

Asistovaná reprodukce a preimplantační genetická diagnostika u pacientek ohrožených karcinomem prsu

Assisted Reproduction and Preimplantation Genetic Diagnosis in Patients Susceptible to Breast Cancer

Veselá K., Kocur T., Horák J., Horňák M., Oráčová E., Hromadová L., Veselý J., Trávník P.

REPROMEDA s.r.o., Centrum reprodukční medicíny, Brno

Souhrn

Východiska: Asistovaná reprodukce, stejně jako samotné těhotenství u pacientek ohrožených karcinomem prsu či jinými dědičnými nádorovými onemocněními představuje jedno z velmi diskutovaných témat. Je nutno připustit, že v minulosti byl přístup k přání otěhotnět, případně léčbě neplodnosti u žen po léčbě karcinomu prsu více než zdrženlivý. Dostupné informace naznačují, že karcinom prsu, pokud to průběh léčby umožňuje, není kontraindikací k těhotenství ani k asistované reprodukci. Naopak, v současnosti přináší tento přístup možnost vyloučení přenosu genetického rizika na plod pomocí preimplantační genetické diagnostiky. **Cíl:** V tomto přehledovém článku si klademe za cíl shrnout dosavadní poznatky a publikované informace o rizicích a úskalích těhotenství pacientek ohrožených karcinomem prsu. Zároveň uvádíme současně možnosti a ideální postupy pro zachování plodnosti před plánovanou léčbou a pro provedení metod asistované reprodukce s využitím nejnovějších postupů, zaručujících co možná nejbezpečnější průběh. Ve druhé části práce je pak popsána moderní molekulární genetická metoda karyomapping, jež přináší nové možnosti preimplantační genetické diagnostiky s cílem vyloučení zárodečné mutace v případě dědičných predispozic k nádorovým onemocněním. Rápidní vývoj metod preimplantační genetické diagnostiky je demonstrován především možností zachytit současně se sledovanou mutací také aneuploidie všech chromozomů a v neposlední řadě zkrácením doby nutné k přípravě metody na několik dní.

Klíčová slova

karcinom prsu – dědičné nádorové syndromy – asistovaná reprodukce – ovariální rezerva – hormonální stimulace – preimplantační genetická diagnostika – karyomapping

Summary

Background: Assisted reproduction, as well as pregnancy itself, in patients with breast cancer or other hereditary type of cancer, is a widely discussed topic. In the past, patients treated for breast cancer were rarely involved in the discussion about reproductive possibilities or infertility treatment. However, current knowledge suggests, that breast cancer is neither a contraindication to pregnancy, nor to assisted reproduction techniques. On the contrary, assisted reproduction and preimplantation genetic diagnosis methods might prevent the transmission of genetic risks to the fetus. **Aim:** In this review we summarize data concerning pregnancy risks in patients with increased risk of breast cancer. In addition, we introduce current possibilities and approaches to fertility preservation prior to assisted reproduction treatment as well as novel methods improving the safety of fertility treatment. In the second part of this review, we focus on karyomapping – an advanced molecular genetic tool for elimination of germinal mutations in patients with predisposition to cancer. Moreover, the rapid development of preimplantation genetic diagnosis methods contributes to detection of both chromosomal aneuploidy and causal mutations in a relatively short time-span.

Key words

breast neoplasms – hereditary cancer syndromes – assisted reproduction – ovarian reserve – hormonal stimulation – preimplantation diagnosis – karyomapping

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Kateřina Veselá, Ph.D.
REPROMEDA s. r. o.
Centrum reprodukční medicíny
Viniční 235
615 00 Brno
e-mail: kvesela@repromeda.cz

Obdrženo/Submitted: 19. 10. 2015
Přijato/Accepted: 20. 11. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2016593>

Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem u žen v plodném věku. V posledních desetiletích se podařilo dosáhnout významného pokroku ve snížení úmrtnosti na toto onemocnění pomocí chemoterapie, endokrinní terapie, radioterapie a biologické léčby, avšak cenou za dlouholeté přežití byla častá neplodnost. Otázka reprodukce má velký význam u mladých žen, zejména u těch, které nedosáhly mateřství před diagnostikou karcinomu prsu. Pacientky je třeba při sdělení diagnózy informovat o riziku neplodnosti a současně o dostupných metodách uchování plodnosti, včetně kryokonzervace oocytů a embryí před zahájením léčby [1]. Problematika plodnosti patientek po léčbě karcinomu prsu je podrobně rozebrána v několika přehledných článcích [2–5].

S rostoucím povědomím o metodách preimplantační genetické diagnostiky (PGD) stále větší množství žen po léčbě karcinomu prsu a těch, jež jsou v riziku (u nichž byla diagnostikována mutace v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*), vyhledává reprodukčně-genetické poradenství s úmyslem otěhotnění a současně prevence dědičného onkologického onemocnění touto cestou u potomků. Je však stále málo údajů, které by sloužily jako zdroj informací o tom, jaká případná rizika ženě hrozí a jaké postupy zvolit, aby se rizika v souvislosti s léčbou neplodnosti, těhotenstvím a porodem u těchto žen minimalizovala. Článek si klade za cíl s ohledem na současný vývoj reprodukční medicíny a genetiky přinést přehled postupů, jež je možné pacientkám v reprodukčním věku bezpečně nabídnout.

Hormonální hladiny v normálním, stimulovaném cyklu, v graviditě a při hyperstimulačním syndromu

Koncentrace 17β -estradiolu je během folikulární fáze nestimulovaného cyklu menší než 0,4 nmol/l a dosahuje okolo 1,5 nmol/l během luteální fáze nestimulovaného menstruačního cyklu [6]. Po koncepci hladina 17β -estradiolu vzrůstá k hodnotám 20–110 nmol/l v termínu porodu [7].

Charles et al uvádějí po spontánní koncepci ve 20. týdnu gravidity koncentraci 17β -estradiolu v séru 25–40 nmol/l a v 36. týdnu rozmezí 76–93 nmol/l [8].

V den podání trigger dávky hCG k finálnímu dozrání a uvolnění oocytů z folikulů dosahuje sérová koncentrace 17β -estradiolu po stimulaci celkovou dávkou FSH 1 700–3 700 IU ve dlouhém stimulačním protokolu hodnot 3,4–25 nmol/l [9]. Prasad et al uvádějí, že v cyklech stimulovaných denní dávkou 225 IU FSH je v dlouhém protokolu sérová koncentrace 17β -estradiolu 2. den cyklu 0,06–0,2 nmol/l, 6. den cyklu 0,3–2,3 nmol/l a v den podání trigger dávky hCG 1,5–12 nmol/l [10]. Moraloğlu et al uvádějí, že u stimulovaných cyklů v době vrcholu 17β -estradiolu byla jeho koncentrace 2,5–18 nmol/l [11].

V 5. týdnu gravidity po ovariální stimulaci a transferu embrya byly hladiny 17β -estradiolu: medián 4,1 nmol/l, inter-quartile range 2,2–6,6 nmol/l, ve spontánní graviditě: medián 1,1 nmol/l, inter-quartile range 0,7–1,6 nmol/l a po kryoembryotransferu: medián 0,7 nmol/l, inter-quartile range 0,6–0,9 nmol/l [12].

Hladiny 17β -estradiolu v krvi u těhotných po ovariální stimulaci a transferu embrya byly do 7.–8. týdne vyšší než po kryoembryotransferu a spontánním otěhotnění [12].

V průběhu hyperstimulačního syndromu dosahují hladiny 17β -estradiolu v krvi kolem 18. dne po punkci oocytů hodnoty až 24 nmol/l [13].

Z uvedených údajů jasně vyplývá, že nejvyšší a nejdélsí expozice tkání 17β -estradiolu je v těhotenství. Přitom ve spontánním těhotenství a po kryoembryotransferu jsou hladiny 17β -estradiolu nižší než v těhotenství po stimulovaném cyklu. Ve stimulovaném cyklu je koncentrace 17β -estradiolu v době podání trigger dávky hCG srovnatelná s koncentrací na začátku těhotenství. Při ovariálním hyperstimulačním syndromu může koncentrace 17β -estradiolu dosáhnout hodnot srovnatelných s těhotenskými hodnotami ve 20. týdnu gravidity.

Znamená to tedy, že samotná stimulace ovarií, pokud nedojde k hyperstimulačnímu syndromu, nepředstavuje extrémní zátěž estrogenu. Současná data nepotvrzují přímý vliv metod asistované reprodukce na zvýšené riziko karcinomu

ovaria [14]. Pokud je tedy pacientka ze zdravotního hlediska schopna prodělat těhotenství, je schopna absolvovat i stimulovaný cyklus asistované reprodukce. Pro další zvýšení bezpečnosti stimulace je možné použít šetrné metody, jak je uvedeno dále. Jako postup volby se jeví vitrifikace embryí získaných ve stimulovaném cyklu a jejich kryoembryotransfer v některém z cyklů následujících.

Ovariální rezerva u patientek ohrožených karcinodem prsu

Je třeba si uvědomit, že ačkoliv ovariální rezerva a menstruační cyklus spolu souvisí, není amenorea synonymem pro neplodnost a probíhající menstruační cyklus známkou plodnosti [15].

U části patientek ohrožených karcinodem prsu je ovariální rezerva primárně snižena. Týká se to zejména patientek s mutací *BRCA1* a *BRCA2* [16,17]. K dalšímu snížení ovariální rezervy dochází vlivem léčby karcinomu. Chemoterapeutika poškozují primordiální oocyty, granulózové buňky a stroma ovaria, negativně ovlivňují také cévní zásobení ovarií a způsobují jejich fibrózu [18,19].

Léčiva užívaná k chemoterapii bez ohledu na mechanismus jejich působení mohou poškozovat rostoucí folikuly tím, že přerušují vývoj granulózových buněk. Zaniknou tak rostoucí a antrální folikuly s následnou amenoreou. Nové rostoucí folikuly se vyvinou z intaktních primordiálních folikulů s odstupem 3–6 měsíců, a proto amenorea může být přechodná při léčbě prostředky, které nepoškozují DNA a nemají vliv na ovariální rezervu [5].

Poškození ovariální rezervy je závislé na věku. Ženy starší 40 let mají pětinašobně vyšší riziko vzniku amenorey způsobené chemoterapií než ženy mladé [20]. U žen mladších 30 let se v různých studiích vznik chemoterapií indukované amenorey pohybuje v rozmezí 15–40 % [21,22].

Nejvýznamněji ovlivňuje ztrátu ovariálních funkcí cyklofosamid, který má silný dopad na ovariální rezervu. Byla pozorována 90% redukce množství folikulů 48 hod po jeho aplikaci. Literární údaje o efektu různých preparátů a léčebných postupů na vznik amenorey jsou velmi heterogenní [5].

Z uvedeného vyplývá, že ovariální rezerva může být snižena, případně může úplně zaniknout, zejména po chemoterapii prostředky poškozujícími DNA. Toto riziko je výrazně vyšší u pacientek, které mají již primární ovariální rezervu sniženou věkem. Pacientkám, jejichž ovariální rezerva neumožňuje získání vlastních oocytů, je možné nabídnout užití darovaných oocytů.

Těhotenství a kojení u pacientek ohrožených karcinodem prsu

Data ukazují, že přibližně polovina žen s vyléčeným karcinodem prsu si přeje otěhotnět [23]. Ve skutečnosti ale jen 10 % žen, u nichž se vyvinul invazivní karcinom před 40. rokem věku, porodí po stanovení diagnózy dítě [24–26].

Novou metaanalýzu problematiky otěhotnění u pacientek po léčbě karcinomu prsu přináší Raphael et al [27]. Dosud nebyla publikována žádná studie poukazující na negativní dopad následného počtu na prognózu pacientek přežívajících karcinomu prsu [24]. Naopak studie ukazují, že otěhotnění po stanovení diagnózy nezvyšuje riziko relapsu nebo smrti [28–30]. Nositelky mutací *BRCA*, ať už zdravé, nebo s diagnózou karcinomu prsu, jsou schopny dosáhnout těhotenství navzdory negativním okolnostem, jako je vyšší agresivita nádoru a menší ovariální rezerva [5].

Plody pacientek, které otěhotněly po skončení chemoterapie, nejeví známky poškození nebo vrozených vad, byl však zjištěn vyšší podíl spontánních potratů (29 %) a předčasných porodů plodů s nižší porodní hmotností (40 %) [3].

Ačkoliv v těhotenství je žena vystavena vysokým hladinám estrogenů, současné publikace nepotvrzují dřívější údaje o negativním vlivu těhotenství na prognózu po vyléčení karcinomu prsu [31,32]. Přežití pacientek, které následně otěhotněly, je naopak ve srovnání s kontrolami příznivější [24,30,33–35].

U žen s mutací v *BRCA1* a *BRCA2* je vysoké riziko dalšího primárního nádoru prsu i ovaria [36–39]. U nosiček mutace *BRCA1* se uvádí kumulativní riziko karcinomu ovaria 30–40 %, u nosiček *BRCA2* cca 10–15 % [40]. Z tohoto důvodu jim bývá nabízeno nejen

provedení oboustranné mastektomie a rekonstrukce prsů, ale i bilaterální salpingo-oophorektomie a je jim ordinován tamoxifen [41]. Tyto procedury jsou indikovány po dosažení mateřství, často jsou ale nabízeny ženám mezi 35. a 40. rokem, kdy některé ženy ještě mateřství nedosáhly. Je třeba vzít v úvahu, že porod a počet porozených dětí jsou protektivními faktory před vznikem karcinomu prsu u nosiček mutace *BRCA* [42–44]. Také Valentini et al dospěli k závěru, že těhotenství probíhající současně se stanovením nebo po stanovení diagnózy karcinomu prsu u nosiček *BRCA1* a *BRCA2* mutace nemá negativní vliv [45]. Ives et al došli k závěru, že koncepcí šest měsíců po ukončení léčby nesnižuje přežití pacientek [30]. Pokusy o otěhotnění se doporučuje zahájit nejdříve za 4–6 měsíců po ukončení chemoterapie a tři měsíce po ukončení endokrinní terapie [5].

Údaje týkající se těhotenství a plodu žen po léčbě karcinomu prsu z posledních let ukazují, že zvýšené riziko nízké porodní hmotnosti a vrozených vad není ve srovnání s obecnou populací zvýšené [31,46]. Údaje o možném výskytu karcinomu u dětí žen léčených pro karcinom prsu neukazují na zvýšené riziko s výjimkou genetického nádorového syndromu, jakým je např. mutace *BRCA* [47].

U pacientek léčených antracykliny existuje určité riziko vzniku subklinické kardiomyopatie, která se může v případě preexistující kardiální dysfunkce projevit při těhotenské zátěži krevního oběhu, proto je u těchto žen před otěhotněním doporučeno sonografické vyšetření srdce [48,49].

Kojení po léčbě karcinomu prsu není kontraindikováno u žen, které nemají známky reziduálního tumoru a jsou náležitě informovány a mají možnost konzultace [50,51]. Obdobně kojení ze zbývajících prsu po mastektomii je bezpečné [52].

Tyto údaje svědčí pro to, že pacientky, které absolvovaly léčbu karcinomu prsu, mohou být těhotné, porodit zdravé dítě a kojit, pokud tomu nebrání průběh onemocnění. Je třeba jim věnovat náležitou péči před a během těhotenství a volit vhodné postupy.

Metody používané ke snížení rizika stimulace ovarii

Podrobný přehled postupu při zachování fertility u onkologicky léčených žen přináší Coyne et al [53]. Rozbor možností a výsledků léčby neplodnosti z hlediska věku, typu nádoru a typu chemoterapie publikovali Pavone et al [54]. Speciálně postupům po léčbě karcinomu prsu je věnována práce, kterou publikovali Comtet et al, a na ženy s mutacemi *BRCA* je zaměřena práce zveřejněná autory Rodriguez-Wallberg a Oktay [55,56].

V současné době je možné nabídnout plné spektrum technik asistované reprodukce od fertilizace *in vitro* s transferem embrya až po maturaci oocytů *in vitro*, kryokonzervaci oocytů a embryí, kryokonzervaci ovariální tkáně a v neposlední řadě PGD umožňující výběr vhodného embrya bez onkogenní mutace. Právě u žen s hereditárními nádorovými syndromy by se tohoto postupu mělo využít [57].

Vzhledem k tomu, že zvýšené hladiny estrogenů jsou potenciálně riskantní u pacientek s karcinodem prsu, byly vyvinuty ovariální stimulační protokoly s inhibítorem aromatázy (letrozolem) a tamoxifenem, které umožňují bezpečnou stimulaci [3].

Nejlepším řešením pro uchování fertility žen s karcinodem prsu je odběr oocytů před zahájením léčby a kryokonzervace oocytů nebo embryí. Většina typů karcinomů prsu je hormonálně senzitivní, proto není žádoucí vystavovat pacientku zvýšeným koncentracím 17β -estradiolu [5]. Jistě je namístě u každé ženy léčené pro karcinom prsu stanovit hormonální senzitivitu nádoru s ohledem na léčbu neplodnosti či pozdější hormonální substituční terapii. Negativní efekt léčby neplodnosti u žen s mutací *BRCA1* a *BRCA2* nebyl prokázán, tuto skutečnost je třeba ještě ověřit na větších souborech [58].

Pro snížení možného efektu zvýšené hladiny 17β -estradiolu byla vypracována řada protokolů. Jednou z možností je použití tamoxifenu. Tamoxifen je selektivní modulátor estrogenových receptorů s antagonistickým efektem v prsu. Studie Meirowa et al ukázala, že není rozdíl v množství získaných oocytů mezi pacientkami užívajícími během sti-

mulace ovarií tamoxifen a těmi, které jej neužívaly [59]. Další možností je použití inhibitorů aromatázy. Letrozol se osvědčil při stimulaci ovarií před zahájením chemoterapie, je však získáváno více nezralých oocytů [60,61]. Podrobný rozbor protokolů při ovariální stimulaci přináší Muñoz et al [62].

Velmi důležité je snížit riziko ovariálního hyperstimulačního syndromu, kde mohou hormonální hladiny vysoce přesáhnout hodnoty obvyklé u nekomplikovaných stimulovaných cyklů. Z toho důvodu je vhodné použít jako trigger GnRH agonistu místo choriového gonadotropinu [63].

Jednou z možností, jak významně snížit hormonální expozici, je získání nezralých oocytů a jejich maturace *in vitro* [64].

Kryokonzervace ovariální tkáně a její následná replantace je jednou z možných metod, může se uplatnit zejména při nedostatku času k provedení odběru oocytů. U pacientek s mutací *BRCA1* a *BRCA2* musí ale být ověřena bezpečnost tkáně před transplantací, aby se předešlo implantaci ovariálního tumoru [65,66].

Z hlediska posouzení bezpečnosti a efektivity léčby se jeví jako nejvhodnější následující postupy:

Pacientky s vysokým rizikem, ale bez nádorového onemocnění a pacientky po ukončení léčby mohou podstoupit šetrnou stimulaci, která by u hormonálně dependentních nádorů měla být provedena s použitím letrozolu či tamoxifenu. Ve stimulovaném cyklu se provede vitifikace embryí a kryoembryo-transfer následuje v některém z dalších cyklů. Pokud se používají oocyty získané až po ukončení léčby karcinomu, je velmi vhodné provést selekci embryí pomocí preimplantačního genetického screeningu aneuploidii (PGS).

Pacientky před zahájením léčby by měly, pokud je to z onkologického hlediska možné, podstoupit odběr oocytů, případně s maturací *in vitro*, pokud mají partnera, nejlépe oplození oocytů *in vitro* a vitifikaci embryí s odložením kryoembryo-transferu na dobu po ukončení onkologické léčby. Pokud partnera nemají, potom je třeba vitifikovat neoplozené oocyty. U kryokonzervace ovariální tkáně není zatím zcela ověřena úspěšnost postupů po rozmrazení.

PGD pro vyloučení mutací v nádorových predispozičních genech

PGD je soubor metod umožňujících výběr embrya bez sledované genetické zátěže, ještě před jeho transferem a implantací v děloze. V rámci PGD lze vyšetřit jakékoliv monogenně podmíněné vzácné dědičné onemocnění se známou kauzální mutací. Mezi tyto lze rovněž zařadit predispoziční nádorové syndromy, pro které PGD představuje jedinou preventivní metodu umožňující zabránění přenosu mutovaného genu na potomstvo. V případě vzácných onemocnění s časným nástupem a vysokou penetrancí mají páry k dispozici ke zvážení diagnostiku prenatální, která však u specifických onemocnění s pozdním nástupem může narážet na etické problémy a u predispozičních nádorových syndromů nepřichází prakticky v úvahu vůbec, resp. její provedení není považováno za etické. Problematikou PGD samotné a její úlohou v rámci problematiky nádorových dědičných onemocnění se v roce 2009 detailně zabývala Hüttelová et al [67]. Tato práce se velmi přehledně věnuje základním principům PGD, a to jak z pohledu pacientů, tak i jednotlivých odborníků multidisciplinárního týmu, jehož spolupráce a kvalita všech jeho částí je rozhodující pro úspěšné provedení této metody. V nedávné době došlo k posunu vpřed díky zavedení nových molekulárně genetických metod, rozvoji technik vitifikace embryí a využití biopsie trofektodermy z embrya ve stadiu blastocysty jakožto metody první volby pro odběr materiálu z vyšetřovaných embryí [68].

Současné trendy PGD

Ideální metodou pro PGD vzácných dědičných onemocnění a predispozic k nádorovým onemocněním je ta, která kromě genotypu embrya dokáže současně detekovat také aneuploidie všech chromozomů. Handysidovi et al se v roce 2010 podařilo tohoto cíle dosáhnout vyvinutím metody karyomapping, která využívá SNP (single nucleotide polymorphism) array (mikročip určený k detekci jednonukleotidových polymorfizmů) pro identifikaci zdravého a mutantního haplotypu s po-

mocí referenčního vzorku známého genotypu [69]. Metoda využívá přibližně 300 000 vybraných SNP markerů (Human-Karyomap-12 v1.0 BeadChip SNP array), které se vyznačují vysokou heterozygotností a rovnoměrně pokrývají celý lidský genom. Tyto vlastnosti použitých SNP markerů činí z karyomappingu univerzální vyšetřovací metodu pro jakékoliv monogenně dědičné onemocnění. Karyomapping patří mezi metody nepřímé DNA diagnostiky, avšak díky desítkám informativních SNP markerů v blízkém okolí vyšetřovaného genu umožňuje tato metoda určit genotyp embrya s vyšší přesností než dříve používané metody nepřímé DNA diagnostiky založené na použití malého počtu STR (short tandem repeats) markerů. Ovšem je nutné zdůraznit, že pro všechny metody nepřímé DNA diagnostiky je podstatné přesně znát genotyp referenčního vzorku, který je klíčový pro určení vazby informativních SNP markerů buď s mutovanou, nebo zdravou alelou genu.

Kromě precizního rozpoznání haplotypu pojícího se s kauzální mutací jsou současně detekovány také aneuploidie všech chromozomů. Zavedení karyomappingu, který kombinuje stanovení kauzální mutace (PGD) se screeningem aneuploidii (PGS) otevřelo v roce 2014 novou éru PGD vzácných onemocnění i predispozic k nádorovým dědičným syndromům.

Kromě vyšetření aneuploidii všech chromozomů přináší PGD pomocí karyomappingu další výhody. Metoda díky své univerzalitě umožňuje provedení PGD pro kterýkoliv gen člověka nesoucí kauzální mutaci, aniž by byla nutná složitá a časově náročná individuální příprava PGD pro každý gen a každý jednotlivý pár, jako je tomu v případě PGD pomocí PCR [67]. Výsledkem je výrazné zkrácení času diagnostiky, což je pacienty velmi oceňováno. Je zde i podstatný vliv na zvýšení flexibility a propustnosti PGD laboratoře, metoda tedy současně ekonomizuje a optimalizuje provoz celého PGD centra. Husté pokrytí cílového úseku informativními markery také umožňuje přesně identifikovat pozice crossing-overů a snížit počet embryí, u kterých nebylo dříve možné dospět k jednoznačnému diagnostickému závěru. Pro provedení PGD karyomappingem postačí kromě DNA

páru získat jeden další referenční vzorek. V případě PGD predispozice ke karcinomu prsu se zpravidla jedná o matku partnerky, anebo jejího otce. V situaci, kdy kauzální mutace vznikla u jednoho z partnerů *de novo* nebo kdy není referenční vzorek z nejrůznějších důvodů k dispozici, lze karyomapping vhodně doplnit o detekci přímé mutace z amplifikátu embryí. V takovém případě je některé z embryí zvoleno jako referenční, čímž dojde k rozdělení embryí do haplotypových skupin, které musí být v souladu s rozdělením embryí do skupin v závislosti na výsledku detekce přímé mutace [70].

PGD cyklus s vitifikací embryí

Odběr genetického materiálu z vyvíjejícího se embrya je jednou z nejdůležitějších součástí celého procesu PGD. Při časování zisku vstupního materiálu k PGD je patrný posun od biopsie blastomery/blastomer třetí den vývoje embrya směrem k biopsii několika buněk trofektodermu embrya ve stadiu blastocysty pátý až šestý den vývoje (obě metody popsány v Hüttelová et al) [67]. V této práci zmíněný přístup s využitím pólových tělísek se v praxi ukázal jako méně vhodný a může ho být využito spíše v zemích, kde legislativa omezuje možnosti odběru buněk z časně se vyvíjejících embryí [71]. Mezi hlavní výhody biopsie trofektodermu patří zejména větší množství DNA dostupné pro samotnou genetickou diagnostiku, což vede k nižší frekvenci ADO (allelic drop-out) u SNP markerů a rovněž k vyšší spolehlivosti detekce aneuploidii. Další výhodou je také možnost získat validní informace o aneuploidii embrya ve stadiu blastocysty, zatížené mnohem méně přítomností mozaicizmu, typického a do jisté míry přirozeného pro ranější stadia vývoje embrya. S tímto přístupem se současně pojí vitifikace embryí a opuštění praktiky přenosu čerstvých embryí, která v asistované reprodukci dlouhá léta dominovala. Transfer selektovaného embrya se provádí v některém z následujících menstruačních cyklů. U ovulujících žen je k přenosu embrya čím dále tím častěji využíváno přirozených cyklů. Takový druh přípravy je velmi fyziologický, bez nutnosti použití vysokých dávek estrogenů a gestagenů. Pouze u žen s an-

ovulací nebo u těch, jejichž endometrium nedorůstá do patřičné výšky a kvality, se k přípravě endometria užívá hormonální substituční terapie. V takovém případě je nutno hormonální substituční terapii podávat až do nástupu placentární hormonální kompetence, k čemuž dochází přibližně od 12. týdne gravidity. Sérové koncentrace 17 β -estradiolu, jak bylo již uvedeno výše, jsou v průběhu gravidity v přirozeném cyklu nebo v cyklu hormonální substituční terapie nižší nežli při transferu ve stimulovaném cyklu.

Perspektivy PGD

Další posun v oblasti PGD vzácných dědičných onemocnění lze očekávat s použitím metod sekvenování nové generace (next-generation sequencing – NGS). Přínosem této metody by se kromě nepřímé diagnostiky založené na polymorfních oblastech v lidském genomu, jako jsou např. SNP a STR markery a detekce přímé mutace, mohl stát současně screening aneuploidii s vyšším rozlišením, případně schopností odhalit chromozomální mozaicizmus. Problematické však může být filtrování dat a přítomnost variant nejasného významu, což při použití definovaných SNP v případě metody karyomapping odpadá. I přes určitá technická úskalí a možné etické kontroverze však bude budoucnost PGD velmi pravděpodobně patřit právě NGS.

Závěr

Ačkoli je reprodukce žen, které se léčily anebo jsou v riziku pro karcinom prsu, stále spojena s diskuzí nad jejími možnými riziky, z dosavadně publikovaných literárních údajů nevyplývá pro tyto ženy ani specificky pro skupinu žen s mutací v *BRCA1* a *BRCA2* genech zvýšené riziko spojené s těhotenstvím a porodem. Není tedy nutné u žen vzbuzovat obavy z možného relapsu onemocnění způsobené léčbou neplodnosti či následnou graviditou. Pokud tyto ženy podstupují asistovanou reprodukci, je v případě nádorů s prokázanou hormonální senzitivitou nutné vybírat co nejbezpečnější stimulační protokoly a postupy, které zvyšují sérovou hladinu 17 β -estradiolu co nejméně.

Pro ženy s hereditárními nádorovými syndromy je metodou volby asistovaná

reprodukce s využitím PGD pro vyloučení onkogenní mutace u plodu.

U žen nad 35 let nebo u těch, které absolvují asistovanou reprodukci s využitím vlastních oocytů po provedení léčby karcinomu prsu, je indikováno provedení PGS embryí.

Ženám, jejichž ovariální rezerva po léčbě základního onemocnění není sluchitelná se ziskem a oplozením vlastních oocytů, je možné nabídnout léčbu s pomocí darovaných oocytů.

Všem ženám, kterých se diagnóza karcinomu prsu týká, ať již díky aktuálnímu či vyléčenému onemocnění, nebo kvůli riziku v podobě mutace genů *BRCA1* a *BRCA2* a které mají zájem řešit svoji budoucí reprodukci, by měla být doporučena konzultace na některém z pracovišť specializovaných na reprodukční medicínu a PGD. Informace o těchto specializovaných pracovištích by měl předat pacientkám v případě hereditárních nádorových onemocnění lékařský genetik, který konzultuje výsledky genetického testování.

Další preventivní sledování žen po asistované reprodukci by mělo být navrženo na základě osobní, rodinné anamnézy a genetické predispozice. U nosiček *BRCA1/2* mutace je preventivní péče jasně indikovaná, u žen s možným zvýšeným rizikem nádorů prsu nebo ovarií jsou vhodné pravidelné vaginální ultrazvuky a kontroly prsou (ultrazvuk nebo mamogram dle věku a rizika).

Konzultování těchto případů by mělo s ohledem na prognózu základního onemocnění obsahovat vždy kompletní představení možností řešení reprodukce otevřeným způsobem a bez zbytečného zastrahování, které se bohužel v minulosti často objevovalo. Musí být vedeno vždy nápomocně a nedirektivně a v každém ohledu je potřeba především respektovat přání a svobodnou vůli ženy a jejího partnera.

Literatura

- Christinat A, Pagani O. Fertility after breast cancer. *Maturitas* 2012; 73(3): 191–196. doi: 10.1016/j.maturitas.2012.07.013.
- Moffat R, Güth U. Preserving fertility in patients undergoing treatment for breast cancer: current perspectives. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2014; 6: 93–101. doi: 10.2147/BCTT.S47234.

3. Kasum M, Beketic-Oreškovic L, Peddi PF et al. Fertility after breast cancer treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 173: 13–18. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.11.009.
4. Woodson AH, Muse KI, Lin H et al. Breast cancer, BRCA mutations, and attitudes regarding pregnancy and preimplantation genetic diagnosis. *Oncologist* 2014; 19(8): 797–804. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0057.
5. de Pedro M, Otero B, Martín B. Fertility preservation and breast cancer: a review. *Ecancermedalscience* 2015; 9: 503. doi: 10.3332/ecancer.2015.503.
6. Abraham GE, Odell WD, Swerdloff RS et al. Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and estradiol-17 beta during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 34(2): 312–318.
7. Lindberg BS, Johansson ED, Nilsson BA. Plasma levels of nonconjugated oestrone, oestradiol-17beta and oestriol during uncomplicated pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1974; 32: 21–36.
8. Charles SM, Julian CG, Vargas E et al. Higher estrogen levels during pregnancy in Andean than European residents of high altitude suggest differences in aromatase activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(8): 2908–2916. doi: 10.1210/jc.2013-4102.
9. Mittal S, Gupta P, Malhotra N et al. Serum estradiol as a predictor of success of in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol India* 2014; 64(2): 124–129. doi: 10.1007/s13224-013-0470-7.
10. Prasad S, Kumar Y, Singhal M et al. Estradiol level on day 2 and day of trigger: a potential predictor of the IVF-ET success. *J Obstet Gynaecol India* 2014; 64(3): 202–207.
11. Moraloğlu Ö, Tonguc EA, Özel M et al. The effects of peak and mid-luteal estradiol levels on in vitro fertilization outcome. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 285(3): 857–862. doi: 10.1007/s00404-011-2090-8.
12. Järvelä IY, Pelkonen S, Uimari O et al. Controlled ovarian hyperstimulation leads to high progesterone and estradiol levels during early pregnancy. *Hum Reprod* 2014; 29(11): 2393–2401. doi: 10.1093/humrep/deu223.
13. Kosaka K, Fujiwara H, Yoshioka S et al. Vascular endothelial growth factor production by circulating immune cells is elevated in ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2007; 22(6): 1647–1651.
14. Sutcliffe AG, Williams CL, Jones ME et al. Ovarian tumor risk in women after assisted reproductive therapy (ART); 2.2 million person years of observation in Great Britain. *Fertil Steril* 2015; 104(3): 37.
15. Lutchman Singh K, Davies M, Chatterjee R. Fertility in female cancer survivors: pathophysiology, preservation and the role of ovarian reserve testing. *Hum Reprod Update* 2005; 11(1): 69–89.
16. Jernström H, Lerman C, Ghadirian P, Lynch HT, Weber B, Garber J, Daly M, Olopade OI, Foulkes WD, Warner E, Brunet JS, Narod SA. Pregnancy and risk of early breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2. *Lancet* 1999; 354(9193): 1846–1850.
17. Kotsopoulos J, Librach CL, Lubinski J et al. Infertility, treatment of infertility, and the risk of breast cancer among women with BRCA1 and BRCA2 mutations: a case-control study. *Cancer Causes Control* 2008; 19(10): 1111–1119. doi: 10.1007/s10552-008-9175-0.
18. Familiari G, Caggiati A, Nottola SA et al. Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. *Hum Reprod* 1993; 8(12): 2080–2087.
19. Meirow D, Dor J, Kaufman B et al. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod* 2007; 22(6): 1626–1633.
20. Tham YL, Sexton K, Weiss H et al. The rates of chemotherapy-induced amenorrhea in patients treated with adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide followed by a taxane. *Am J Clin Oncol* 2007; 30(2): 126–132.
21. Fournier MN, Modi S, Panageas KS et al. Incidence of chemotherapy-induced, long-term amenorrhea in patients with breast carcinoma age 40 years and younger after adjuvant anthracycline and taxane. *Cancer* 2005; 104(8): 1575–1579.
22. Swain SM, Land SR, Ritter MW et al. Amenorrhea in premenopausal women on the doxorubicin-and-cyclophosphamide-followed-by-docetaxel arm of NSABP B-30 trial. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 113(2): 315–320. doi: 10.1007/s10549-008-9937-0.
23. Partridge AH, Gelber S, Peppercorn J et al. Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(20): 4174–4183.
24. Blakely LJ, Buzdar AU, Lozada JA et al. Effects of pregnancy after treatment for breast carcinoma on survival and risk of recurrence. *Cancer* 2004; 100(3): 465–469.
25. Mueller BA, Simon MS, Deapen D et al. Childbearing and survival after breast carcinoma in young women. *Cancer* 2003; 98(6): 1131–1140.
26. Cvancarova M, Samuelsen SO, Magelssen H et al. Reproduction rates after cancer treatment: experience from the Norwegian radium hospital. *J Clin Oncol* 2009; 27(3): 334–343. doi: 10.1200/JCO.2007.15.3130.
27. Raphael J, Trudeau ME, Chan K. Outcome of patients with pregnancy during or after breast cancer: a review of the recent literature. *Curr Oncol* 2015; 22 (Suppl 1): 8–18. doi: 10.3747/co.22.2338.
28. Velentgas P, Daling JR, Malone KE et al. Pregnancy after breast carcinoma: outcomes and influence on mortality. *Cancer* 1999; 85(11): 2424–2432.
29. Largillier R, Savignoni A, Gligorov J et al. Prognostic role of pregnancy occurring before or after treatment of early breast cancer patients aged < 35 years: a GET(N)A Working Group analysis. *Cancer* 2009; 115(22): 5155–5165. doi: 10.1002/ncr.24608.
30. Ives A, Saunders C, Bulsara M et al. Pregnancy after breast cancer: population-based study. *BMJ* 2007; 334(7586): 194.
31. Pagani O, Partridge A, Korde L et al. Pregnancy after breast cancer: if you wish, ma'am. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 129(2): 309–317. doi: 10.1007/s10549-011-1643-7.
32. Azim HA Jr, Santoro L, Pavlidis N et al. Safety of pregnancy following breast cancer diagnosis: a meta-analysis of 14 studies. *Eur J Cancer* 2011; 47(1): 74–83. doi: 10.1016/j.ejca.2010.09.007.
33. Sankila R, Heinävaara S, Hakulinen T. Survival of breast cancer patients after subsequent term pregnancy: „healthy mother effect“. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170(3): 818–823.
34. von Schoultz E, Johansson H, Wilking N et al. Influence of prior and subsequent pregnancy on breast cancer prognosis. *J Clin Oncol* 1995; 13(2): 430–434.
35. Upponi SS, Ahmad F, Whitaker IS et al. Pregnancy after breast cancer. *Eur J Cancer* 2003; 39(6): 736–741.
36. Ford D, Easton DF, Stratton M et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998; 62(3): 676–689.
37. Haffty BG, Harrold E, Khan AJ et al. Outcome of conservatively managed early-onset breast cancer by BRCA1/2 status. *Lancet* 2002; 359(9316): 1471–1477.
38. Metcalfe K, Lynch HT, Ghadirian P et al. Contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol* 2004; 22(12): 2328–2335.
39. Seynaeve C, Verhoog LC, van de Bosch LM et al. Ipsilateral breast tumour recurrence in hereditary breast cancer following breast-conserving therapy. *Eur J Cancer* 2004; 40(8): 1150–1158.
40. O'Donovan PJ, Livingston DM. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis* 2010; 31(6): 961–967. doi: 10.1093/carcin/bgq069.
41. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003; 302(5645): 643–646.
42. Andrieu N, Goldgar DE, Easton DF et al. Pregnancies, breast-feeding, and breast cancer risk in the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study (IBCCS). *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(8): 535–544.
43. Rzepka-Górska I, Tarnowski B, Chudecka-Głaz A et al. Premature menopause in patients with BRCA1 gene mutation. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100(1): 59–63.
44. Oktay K, Kim JY, Barad D et al. Association of BRCA1 mutations with occult primary ovarian insufficiency: a possible explanation for the link between infertility and breast/ovarian cancer risks. *J Clin Oncol* 2010; 28(2): 240–244. doi: 10.1200/JCO.2009.24.2057.
45. Valentini A, Lubinski J, Byrski T et al. The impact of pregnancy on breast cancer survival in women who carry a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 142(1): 177–185. doi: 10.1007/s10549-013-2729-1.
46. Dow KH, Kuhn D. Fertility options in young breast cancer survivors: a review of the literature. *Oncol Nurs Forum* 2004; 31(3): 46–53.
47. Cardonick E, Gilmandyar D, Somer RA. Maternal and neonatal outcomes of dose-dense chemotherapy for breast cancer in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2012; 120(6): 1267–1272. doi: 10.1097/AOG.0b013e31826c32d9.
48. Elliott P. Pathogenesis of cardiotoxicity induced by anthracyclines. *Semin Oncol* 2006; 33 (3 Suppl 8): 2–7.
49. van Dalen EC, van der Pal HJ, van den Bos C et al. Clinical heart failure during pregnancy and delivery in a cohort of female childhood cancer survivors treated with anthracyclines. *Eur J Cancer* 2006; 42(15): 2549–2553.
50. Azim HA Jr, Belletini G, Gelber S et al. Breast-feeding after breast cancer: if you wish, madam. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 114(1): 7–12. doi: 10.1007/s10549-008-9983-7.
51. Azim HA Jr, Belletini G, Liprott SJ et al. Breastfeeding in breast cancer survivors: pattern, behaviour and effect on breast cancer outcome. *Breast* 2010; 19(6): 527–531. doi: 10.1016/j.breast.2010.05.018.
52. Cardoso F, Loibl S, Pagani O et al. The European Society of Breast Cancer Specialists recommendations for the management of young women with breast cancer. *Eur J Cancer* 2012; 48(18): 3355–3377. doi: 10.1016/j.ejca.2012.10.004.
53. Coyne K, Purdy M, O'Leary K et al. Challenges and considerations in optimizing ovarian stimulation protocols in oncofertility patients. *Front Public Health* 2014; 2: 246. doi: 10.3389/fpubh.2014.00246.
54. Pavone ME, Hirschfeld-Cytron J, Lawson AK et al. Fertility preservation outcomes may differ by cancer diagnosis. *J Hum Reprod Sci* 2014; 7(2): 111–118. doi: 10.4103/0974-1208.138869.
55. Comtet M, Sonigo C, Valdelièvre C et al. Fertility preservation in breast cancer patients: the state of art in 2014. *Bull Cancer* 2015; 102(5): 443–453. doi: 10.1016/j.bulcan.2015.01.008.
56. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Fertility preservation and pregnancy in women with and without BRCA mutation-positive breast cancer. *Oncologist* 2012; 17(11): 1409–1417. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0236.
57. Sagi M, Weinberg N, Eilat A et al. Preimplantation genetic diagnosis for BRCA1/2 – a novel clinical experience. *Prenat Diagn* 2009; 29(5): 508–513. doi: 10.1002/pd.2232.
58. Cullinane CA, Lubinski J, Neuhausen SL et al. Effect of pregnancy as a risk factor for breast cancer in BRCA1/BRCA2 mutation carriers. *Int J Cancer* 2005; 117(6): 988–991.
59. Meirow D, Raanani H, Maman E et al. Tamoxifen co-administration during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization in breast cancer patients increases

- the safety of fertility-preservation treatment strategies. *Fertil Steril* 2014; 102(2): 488–495. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.05.017.
60. Turan V, Bedoschi G, Moy F et al. Safety and feasibility of performing two consecutive ovarian stimulation cycles with the use of letrozole-gonadotropin protocol for fertility preservation in breast cancer patients. *Fertil Steril* 2013; 100(6): 1681–1685. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.08.030.
61. Revelli A, Porcu E, Levi Setti PE et al. Is letrozole needed for controlled ovarian stimulation in patients with estrogen receptor-positive breast cancer? *Gynecol Endocrinol* 2013; 29(11): 993–996.
62. Muñoz E, González N, Muñoz L et al. Ovarian stimulation in patients with breast cancer. *Ecanermedical science* 2015; 9: 504. doi: 10.3332/ecancer.2015.504.
63. Reddy J, Oktay K. Ovarian stimulation and fertility preservation with the use of aromatase inhibitors in women with breast cancer. *Fertil Steril* 2012; 98(6): 1363–1369. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.022.
64. Huang JY, Chian RC, Gilbert L et al. Retrieval of immature oocytes from unstimulated ovaries followed by in vitro maturation and vitrification: a novel strategy of fertility preservation for breast cancer patients. *Am J Surg* 2010; 200(1): 177–183. doi: 10.1016/j.amjsurg.2009.04.004.
65. Oktay K, Economos K, Kan M et al. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA* 2001; 286(12): 1490–1493.
66. Oktay K, Buyuk E, Veeck L et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 363(9412): 837–840.
67. Hüttelová R, Kleibl Z, Řezáčová J et al. Předpoklady pro preimplantační genetickou diagnostiku (PGD) u nosičů mutací v predispozičních nádorových genech. *Klin Onkol* 2009; 22 (Suppl): 69–74.
68. Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J et al. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010; 94(5): 1700–1706. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.015.
69. Handyside AH, Harton GL, Mariani B et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 2010; 47(10): 651–658. doi: 10.1136/jmg.2009.069971.
70. Natesan SA, Bladon AJ, Coskun S et al. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet Med* 2014; 16(11): 838–845. doi: 10.1038/gim.2014.45.
71. Kuliev A, Rechitsky S. Polar body-based preimplantation genetic diagnosis for Mendelian disorders. *Mol Hum Reprod* 2011; 17(5): 275–285. doi: 10.1093/molehr/gar012.