینی استفاده از cfDNA

تشخیص زود هنگام جنسیت جنین: تشخیص زود هنگام جنسیت جنین برای بررسی وضعیت سلامتی جنین از نظر بیماری‌های وابسته به جنس و زنانی که در معرض داشتن نوزاد با بیماری‌های پلاپلازی مادر زادی آدرنال هستند از نظر بالینی سودمند است. همچنان که قبلاً ذکر شد تکنیک‌های تهاجمی تشخیص قبل از زایمان تا هفته ۱۱ قابل انجام نیست و از طرفی دیگر باعث افزایش خطر سقط جنین می‌شود. تکنیک‌های معمول اولتراسونوگرافی در طول سه ماهه اول حاملگی به دلیل تکامل نا کامل قسمت‌های خارجی دستگاه تناسلی جنین قابل اعتماد نیست. با استفاده از cfDNA، بخش‌هایی از کروموزوم Y (DYS14 و SRY) در خون مادر ردیابی و جنسیت جنین تشخیص داده می‌شود. (۲۱-۱۹)

تعیین وضعیت RhD جنین: آنتی ژن‌های Rh بر سطح



گلوبول‌های قرمز خون قرار دارند. آنتی ژن‌های مهم این گروه شامل E، D، c، C و e است ولی آنتی ژن D از نظر بالینی دارای اهمیت ویژه است. در زنان حامله RhD منفی که نوزاد با وضعیت RhD مثبت حمل می‌کنند، احتمال ورود آنتی ژن‌های جنینی به خون مادر و تولید آنتی بادی علیه آن‌ها وجود دارد. این آنتی بادی‌ها که از کلاس IgG هستند از جفت عبور می‌کنند و گلوبول‌های قرمز جنینی را تخریب می‌کنند. بیماری همولیتیک جنینی _ نوزادی (Hemolytic disease of the fetus and newborn) در نتیجه همولیز گلوبول‌ها ایجاد می‌شود. برای جلوگیری از این وضعیت در مادران RhD منفی، آنتی بادی‌های ضد آنتی ژن D (anti D immunoglobulin) در هفته ۲۸ حاملگی و یک دوز نیز تا ۷۲ ساعت پس از زایمان تزریق می‌شود. Anti D immunoglobulin سطح آنتی ژن‌های جنینی را می‌پوشاند و از حساس شدن سیستم ایمنی مادر نسبت به این آنتی ژن‌ها جلوگیری می‌کند. به کار بردن cffDNA برای تعیین وضعیت RhD جنین در مادران RhD منفی از نظر بالینی دارای اهمیت است به این دلیل که از تزریق غیر ضروری anti D immunoglobulin جلوگیری می‌شود. در واقع تنها ۴۰٪ از مادران RhD منفی، نوزادان RhD مثبت حمل می‌کنند و نیاز به تزریق anti D immunoglobulin دارند (۲۶-۲۲). کاربرد دیگر در مادرانی است که آنتی D در بدن آن‌ها ساخته شده است و هنگام بارداری نیاز به انجام اقدامات تهاجمی برای پیگیری وضعیت همولیز گلوبول‌های قرمز در جنین می‌باشد. در این شرایط چنانچه با تعیین ژنوتیپ و تجسس آگزون‌های موجود در ژن RHD، جنین فاقد آگزون‌های مرتبط و در نتیجه اره‌اش منفی تشخیص داده شود نیاز به پیگیری‌های بعدی نمی‌باشد.

تشخیص زود هنگام پره اکلامسی (Preeclampsia)
همچنانکه که قبلاً بیان شد مهم ترین منبع cffDNA بافت جفت است. مشکلات مربوط به حاملگی که در ارتباط با رشد غیر طبیعی جفت است با افزایش غیر طبیعی سطح cffDNA در خون مادر همراه است. پره اکلامسی یکی از عوارض حاملگی است که با افزایش فشار خون مادر (hypertension) و افزایش سطح پروتئین ادرار (proteinuria) بعد از هفته ۲۰ حاملگی شناخته می‌شود. پره اکلامسی در کشورهای توسعه یافته ۵-۲٪ و در کشورهای در حال توسعه و با امکانات ناکافی حدود ۱۰٪ از کل حاملگی‌ها را شامل می‌شود. در صورت عدم تشخیص به موقع، پره اکلامسی باعث افزایش ناخوشی (morbidity) و مرگ و میر (mortality) مادر و جنین می‌شود. در نتیجه نیاز به یک روش مطمئن و ارزان جهت بررسی زنان در معرض خطر در اوایل حاملگی احساس می‌شود (۸، ۲۷). برای اولین بار Lo et al (۱۹۹۹) غلظت cffDNA را در زنان حامله با تشخیص بالینی حاملگی و زنان باردار طبیعی مقایسه کرد و نتایج بررسی او افزایش غلظت ۵ برابر cffDNA را در زنان حامله با تشخیص بالینی حاملگی را در مقایسه با زنان باردار طبیعی نشان داد (۲۸).

تشخیص آنیوپلویدی‌های جنینی (Fetal Aneuploidies)
آنیوپلویدی به تعداد غیر طبیعی کروموزوم‌ها اطلاق می‌شود که به صورت تعداد کمتر و یا بیشتر از تعداد طبیعی در سلول‌ها وجود دارد. هرچند بیشتر موارد آنیوپلویدی به سقط خود به خودی منجر می‌شود، در هر ۱۰۰۰ تولد زنده ۹ مورد آنیوپلویدی مشاهده می‌شود (۲۹). به صورت معمول تشخیص قبل از زایمان آنیوپلویدی‌ها مانند تریزومی ۲۱ (trisomy 21) با نمونه گیری از پرزهای جفتی و انجام کاربوتیپ جنینی انجام می‌شود (۳۰). مطالعات اولیه نشان داد که مقدار cffDNA در خون مادر وقتی جنین مبتلا به تریزومی ۲۱ و تریزومی ۱۳ باشد افزایش می‌یابد (۳۱) ولی این افزایش در تریزومی ۱۸ مشاهده نمی‌شود (۳۲). به کار بردن cffDNA برای تشخیص قبل از زایمان آنیوپلویدی‌ها با چالش‌هایی همراه بوده است. یکی از این مشکلات مربوط به غلظت بالای DNA آزاد مادری در مقایسه با غلظت DNA آزاد جنینی در خون مادر است. راه حل پیشنهادی برای غلبه بر این مشکل، ردیابی مولکول‌های نوکلئیک اسید اختصاصی جنین در پلاسمای مادر است. این مولکول‌ها شامل مولکول‌های نوکلئیک اسید با منشأ جفتی و یا مارکرهای اپی ژنتیک اختصاصی جفت است (۳۳-۳۵). دو تکنولوژی پیشرفته جدید که به سرعت در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد شامل digital PCR و massively parallel sequencing می‌باشند. dPCR

گلوبول‌های قرمز خون قرار دارند. آنتی ژن‌های مهم این گروه شامل E، D، c، C و e است ولی آنتی ژن D از نظر بالینی دارای اهمیت ویژه است. در زنان حامله RhD منفی که نوزاد با وضعیت RhD مثبت حمل می‌کنند، احتمال ورود آنتی ژن‌های جنینی به خون مادر و تولید آنتی بادی علیه آن‌ها وجود دارد. این آنتی بادی‌ها که از کلاس IgG هستند از جفت عبور می‌کنند و گلوبول‌های قرمز جنینی را تخریب می‌کنند. بیماری همولیتیک جنینی _ نوزادی (Hemolytic disease of the fetus and newborn) در نتیجه همولیز گلوبول‌ها ایجاد می‌شود. برای جلوگیری از این وضعیت در مادران RhD منفی، آنتی بادی‌های ضد آنتی ژن D (anti D immunoglobulin) در هفته ۲۸ حاملگی و یک دوز نیز تا ۷۲ ساعت پس از زایمان تزریق می‌شود. Anti D immunoglobulin سطح آنتی ژن‌های جنینی را می‌پوشاند و از حساس شدن سیستم ایمنی مادر نسبت به این آنتی ژن‌ها جلوگیری می‌کند. به کار بردن cffDNA برای تعیین وضعیت RhD جنین در مادران RhD منفی از نظر بالینی دارای اهمیت است به این دلیل که از تزریق غیر ضروری anti D immunoglobulin جلوگیری می‌شود. در واقع تنها ۴۰٪ از مادران RhD منفی، نوزادان RhD مثبت حمل می‌کنند و نیاز به تزریق anti D immunoglobulin دارند (۲۶-۲۲). کاربرد دیگر در مادرانی است که آنتی D در بدن آن‌ها ساخته شده است و هنگام بارداری نیاز به انجام اقدامات تهاجمی برای پیگیری وضعیت همولیز گلوبول‌های قرمز در جنین می‌باشد. در این شرایط چنانچه با تعیین ژنوتیپ و تجسس آگزون‌های موجود در ژن RHD، جنین فاقد آگزون‌های مرتبط و در نتیجه اره‌اش منفی تشخیص داده شود نیاز به پیگیری‌های بعدی نمی‌باشد.

تشخیص زود هنگام پره اکلامسی (Preeclampsia)
همچنانکه که قبلاً بیان شد مهم ترین منبع cffDNA بافت جفت است. مشکلات مربوط به حاملگی که در ارتباط با رشد غیر طبیعی جفت است با افزایش غیر طبیعی سطح cffDNA در خون مادر همراه است. پره اکلامسی یکی از عوارض حاملگی است که با افزایش فشار خون مادر (hypertension) و افزایش سطح پروتئین ادرار

تهاجمی قبل از زایمان آنیوپلوئیدی‌های جنینی به کار برده می‌شود (۳۶).

نتیجه گیری

تشخیص قبل از تولد بیماری‌های ژنتیکی و غربال آنیوپلوئیدی‌ها در مدیریت بارداری و فراهم کردن فرصت تصمیم جهت زوجین اهمیت بسیار زیادی دارد. آنالیز نوکلئیک اسید جنین در پلاسمای مادر نقش اساسی در ایجاد روش‌های تشخیصی غیر تهاجمی بدون خطر برای باردار و جنین می‌باشد. از طرفی این روش‌ها قیمت تمام شده برای اقدامات تهاجمی غیر ضروری را کاهش خواهد داد. تا کنون روش‌های غیر تهاجمی برای بیماری‌های ژنتیکی مندلی به صورت روتین در کلینیک مورد استفاده قرار نگرفته است. اگر چه تلاش‌های وسیعی توسط محققین جهت شناسایی بیماری‌هایی چون تالاسمی در حال انجام است ولی تشخیص آنیوپلوئیدی‌ها در برخی آزمایشگاه‌ها با استفاده از تکنولوژی‌های جدید در حال انجام است. البته لازم به ذکر است که کاربرد این آزمون‌ها باید با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی، اجتماعی و قانونی انجام پذیرفته و نیاز به طراحی الگوریتم‌های خاص در این رابطه وجود دارد.

روش جدیدی برای تجسس اسیدهای نوکلئیک و تعیین کمیت آنان است. در این روش یک مولکول میلیون‌ها برابر افزایش یافته و با استفاده از پروب نشاندار شده با رنگ، توالی‌های هدف قابل رد یابی است. این روش جایگزین مناسبی برای *real time PCR* از بعد حساسیت و تعیین کمیت محسوب می‌شود. متوسط غلظت *DNA* جنینی در پلاسمای مادران در سه ماهه اول و دوم حاملگی با استفاده از *real time PCR* حدود ۳ درصد و این نسبت با استفاده از *dPCR* حدود ۱۰ درصد است. در واقع این روش جایگزین مناسبی برای *real time PCR* از بعد حساسیت و تعیین کمیت محسوب می‌شود و کاربرد آن برای تشخیص آنیوپلوئیدی‌ها به جنسیت و یا توزیع الی وابسته نیست. تکنولوژی دوم (*MPS*) نیز در حال حاضر در دسترس و قادر به تعیین توالی مولکول‌های *DNA* در پلاسمای مادر و مقایسه با یک توالی ژنوم مرجع انسانی می‌باشد. برای مثال در بارداری تریزومی ۲۱ تعداد مولکول‌های به دست آمده از کروموزوم ۲۱ در مقایسه با حالت طبیعی افزایش نشان می‌دهد. هم‌اکنون *MPS* در آزمایشگاه‌های تشخیص بالینی کشور آمریکا و بخشی از کشورهای آسیایی جهت تشخیص غیر

References

- 1- Mujezinovic, F., & Alfiric, Z. (2007). Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villus sampling: A systematic review. *Obstetrics and Gynecology*, 2(110), 678–694.
- 2- Midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis. Safety and accuracy. *JAMA*, 1976;236:1471–6.
- 3- Rhoads GG, Jackson LG, Schlesselman SE, et al. The safety and efficacy of chorionic villus sampling for early prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities. *N Engl J Med*, 1989;320:609–17.
- 4- Eddleman KA, Malone FD, Sullivan L, et al. Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis. *Obstet Gynecol*, 2006;108:1067–72.
- 5- BombardA, Akolekar R, Farkas D, et al. Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negativewomen. *PrenatDiagn* 2011;31: 802–808.
- 6- Swanson A, Sehnert A, Bhatt S. *Non-invasive Prenatal Testing: Technologies, Clinical Assays and Implementation Strategies*



for Women's Healthcare Practitioners. *Curr Genet Med Rep* 2013;1:113–121.

7- Shahbazian N, Barati M, Arian P, et al. Comparison of Complications of Chorionic Villus Sampling and Amniocentesis. *Int J FertilSteril* 2012;5(4):241-244.

8- Wright, C., & Burton, H. (2009). The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human Reproduction Update*, 15(1), 139-151.

9- Lo, Y. M. D., Lo, E. S., Watson, N., Noakes, L., Sargent, I. L., Thilaganathan, B., & Wainscoat, J. S. (1996). Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood*, 88 (11), 4390-4395.

10- Babochkina, T., Mergenthaler, S., De Napoli, G., Hristoskova, S., Tercanli, S., Holzgreve, W., & Hahn, S. (2005). Numerous erythroblasts in maternal blood are impervious to fluorescent in situ hybridization analysis, a feature related to a dense compact nucleus with apoptotic character. *Haematologica*, 90(6), 740-745.

11- Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Weil, G. J., Sylvester, S., & DeMaria, M. A. (1996). Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(2), 705–708.

12- Alberry, M. S., & Soothill, P. W. (2008). Non-invasive prenatal diagnosis: Implications for antenatal diagnosis and management of high-risk pregnancies. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 13(2), 84-90.

13- Lo, Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M., & Hjelm, N. M. (1999c). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *American Journal of Human Genetics*, 64(1), 218–224.

14- Rijnders, R.J., Van Der Loo, R.B., Peters, E.D., Goeree, J.K., Van Der Schoot, C.E., Ploos Van Amstel, J.K., & Christiaens, G.C. (2003). Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenatal Diagnosis*, 23, 1042–1044.

15- Alberry, M., Maddocks, D., Jones, M., Abdel Hadi, M., Abdel-Fattah, S., Avent, N., & Soothill, P. W. (2007). Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: Confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal Diagnosis*, 27(5), 415-418.

16- Birch, L., English, C. A., O'Donoghue, K., Barigye, O., Fisk, N. M., & Keer, J. T. (2005). Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clinical Chemistry*, 51(2), 312-320.

17- Redman, C. W. G. & Sargent, I. L. (2003). Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response—A review. *Placenta*, 2, S21-S27.

18- Bianchi, D. W., Maron, J. L., & Johnson, K. L. (2010). Insights into fetal and neonatal development through analysis of cell-free RNA in body fluids. *Early Human Development*, 86(11), 747-752.

19- Hill, M., Finning, K., Martin, P., Hogg, J., Meaney, C., Norbury, G., Daniels, G., & Chitty, L. (2010). Non-invasive prenatal determination of fetal sex: Translating research into clinical practice. *Clinical Genetics*, 19(10), 1399-0004.

20- Scheffer, P. G., van der Schoot, C. E., Page-Christiaens, G. C., Bossers, B., van Erp, F., de Haas, M. (2010). Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. *Obstetrics & Gynecology*, 115(1), 117-126.

21- Bustamante-Aragones, A. C., Gonzalez-Gonzalez, C., Rodriguez de Alba, M., Ainsé, E., & Ramos, C. (2010). Noninvasive prenatal diagnosis using cfDNA in maternal blood: State of the art. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(2), 197-205.

22- Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transplant immunology*. 2005;14(3):143-53.

23- Chinen, P. A., Nardoza, L. M. M., Martinhago, C. D., Camano, L., Daher, S., da Silva Pares, D. B., Minett, T., Júnior, E. A., & Moron, A. F. (2010). Noninvasive determination of fetal Rh blood group, D antigen status by cell-free DNA analysis in maternal plasma: Experience in a Brazilian population. *American Journal of Perinatology*, 27(10), 759-762.

24- Kaushansky, K., Reid, M. E., Lichtman, M. A., Kipps, T. J., Seligsohn, U., & Prchal, J. T. (2010). *Williams Hematology* (8th ed.). McGraw-Hill Professional Pub.

25- Peterec, S. M. (1995). Management of neonatal Rh disease. *Clinical Perinatology*, 22, 561–592.

26- Pilgrim, H., Lloyd-Jones, M., & Rees, A. (2007). Routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD negative women. *Health technology Assessment*.

27- Hahn, S., Rusterholz, C., Hosli, I., Lapaire, O. (2011). Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta*, 32, 17-20.

- 28- Lo, Y. M. D., Leung, T. N., Tein, M. S., Sargent, I. L., Zhang, J., Lau, T. K., Haines, C. J., Redman, C. W. G. (1999b). Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clinical Chemistry*, 45(2), 184-188.
- 29- Maddocks, D. G., Alberry, M.S., Attilakos, G., Madgett, T. E., Choi, K., Soothill, P. W., & Avent, N. D. (2009). The SAFE project: towards non-invasive prenatal diagnosis. *Biochemical Society Transactions*, 37, 460-465.
- 30- Fan, H. C., & Quake, S. R. (2010). Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics. *PLoS ONE*, 5(5), e10439.
- 31- Lo, Y. M. D., Lau, T. K., Zhang, J., Leung, T. N., Chang, A. M., Hjelm, N. M., et al. (1999a). Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clinical Chemistry*, 45, 1747-1751.
- 32- Wataganara, T., LeShane, E. S., Farina, A., Messerlian, G. M., Lee, T., Canick, J. A., et al. (2003). Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Human Genetics*, 112, 204-208.
- 33- Chan, K. C. A., Ding, C., Gerovassili, A., Yeung S. W., Chiu, R. W. K., Leung, T. N., Lo, Y. M. D. (2006). Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clinical Chemistry*, 52(12), 2211-2218.
- 34- Chim, S. S. C., Y. K. Tong, Chiu, R. W. K., Lau, T. K., Leung, T. N., Chan, L. Y. S., Oudejans, C. B. M., Ding, C., & Lo, Y. M. D. (2005). Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14753-14758.
- 35- Ferrari, M., Cerrera, P., Lampasona, Galbiati S. (2015). New trends in non invasive prenatal diagnosis. *Clinica Chimica Acta*.
- 36- Lo Y, Shing L (2012). Non-invasive prenatal diagnosis by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA.

