

# РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК



## ПРЕДИКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ В РЕПРОДУКТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

МОСКВА - 2016

# РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК



**ФОРТОВ**  
**ВЛАДИМИР ЕВГЕНЬЕВИЧ,**  
ПРЕЗИДЕНТ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Приоритетным направлением государственной политики в сфере здравоохранения является улучшение демографической ситуации в стране, создание условий для повышения качества и доступности медицинской помощи населению. Стратегия развития медицинской науки направлена, в том числе, на создание высокотехнологичных инновационных продуктов и их интеграцию в практическое здравоохранение, что поможет приблизиться к решению ряда важнейших задач в медицине, снизит

частоту социально-значимых заболеваний, таких как врожденные пороки развития, онкологические заболевания. Мы сейчас находимся в самом начале пути по решению этих глобальных задач.

Стремительные темпы развития молекулярной генетики способствуют развитию предиктивной медицины, что помогает радикально изменить подходы к методам диагностики и лечения. Благодаря внедрению молекулярно-генетических методов в репродуктологию был сделан шаг вперед – использование вспомогательных репродуктивных технологий с целью предотвращения рождения ребенка с врожденной наследственной патологией, и рядом других серьезных заболеваний, включая онкологические. Современная медицина вплотную подошла к вопросам междисциплинарного подхода к лечению пациентов с онкологическими заболеваниями: благодаря молекулярно-генетическим методам совместные усилия генетиков, онкологов и репродуктологов смогут помочь молодым пациентам стать родителями после проведения противоопухолевого лечения.

Дальнейшее развитие предиктивной медицины будет способствовать выявлению предрасположенности к заболеваниям на геномном уровне, своевременной диагностике патологических состояний, приведет к снижению заболеваемости, улучшению демографической ситуации и здоровья нации в целом.

С уважением,

Президент РАН,  
академик В.Е. Фортвов

**РЕПРОДУКТИВНАЯ  
МЕДИЦИНА:  
РАЗРАБОТКА И  
ВНЕДРЕНИЕ РАННИХ  
ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ  
МЕРОПРИЯТИЙ,  
ПОЗВОЛЯЮЩИХ  
ПРЕДУПРЕДИТЬ  
НАСТУПЛЕНИЕ  
БЕРЕМЕННОСТИ  
ПЛОДОМ С  
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ПАТОЛОГИЕЙ И  
РОЖДЕНИЕ РЕБЕНКА  
С ВРОЖДЕННОЙ  
НАСЛЕДСТВЕННОЙ  
ПАТОЛОГИЕЙ**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

АННОТАЦИЯ.....	2
РАЗДЕЛ 1. ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА .....	3
1.1. Неинвазивная пренатальная диагностика .....	3
1.2. Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД).....	6
1.3. Метод высокопроизводительного секвенирования (NGS): преимплантационный генетический скрининг .....	8
РАЗДЕЛ 2. ПРЕИМПЛАНТАЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ СИНДРОМОВ .....	10
РАЗДЕЛ 3. ОНКОФЕРТИЛЬНОСТЬ.....	13
3.1. Сохранение генетического материала у онкологических больных репродуктивного возраста .....	14
ЛИТЕРАТУРА .....	19
ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ НАУЧНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ .....	21

## АННОТАЦИЯ

Предиктивные технологии являются приоритетным направлением развития медицинской науки XXI века. Предиктивная медицина – это направление медицины, основной целью которой является выявление факторов риска заболевания для предупреждения его развития и лечения на ранних стадиях. На современном этапе главенствующую роль в предупреждении заболеваний отводится генетике, современные возможности которой позволяют оценить риск развития патологических процессов.

Задачами предиктивных технологий в репродуктивной медицине являются разработка и внедрение ранних профилактических мероприятий, позволяющих предупредить наступление беременности плодом с генетической патологией и рождение ребенка с врожденной наследственной патологией, предупредить развитие осложнений беременности.

Диагностика врожденной патологии плода во время беременности является важнейшей задачей в акушерстве и перинатологии. Раньше это было возможно только при помощи ультразвуковых методов диагностики, а так же определенных показателей в биохимическом анализе крови – так называемый комбинированный пренатальный скрининг, проведение которого является обязательным при наблюдении беременных, согласно действующему Порядку оказания медицинской помощи по профилю «Акушерство», утвержденному приказом МЗРФ № 572н. Однако, это не специфический и относительно эффективный метод, который позволяет диагностировать наличие только трех хромосомных заболеваний: синдром Дауна, синдром Эдвардса и синдром Патау. Статистика показывает, что число рожденных детей с вышеуказанными хромосомными заболеваниями в акушерских стационарах г. Москвы не снижается и ежегодно составляет 0,06-0,08% от всех родов. Помимо этого, диагностика ряда хромосомных и генетических заболеваний остается за рамками пренатального скрининга. Все вышеперечисленные факты указывают на необходимость разработки и внедрения новых инновационных методик, и в этой области за последнее время достигнуты большие успехи.

В этой связи развитие предиктивной медицины предполагает внедрение высокотехнологичных медицинских услуг, формирование единой информационной базы, а также тесное взаимодействие научного и практического направлений. Кроме того, необходима поддержка со стороны средств массовой информации для информирования населения о возможностях современной медицины.

## РАЗДЕЛ 1. ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

### 1.1. Неинвазивная пренатальная диагностика

Обнаружение внеклеточной ДНК плода свободно циркулирующей в плазме матери позволило получить новый метод скрининга анеуплоидий плода - неинвазивный пренатальный тест (НИПТ). Поскольку внеклеточная ДНК плода преодолевает гематоплацентарный барьер и попадает в материнский кровоток, то просто взяв кровь у беременной, можно обнаружить хромосому у плода, избежав при этом риска внутриматочного вмешательства, которое необходимо для получения клеток плода на исследование. Концентрация внеклеточной ДНК плода в сыворотке беременной с 9 недель в среднем составляет 10% от общего объема внеклеточной ДНК. Процент фетальной фракции нарастает с увеличением срока беременности.

Исследования показали высокую эффективность неинвазивного пренатального теста в отношении наиболее частых анеуплоидий плода (синдромов Дауна, Эдвардса, Патау, Тернера), которые составляют 95% от всех хромосомных аномалий. Выявляемость трисомии 21 при НИПТ превышает 99% при уровне ложноположительных результатов около 0,1% (рис. 1).

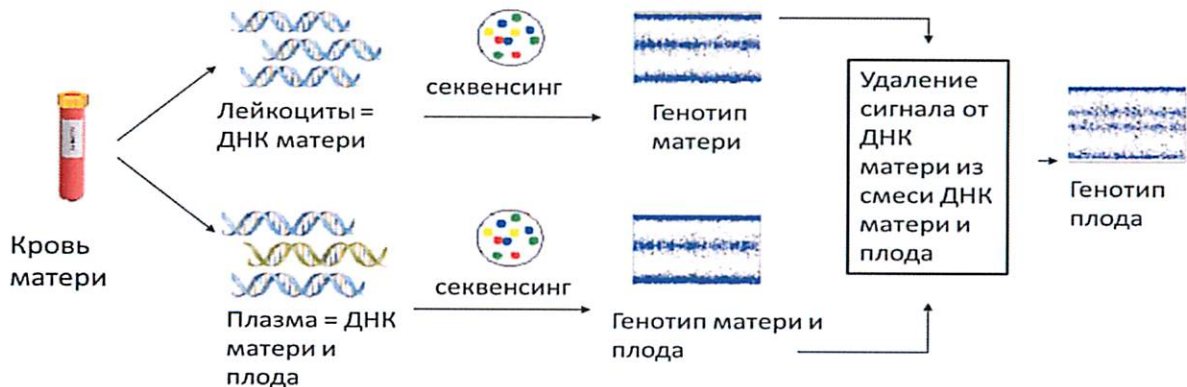


РИСУНОК 1. МЕТОД ТЕСТИРОВАНИЯ КРОВИ МАТЕРИ НА АНЕУПЛОИДИЮ ПЛОДА

Тест «Рапогата» - единственный, при котором специально секвенируют однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и разделяют генотип матери и плода. Для теста может использоваться ДНК отца, выделенная из буккального мазка. Образец, взятый у отца, может быть полезен для ускорения получения ответа и снижения риска перебора крови, на точность результатов отсутствие ДНК отца не влияет.

Исследования, проведенные совместно с академиком К.Г. Скрябиным, показали высокую эффективность НИПТ для диагностики хромосомных заболеваний, что помогло значительно снизить количество инвазивных процедур и устранить связанный с ними риск потери беременности. НИПТ также может быть полезным в качестве второго теста по результатам комбинированного скрининга, основанного на данных ультразвукового и биохимического исследований и возраста матери.

Результаты исследований показали, что анализ свободноциркулирующей внеклеточной ДНК плода в крови матери с использованием таргетного секвенирования SNPs на хромосомах 13, 18, 21, X, и Y является точным методом обнаружения аутомных анеуплоидий, аномалий половых хромосом и триплоидии у плода с 9 недель беременности и может быть рекомендовано всем беременным в качестве высоко эффективного пренатального скрининга.

За период с 2013 по май 2016 г. нами исследовано 4012 образцов крови, содержащей фетальную ДНК. Образцы материнской венозной крови были получены у 2028 пациенток с одноплодной беременностью на сроке от 9 до 24 недель. 1109 из 2028 обследованных сдавали НИПТ в связи с высоким риском анеуплоидии плода по результатам комбинированного пренатального скрининга. В 39 наблюдениях по результатам НИПТ получен высокий риск хромосомной патологии ХП, и 37 беременным для подтверждения диагноза проведена ИПД (две пациентки с высоким риском аномалий по половым хромосомам отказались от инвазивного вмешательства) (таблица 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕНАТАЛЬНОГО КАРИОТИПИРОВАНИЯ СРЕДИ ПАЦИЕНТОК С ВЫСОКИМ РИСКОМ ПО НЕИНВАЗИВНОМУ ПРЕНАТАЛЬНОМУ ТЕСТУ

ТАБЛИЦА 1

Риск по НИПТ	Количество наблюдений	Подтверждены кариотипированием
с. Дауна	28	27
с. Эдвардса	3	2
с. Патау	1	1
полиплоидия	1	69,XXX
с. Тернера	2	2
аномалия X хромосомы	2	del X, XXU
XUU	2	отказ от ИПД
всего	39	35

При исследовании фетальной ДНК с использованием SNPs были правильно идентифицированы 27 случаев трисомии 21, 2 – трисомии 18, 1- трисомии 13, 2 –

моносомии X, 2- аномалии X хромосомы. Пол плода определен правильно во всех случаях. Из 28 пациенток с высоким риском с.Дауна по результатам НИПТ при кариотипировании трисомия 21 хромосомы подтверждена в 27 наблюдениях, отмечен 1 ложноположительный результат. Ложноотрицательных результатов по «Panorama» - тесту нами не было получено. Таким образом чувствительность НИПТ для с.Дауна в нашем исследовании достигла 100%, положительный предсказательный результат для трисомии 21 составил 96,6% при уровне ложноположительных ответов – 0,05%.

РИСК ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ ПО ДАННЫМ НЕИНВАЗИВНОГО ПРЕНАТАЛЬНОГО ТЕСТА (НИПТ) СРЕДИ ПАЦИЕНТОК С ИЗВЕСТНЫМ ИСХОДОМ БЕРЕМЕННОСТИ

ТАБЛИЦА 2

Показания к НИПТ	количество наблюдений	Высокий риск ХА по NIPT	%
возраст >35	364	8	2,2
Высокий риск ХА при биохимическом скрининге	224	8	3,6
Возраст >35 + изменение БМ	282	19	6,7
низкий риск или не проводился биохимический скрининг	334	2	0,6
всего	1204	37	3,1

Беременности, отнесенные к группе высокого риска трисомий 21, 18 и 13 хромосом на основании возраста матери, данных ультразвукового и биохимического исследований сыворотки крови матери, являются причиной, по которой родители принимают решение о инвазивном вмешательстве с целью кариотипирования плода. В нашем исследовании 1239 беременным удалось избежать ИПД, связанной с риском осложнений.

Хотя в большинстве стран скрининг анеуплоидий, по существу, фокусируется на скрининге трисомии 21 хромосомы, инвазивная диагностика в группе с положительными результатами скрининга приводит к обнаружению множества дополнительных клинически значимых анеуплоидий. В данном исследовании были выявлены трисомия 13, 18, моносомия X, с.Клайнфельтера, дисомия Y хромосомы, полиплоидия и микроделеция X хромосомы.

Как показано в данном исследовании, большинство беременностей, при которых комбинированный тест выявил высокий риск трисомии 21, 18 или 13 хромосомы, являются эуплоидными, и в таких случаях, использование анализа фетальной ДНК помогло значительно снизить количество ненужных инвазивных тестов и устранить связанный с ними риск потери беременности. НИПТ также может быть полезным в качестве второго теста по результатам комбинированного

скрининга, основанного на данных ультразвукового и биохимического исследований и возраста матери.

В исследование также были включены беременные с низким риском хромосомной патологии, однако и в этой группе в 2 наблюдениях мы ее выявили при помощи исследования фетальной ДНК. Следовательно, анализ свободноциркулирующей внеклеточной ДНК плода в крови матери с использованием таргетного секвенирования SNPs является точным методом обнаружения аутосомных анеуплоидий, аномалий половых хромосом и триплоидии у плода у всех беременных женщин с 9 недель беременности и может быть рекомендовано в качестве высоко эффективного пренатального скрининга.

## ***1.2. Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД)***

На сегодняшний день показанием для применения методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) являются не только женское и мужское бесплодие, но и различные хромосомные и моногенные заболевания, носительство транслокаций, тяжелая форма гемолитической болезни плода и новорожденного, онкологические заболевания. Преимплантационная генетическая диагностика в мире проводится уже более 20 лет и является передовым и перспективным направлением в клинической практике для исключения рождения генетически больного ребенка при использовании вспомогательных репродуктивных технологий. Суть данной методики заключается в исследовании эмбриона как на хромосомном, так и на генном уровне до момента переноса его в организм матери. В итоге предоставляется возможность перенести единственный здоровый эмбрион в полость матки и родить ребенка без генетических или хромосомных заболеваний у пар, являющимися носителями этих заболеваний. До внедрения ПГД рождение здорового ребенка при носительстве наследственных заболеваний у родителей было невозможно.

Исследование клеток неразвивающегося хориона, полученного в рамках программы ВРТ, показало, что анеуплоидия (аномальное число хромосом) может быть представлена любой из 24 хромосом. Следовательно, для достижения главной цели при применении ВРТ - рождения здорового потомства, необходимо до переноса эмбриона в полость матки исследовать у него максимально возможное количество хромосом.



На сегодняшний день, широко применяемый в лабораториях метод сравнительной геномной гибридизации (CGH) зарекомендовал себя как высокоэффективный метод для оценки хромосомного статуса в единичных клетках эмбриона и стал золотым стандартом. С введением в практику метода витрификации (замораживания) эмбрионов на стадии бластоцисты, биопсию трофэктодермы стали проводить на 5 сутки (рис.2), что дало возможность получить от эмбриона большее количество клеток, а, следовательно, и ДНК.

Однако, многочисленные работы показали, что на стадии доимплантационного развития, в большом проценте эмбрионов наблюдается мозаицизм - наличие в одном организме линий клеток с разным хромосомным набором. Точного ответа, какой процент клона с анеуплоидией, а какой с нормальным хромосомным набором не может дать ни один из существующих на сегодняшний день методов.



РИСУНОК 2. БИОПСИЯ ТРОФЭКТОДЕРМЫ



РИСУНОК 3. ПРИМЕР МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОГО ЭТАПА ПРИ ПГД МУКОВИСЦИДОЗА

Все исследователи и медицинская практика показали, что соотношение нормального и патологичного клонов имеет большое значение для дальнейшего развития эмбриона. То, что перенос эмбрионов без генетической патологии в разы увеличивает уровень имплантации, вынашивания беременности, уже не вызывает ни у кого сомнений. Yang Z. с соавт. в своей работе рекомендует селективно переносить как можно меньше эмбрионов с учетом возраста, анамнеза и проведенных ранее циклов, при этом предварительно проводить ПГС. При переносе только одного эмбриона после ПГС беременность получена в 70,9% случаев.

В Перинатальном медицинском центре ГК «Мать и дитя» выполнено 1209 программ ЭКО с ПГД. Программ у пациентов с бесплодием проведено 1037 (85,8%), у фертильных пациентов – 172 (14,2%). Средний возраст фертильных пациентов пациенты с моногенными заболеваниями, транслокациями, инверсиями, с Rh-сенсibilизацией составил  $32,4 \pm 3,2$  года. В результате родилось 48 здоровых ребенка у пар с моногенными заболеваниями и 14 Rh-отрицательных детей у пар с тяжелой формой гемолитической болезни плода в анамнезе. Так, например, в клинике ГК «Мать и дитя» впервые в России родился здоровый ребенок после применения методов ПГД у пары, где один из родителей является носителем тяжелейшего заболевания – муковисцидоза (рис.3).

### ***1.3. Метод высокопроизводительного секвенирования (NGS): преимплантационный генетический скрининг***

Остается до сих пор открытым вопрос о мозаицизме, незначительных хромосомных перестройках (делеции, дупликации) у эмбрионов. Даже метод сравнительной геномной гибридизации не всегда точно показывает, есть ли у конкретного эмбриона мозаицизм, хромосомные перестройки. Для переноса эмбриона, знание о соотношении клонов имеет принципиальное значение. Применение высокопроизводительного секвенирования (NGS), более четко указывает на наличие мозаицизма у преимплантационных эмбрионов, что позволяет выбрать здоровые эмбрионы для переноса.



К основным этапам NGS можно отнести:

- 1) выделение, получение фрагментов определенной длины ДНК;
- 2) прикрепление адаптеров по краям фрагментов;
- 3) амплификация каждого фрагмента ДНК;
- 4) определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК;
- 5) биоинформатический анализ данных.

РИСУНОК 4. СЕКВЕНАТОР (ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР)

Принцип метода NGS (Next Generation Sequencing), принципиально отличается от других методов ПГС (рис.4). Данный метод основан на определении последовательности нуклеиновых кислот. Для получения результата исследуемую ДНК вначале модифицируют и создают коллекцию случайных фрагментов нужной структуры.

Широкое внедрение в клиническую практику нового метода - NGS позволяет исследовать все 24 хромосомы эмбриона, что в несколько раз повышает частоту имплантации, исключить патологию по всем хромосомам одновременно (рис.5). Секвенирование позволяет четко диагностировать у эмбрионов мозаицизм, дупликации и делеции. Для диагностики используют генетический анализатор - секвенатор нового поколения. ПГД методом NGS позволяет снизить риск многоплодной беременности, выкидышей и тем самым позволяет улучшить эффективность процедур ЭКО в 1,5 раза.

Лаборатория молекулярной генетики ГК «Мать и дитя» единственная в России оснащена оборудованием для проведения метода NGS. С целью выявления уровня анеуплоидии методом высокопроизводительного секвенирования NGS у эмбрионов, полученных в программе ВРТ, нами было проведено исследование клеток трофэктодермы, полученных от эмбрионов в рамках программы ЭКО. Биопсия трофэктодермы проводилась на 5 сутки развития эмбрионов. В исследование было включено 254 эмбриона, полученных от 97 пациенток в возрасте от 22 до 48 лет (средний возраст 37 лет ( $\pm 6,3$  лет)). У 6 женщин было проведено по 2 цикла стимуляции. Все эмбрионы были получены оплодотворением методом ИКСИ. В исследование были взяты супружеские пары с нормальным кариотипом. Применение метода NGS позволило нам улучшить эффективность процедур ЭКО в 1,5 раза.

Преимплантационный генетический скрининг проводили согласно технологии Illumina на приборе Miseq. ДНК из клеток трофэктодермы получали методом полногеномной амплификации. Данные полученные прибором обрабатывали с помощью программного обеспечения BlueFuse Multi. Анализ качества полученной ДНК и наличие контаминации проводился с помощью электрофореза, который показал отсутствие ДНК в присланных контролях и в 5 образцах, что составило 1,96%. Таким образом, в дальнейшее исследование были включены 249 образцов. Детальный анализ результатов показал, что частота встречаемости патологии (моносомия, трисомия, делеции, дупликации, мозаицизм) хромосом 15, 16, 21, 22 была выше по сравнению с другими хромосомами. В расчет не брали эмбрионы с множественными анеуплоидиями.

## РАЗДЕЛ 2. ПРЕИМПЛАНТАЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ СИНДРОМОВ

Так как ПГД позволяет диагностировать у эмбрионов мутации, передаваемые от родителей детям, этот метод можно применять так же у фертильных супружеских пар с высоким риском развития онкологического заболевания у потомства.

Для наследственных форм рака обычно характерны мутации, которые в значительной степени повышают риск развития заболевания - аутосомно-доминантный тип наследования (т. е. носители мутаций в генах могут передать эту мутацию своим детям с вероятностью 50%). Заболевание у носителей мутаций зачастую развивается в молодом возрасте. Также было описано несколько синдромов, характеризующихся аутосомно-рецессивным типом наследования. Только в том случае, если оба родителя являются носителями мутации, вероятность манифестации заболевания у потомства составляет 25%, то есть вероятность рождения здорового ребенка составляет 75%. (таб. 3).

НАИБОЛЕЕ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ СИНДРОМЫ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К  
ОНКОЛОГИЧЕСКИМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

ТАБЛИЦА 3

Синдром	Ген	Фенотипические особенности	Частота в популяции
Синдром наследственного рака молочной железы/яичников	<i>BRCA</i> 1	Рак молочной железы, яичников, толстой кишки у женщин	1 на 500
Синдром наследственного рака молочной железы/яичников	<i>BRCA</i> 2	Рак молочной железы и яичников у женщин/грудной железы у мужчин, рак простаты, рак поджелудочной железы	1 на 1000
Семейный аденоматозный полипоз	<i>APC</i>	Множественные аденоматозные полипы верхних и нижних отделов ЖК тракта, десмоидные опухоли, эпидермоидные кисты и врожденная гипертрофия/гиперплазия пигментного эпителия сетчатки	1 на 5000 — 1 на 10000

Наследственный неполипозный колоректальный рак	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, PMS1</i>	Колоректальный рак, рак эндометрия, рак желудка, мочевыделительной системы, опухоли мозга	1 на 400
Множественная эндокринная гиперплазия тип 1	<i>MEN1</i>	Паратиреоидные аденомы, липомы, энтеропанкреатические опухоли, ангиофибромы лица, гастриномы, коллагеномы, инсулиномы, опухоли передней доли гипофиза	1 на 100000
Множественная эндокринная гиперплазия тип 2	<i>RET</i>	Медуллярный рак щитовидной железы, паратиреоидные аденокарциномы, феохромоцитомы	1 на 30000
Синдром Ли-Фраумени	<i>TP53</i>	Рак молочной железы, саркомы, лейкозы и опухоли мозга	редко
Ювенильный полипозный синдром	<i>SMAD 4, BMPR 1A</i>	Гамартоматозные полипы тонкой кишки, полипы желудка (редко)	1 на 100000

По данным литературы наибольшее количество ПГД выполняется у носителей мутаций в генах *BRCA1/BRCA2*. Для определения мутаций используется метод секвенирования в ДНК клеток периферической крови. Распространенность мутаций *BRCA* в популяции в целом составляет от 1/500 до 1/1000 женщин. Материалом для генетического исследования мутаций в генах могут служить полярные тельца, бластомеры, клетки трофобласта. Диагностики проводились и при дупликациях и при делециях генов. Белки *BRCA1* и *BRCA2* связывают рецептор эстрогенов и репрессирует его транскрипционную функцию, сдерживая избыточную пролиферацию клеток молочной железы и других эстроген-зависимых органов. Наиболее высокий уровень экспрессии гена наблюдается в клетках молочной железы и яичников.

На сегодняшний день, клиническое значение мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* как факторов риска наследственного рака молочной железы и рака яичников хорошо доказано. Считается, что вклад этих наследственных мутаций в общий пул наследственного рака молочной железы составляет около 20 %.

У женщин с мутациями гена *BRCA1* риск развития рака молочной железы составляет около 75% в возрасте до 50 лет, к 70 годам - до 85-90%. Риск развития рака контрлатеральной железы составляет 50% в 50 лет и 65% в 70 лет. Риск развития опухолей яичника составляет 29% в возрасте до 50 лет и 44% в 70 лет.

При мутациях гена BRCA2 риск развития опухолей молочной железы ниже, чем при мутациях BRCA1, и составляет 65% (доля двустороннего РМЖ составляет 5-20%). В случае если у одного/обоих родителей выявлена мутация генов BRCA1 и BRCA2. Семейная пара должна пройти генетическое консультирование у сертифицированного специалиста генетика.

Нами выполнено 369 исследований на вышеуказанные мутации и выявлено 6 пациенток с аномалиями в генах BRCA1 и BRCA2, одной пациентке проведено оперативное лечение (мастэктомия). Исследование на вышеуказанные мутации дает право пациентам знать о принадлежности к высокой группе риска по развитию заболевания и принять правильное решение: сделать профилактическую операцию (что и сделала известная актриса Анджелина Джоли), чаще проходить диспансеризацию или провести превентивную химиотерапию.

Таким образом, ранние профилактические мероприятия у пар с высоким риском рождения ребенка с мутациями в генах, приводящие впоследствии к онкологическим заболеваниям, являются актуальными при планировании беременности у пары с наличием наследственной предрасположенности к тому или иному онкологическому заболеванию. Преимплантационная генетическая диагностика у пациентов с наследственной формой рака является инструментом ранней профилактики передачи риска возникновения в потомстве онкологических заболеваний.

## РАЗДЕЛ 3. ОНКОФЕРТИЛЬНОСТЬ

Одной из стратегических задач в современной онкогинекологии является сохранение и отсроченная реализация репродуктивной функции у пациентов с онкологическими заболеваниями. Многие злокачественные новообразования возникают у женщин в детородном возрасте до 40 лет. Статистика возрастной структуры онкологической заболеваемости за последние 10 лет свидетельствует об «омоложении» многих нозологических форм. В репродуктивном периоде у женщин наиболее часто диагностируются: рак шейки матки (РШМ), рак молочной железы (РМЖ), различные виды лимфом, лейкозы, меланома, злокачественные опухоли яичников, головного мозга, саркомы мягких тканей и костей, а также некоторые другие. Так, в России, за последние 11 лет зарегистрирован прирост заболеваемости раком шейки матки на 26,2%, а рака молочной железы – на 20,1%. Не снижается и заболеваемость злокачественными новообразованиями у детей и подростков - гемобластозами, опухолью Вилмса, герминогенными опухолями яичников, саркомой Юинга и другими.

В момент установления онкологического диагноза, при неясном исходе заболевания, большинство пациентов вопрос о рождении ребенка в будущем не поднимают, так как на первом месте перед онкологами стоит задача провести максимально эффективное противоопухолевое лечение, что предполагает сиюминутный, максимально радикальный подход и быстрое начало терапии без размышлений о качестве будущей жизни пациентки. На этом этапе проблему сохранения репродуктивной функции онкологи считают неактуальной по причине неосведомленности специалистов о современных возможностях вспомогательных репродуктивных технологий, а так же отсутствия междисциплинарного подхода к этой проблеме.

В связи с улучшением диагностики и лечения онкологических заболеваний, многие пациенты с онкологическими заболеваниями имеют хороший прогноз с долгосрочными перспективами жизни больных. Полноценное информирование больных и налаженные связи с репродуктологами приносят хорошие результаты. Так, по данным М. Саугас et al., более чем у половины больных, направленных к репродуктологам, удалось получение и сохранение генетического материала до начала лечения (преимущественно в виде ооцитов), в дальнейшем беременность наступила у 43% сохранивших генетический материал.

В России в случае благоприятного исхода заболевания пациенткам часто запрещается планировать беременность даже при сохранении репродуктивных органов со ссылкой на ухудшение дальнейшего прогноза, что не соответствует мировой практике. Разработка новых вспомогательных репродуктивных технологий предлагает целый ряд альтернатив для молодых онкологических больных.

### ***3.1. Сохранение генетического материала у онкологических больных репродуктивного возраста***

В настоящее время существуют следующие возможности сохранения генетического материала больных злокачественными новообразованиями: криоконсервация биологического материала; использование донорских яйцеклеток; использование эмбрионов доноров; суррогатное материнство.

*Криоконсервация биологического материала.* Лабораторной основой сохранения репродуктивной функции у пациенток с онкологическими заболеваниями является криоконсервация яйцеклеток, эмбрионов и ткани яичника.

В лабораториях вспомогательных репродуктивных технологий получили распространение два вида криоконсервации: «медленное» замораживание и витрификация (рис. 5).



РИСУНОК 5 А) ВИТРИФИКАЦИЯ

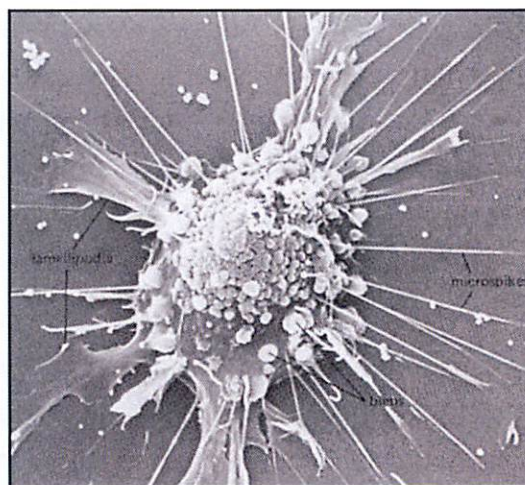


РИСУНОК 5 Б) МЕДЛЕННОЕ ЗАМОРАЖИВАНИЕ С ОБРАЗОВАНИЕМ КРИСТАЛЛОВ ЛЬДА



В первом случае целостность клеток обеспечивается за счёт медленного контролируемого понижения температуры (0,3-2,0°С в минуту) при относительно низкой концентрации веществ-криопротекторов, из-за образования кристаллов льда возможность гибели клеток намного выше. Поэтому для криоконсервации используется главным образом метод витрификации. Витрификация, или сверхбыстрое замораживание – метод криоконсервации, основанный на физическом явлении перехода жидкости при понижении температуры в стекловидное состояние без образования кристаллов льда (лат. vitrum – стекло). При высокой концентрации криопротекторов и сверхбыстром охлаждении жидкость переходит не в кристаллическое, а в супервязкое твёрдое состояние с аморфной структурой, что обеспечивает лучшую выживаемость витрифицированных ооцитов, эмбрионов на разных этапах развития *in vitro*, овариальной ткани. Замороженные образцы хранятся в жидком азоте при постоянной температуре -196°С, при этом рождение детей после размораживания эмбрионов, хранящихся 10 лет и более возможно (рис. 6).



РИСУНОК 6 А). ПРОТОКОЛ ВИТРИФИКАЦИИ

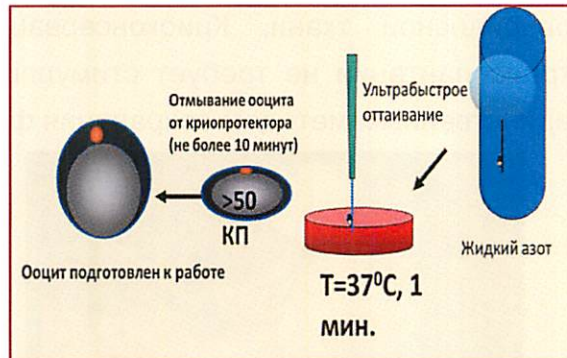


РИСУНОК 6 Б). ПРОТОКОЛ РАЗМОРАЖИВАНИЯ ООЦИТОВ

Какой биологический материал можно витрифицировать с последующим применением?

#### I. Криоконсервация эмбрионов



Криоконсервация эмбрионов на разных стадиях развития является признанным и самым эффективным методом сохранения фертильности и позволяет добиться стабильно высоких результатов.

II. Криоконсервация неоплодотворенных ооцитов



Криоконсервация неоплодотворенных ооцитов - вариант, наиболее приемлемый для пациенток, которые не имеют в данный момент партнера и не хотят использовать донорскую сперму, а также для имеющих религиозные и этические возражения против замораживания эмбрионов.

III. Криоконсервация и последующая трансплантация тканей яичников

У онкологических пациенток, не имеющих достаточно времени для получения зрелых ооцитов до начала терапии, традиционная криоконсервация ооцитов представляется проблематичной по сравнению с замораживанием овариальной ткани. Криоконсервация ткани яичников с целью будущей трансплантации не требует стимуляции яичников, следовательно, может быть единственным методом сохранения фертильности у больных детей (рис.7).

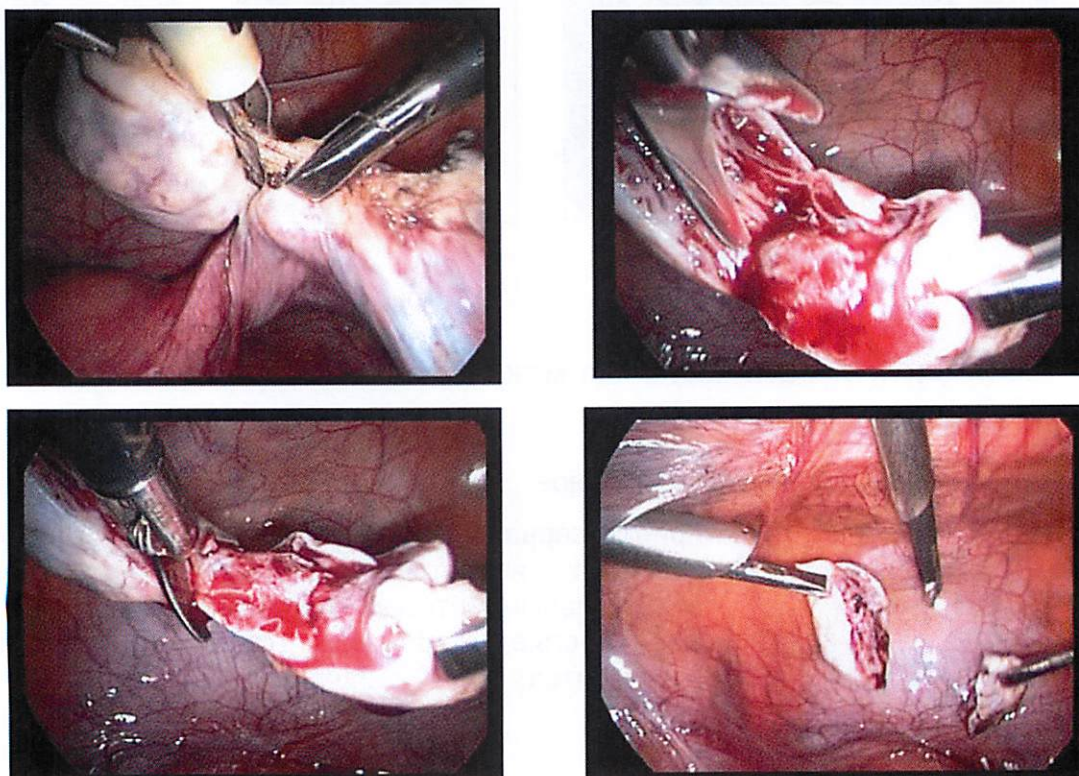


РИСУНОК 7. ЗАБОР ТКАНИ ЯИЧНИКА ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

*Использование донорских яйцеклеток.* Если в результате противоопухолевого лечения функция яичников была утрачена и возникла преждевременная менопауза, то при сохраненной матке возможна беременность с использованием ооцитов другой женщины. Донорство яйцеклеток позволяет, чтобы, по крайней мере, один из родителей (отец) имел генетическую связь с ребенком. Донорские яйцеклетки оплодотворяют в лаборатории спермой партнера женщины или донора с использованием методов ЭКО и переноса эмбриона в матку пациентки. Матка должна быть здоровой, чтобы пациентка могла успешно выносить беременность, принимая гормоны до и после пересадки эмбрионов.

*Эмбрионы доноров.* Эмбрионы доноров также используют в случае отсутствия яичников или сохранившихся яйцеклеток. Они, как правило, передаются от пары после успешного лечения бесплодия и эффективного ЭКО из оставшихся эмбрионов и могут быть пересажены пациентке для вынашивания. При использовании донорского эмбриона генетическая связь ребенка с родом пациентки и ее партнера отсутствует, но при сохраненной матке становится возможным личное участие пациентки в вынашивании плода.

*Суррогатное материнство.* Если пациентка имеет собственные яйцеклетки или эмбрионы, но не может выносить ребенка, или если при вынашивании беременности высоки риски прогрессирования заболевания, может быть использован гестационный носитель — другая женщина, которой в матку переносят эмбрион, генетически не связанный с ней, но связанный с больной и ее мужем.

В случаях, когда отсутствуют собственные яйцеклетки, возможно решение проблемы бесплодия с помощью суррогатного материнства, когда используется донорская яйцеклетка, оплодотворенная спермой мужа больной. Правовое регулирование института «суррогатного материнства» - один из самых сложных вопросов в современной юридической практике.

Внедрение в работу методов витрификации ооцитов, эмбрионов, ткани яичника с проведением последующей трансплантации — методы глубокой заморозки тканей и клеток, позволяют сохранить и отсрочить реализацию репродуктивной функции при онкологических заболеваниях после стойкой ремиссии. Разработанные новые вспомогательные репродуктивные технологии позволяют предложить целый ряд альтернатив молодым онкологическим больным для сохранения им фертильности, получения и увеличения шансов деторождения. Междисциплинарный подход к оказанию медицинской помощи пациенткам фертильного возраста с онкологическими заболеваниями

заключается в ранней диагностике онкологического заболевания, своевременной консультации репродуктолога с последующим забором биологического материала, лечении онкологического заболевания, реализации репродуктивной функции после стойкой ремиссии.

С 2009 по ноябрь 2016 гг. в отделении ЭКО Перинатального медицинского центра ГК «Мать и дитя» был проведен забор материала у 40 пациенток с различными онкологическими заболеваниями. Средний возраст пациенток составил  $27,9 \pm 10,0$  лет. В результате, после переноса размороженных ооцитов, эмбрионов пациенткам при наступлении стойкой ремиссии произошло 12 родов и в настоящий момент у 4 пациенток прогрессирующая беременность. Использование ПГД у пар с носителями генетических заболеваний (муковисцедоз, адреногенитальный синдром Марфана, гемофилия и др.), у пациенток с резус-сенсбилизацией, онкологическими заболеваниями позволит снизить частоту этих заболеваний и затраты на лечение и реабилитацию, необходимые пациентам с вышеуказанной патологией пожизненно. Витрификация биологического материала позволит обрести счастье материнства пациентам с онкологическими заболеваниями после успешного лечения, что ранее было невозможно.

*Таким образом, проведенные исследования позволяют рассматривать предиктивную медицину как направление, обеспечивающее сопряжение преимплантационной и пренатальной диагностики, репродуктологии, акушерства и гинекологии для разработки современных методов выявления и лечения патологических процессов. Развитие и внедрение в практику методов предиктивной медицины будет способствовать выявлению предрасположенности к заболеваниям на генном уровне, диагностике успешному лечению многих заболеваний на ранней стадии, а, значит, является экономически эффективным направлением в здравоохранении и социальной политике. Широкое применение преимплантационной диагностики позволит снизить число циклов экстракорпорального оплодотворения за счет повышения эффективности ЭКО.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аксель Е.М. Заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований органов женской репродуктивной системы в России. Онкогинекология. №1, 2015, с.6. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. Под редакцией М.И. Давыдова и Е.М. Аксель. - М., Издательская группа РОНЦ, 2014, 226 с.
2. Anders C., Johnson R., Litton J., Phillips M., Bleyer A. Breast Cancer Before Age 40 Years. *Semin Oncol.* 2009 Jun; 36(3): 237–249. doi: 10.1053/j.seminoncol.2009.03.001.
3. Ashoor G., Syngelaki A., Wagner M., Birdir C., Nicolaides K.H. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2012; 206(4): 322. e1-5.
4. Bianchi D.W., Platt L.D., Goldberg J.D., Abuhamad A.Z., Sehnert A.J., Rava R.P. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet. Gynecol.* 2012; 119(5): 890-901.
5. Cayrac M., Rafii A., Vincens C., Brunet C., M. Monforte, E. Vintejou, V. Loup, S. Hamamah, A. Ferrieres, G. Rathat, H. Dechaud, B. Hedon, S. Bringer-Deutsch Programme de préservation de la fertilité féminine au CHRU de Montpellier 2 ans après *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, Volume 44, Issue 6, June 2015, Pages 532-540
6. Dursun P., UtkuDoğan N., Ayhan A. Oncofertility for gynecologic and non-gynecologic cancers: Fertility sparing in young women of reproductive age *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Volume 92, Issue 3, December 2014, Pages 258-267
7. Fan H.C., Blumenfeld Y.J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S.R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(42): 16266-71.
8. Fiorentino F, Bono S, Biricik A. et all. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod.* 2014 Dec; 29(12): 2802-13.
9. F. Fostira, G. Thodi, I. Konstantopoulou. Hereditary cancer syndromes. *Journal of BUON.* 2007 г., Т. 12, стр. S13-S22.
10. Fragouli E, Alfarawati S, Goodall NN, Sánchez-García JF, Colls P, Wells D. The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. *Mol Hum Reprod.* 2011 г., Т. 17, 5, стр. 286-95.
11. Davis T., Song B., Cram D.S. Preimplantation genetic diagnosis of familial adenomatous polyposis. *Reprod Biomed Online.* 2006 г., Т. 13, 5, стр. 707-711.
12. J. Balman, O. Diez, I. T. Rubio. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines.. 2011 г., *Annals of Oncology (Supplement 6)*, Т. 22, стр. vi31–vi34.
13. Gwendolyn P. Quinn, Tuya Pal, Devin Murphy, et al. High-risk consumers' perceptions of preimplantation genetic diagnosis for hereditary cancers: a systematic review and meta-analysis. *Genetics in medicine.* 2012 г., Т. 14, 2, стр. 191-200

14. Konstantopoulou I., Pertesi M., Fostira F., Grivas A., Yannoukakos D. Hereditary cancer predisposition syndromes and preimplantation genetic diagnosis: where are we now? *Journal of BUON*. 2009 г., Т. 14, стр. S187-S192.
15. Nicolaides K.H. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat. Diagn.* 2011; 31(1): 7-15.
16. Norton M.E., Brar H., Weiss J., Karimi A., Laurent L.C., Caughey A.B. et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2012; 207(2): 137. e1-8.
17. Palomaki G.E., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M., Haddow J.E., Neveux L.M., Ehrich M. et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet. Med.* 2011; 13(11): 913-20.
18. R. Nagy, K. Sweet, C. Eng. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*. 2004 г., Т. 23, стр. 6445–6470.
19. Santiago Munné, Mireia Sandalinas, Tomas Escudero, Carmen Márquez, Jacques Cohen. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human. *Reproductive BioMedicine Online*. 2002 г., Т. 4, 3, стр. 123–130.
20. Schoolcraft W, Fragouli E, Stevens J et al. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertility and Sterility*. 2010 94 (5): 1700-1706
21. Sehnert A.J., Rhee B., Comstock D., de Feo E., Heilek G., Burke J., Rava R.P. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin. Chem.* 2011; 57(7): 1042-9.
22. Tan Y., Yin X., Zhang S. et al. Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing. *GigaScience*. 2014: 3:30
23. Yang Z, Liu J, Collins G. et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Molecular Cytogenetics*. 2012: 5-24
24. Sparks A.B., Struble C.A., Wang E.T., Song K., Oliphant A. 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.* 2012; 206(4): 319. e1-9.
25. Zimmermann B., Hill M., Gemelos G., Demko Z., Banjevic M., Baner J. et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat. Diagn.* 2012; 32(13): 1233-41.

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ НАУЧНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ



**КУРЦЕР**  
**МАРК**  
**АРКАДЬЕВИЧ**

Академик РАН, доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета РНИМУ, руководитель циклов дополнительного профессионального образования на кафедре акушерства и гинекологии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова, член Президиума Правления Российского общества акушеров-гинекологов, Председатель Президиума Московского общества акушеров-гинекологов, членом Общества New European Surgical Academy (NESA), член Международной Федерации акушеров-гинекологов (FIGO).

Родился в 30 июня 1957 года в Москве.

Курцер М.А. возглавлял со дня открытия (1994 год) по 2012 год ГБУЗ «Центр планирования семьи и репродукции» Департамента здравоохранения г. Москвы.

В период с 2003 по 2013 гг. являлся главным акушером-гинекологом Департамента здравоохранения города Москвы. С его участием снижена в городе материнская и перинатальная смертность.

Марк Аркадьевич является известным акушером-гинекологом и перинатологом, инициатором продвижения и внедрения в практику инновационных медицинских технологий. Владеет современными методами хирургических вмешательств в акушерстве и гинекологии, выполняемыми лапаротомическим, лапароскопическим и вагинальным доступами.

Автор 200 опубликованных работ.

### *Основные научные достижения:*

внедрено проведение преимплантационной генетической диагностики (ПГД) моногенных заболеваний. Метод позволяет иметь здоровых детей у пар с генетическими (хромосомными и моногенными) заболеваниями, при носительстве транслокаций, у женщин с Rh-сенситизацией, когда в полость матки переносят только резус-отрицательные эмбрионы;

разработаны органосохраняющие методы при акушерских кровотечениях и перитонитах, а также при лечении миомы матки с использованием органосохраняющих методов: эмболизации маточных артерий, ФУЗ-аблации;

проведен комбинированный расчет риска хромосомной патологии плода и развития гестоза в I триместре беременности, пренатальная диагностика пороков развития плода, исследована внеклеточная ДНК плода в крови матери; молекулярное генетическое тестирование на микроматрицах, позволяющее исследовать весь геном человека;

внедрен в практику новейший метод генетического анализа преимплантационных эмбрионов - NGS - высокопроизводительное секвенирование следующего поколения.

# РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК



## ПРЕЗИДИУМ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Научный доклад представлен  
на Президиуме РАН «8» ноября 2016 года