



Ovarian tissue cryopreservation as a perspective for fertility preservation

Artur J. Jakimiuk^{1,2}, Anna Fritz²

¹ Polish Academy of Sciences Medical Research Center, Warsaw/ II Dept. of Gyn, University School of Medicine, Lublin,

² Dept. of Ob/Gyn, Central Clinical Hospital of Ministry of Interior and Administration, Warsaw, Poland

Summary

In 2004 the first livebirth after cryopreserved ovarian tissue transplantation has been reported which is a turning point in fertility preservation after anticancer treatment and a result of almost 50 years of research. However transplantation of cryopreserved ovary is still experimental method and further study needs to be done on the risk of cancer cell reimplantation, this method is very promising for cancer patients who wants to preserve fertility after cancer treatment. This is a review of methods used for cryopreserved ovarian tissue transplant.

(Pol J Endocrinol 2005; 6(56): 998-1001)

Key words: cryopreservation, ovary, fertility

Krioprezerwacja tkanki jajnikowej – szansa na zachowanie płodności

Artur J. Jakimiuk^{1,2}, Anna Fritz²

¹ Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa/II Klinika Ginekologii AM, Lublin,

² Klinika Położnictwa i Ginekologii CSK MSWiA w Warszawie

Streszczenie

Urodzenie dziecka w 2004 roku przez pacjentkę, u której z powodu choroby nowotworowej w okresie remisji przeszczepiono własną tkankę jajnikową, stanowi przełom w badaniach nad zachowaniem płodności po leczeniu przeciwnowotworowym. Jest ono wynikiem ponad 50-letnich badań nad tym zagadnieniem. Co prawda krioprezerwacja i przeszczepianie tkanki jajnikowej nadal stanowią metodę eksperymentalną, konieczne są szczególnie szersze badania nad ryzykiem reimplantacji komórek nowotworowych pacjentkom w okresie remisji choroby, jednak jest to niezwykle istotny krok w staraniach nad przywróceniem płodności tej grupie pacjentek. W poniższej pracy przedstawiono ogólną zasadę krioprezerwacji tkanki jajnikowej oraz dotychczasowe osiągnięcia w tej dziedzinie.

(Endokrynol Pol 2005; 6(56): 998-1001)

Słowa kluczowe: krioprezerwacja, jajnik, płodność



Artur J. Jakimiuk
Klinika Położnictwa i Ginekologii CSK MSWiA
Ul. Wołoska 137
02-507 Warszawa
tel. (22) 508 11 20
e-mail: jakimiuk@yahoo.com

Krioprezerwacja tkanki jajnikowej stanowi nową, obiecującą metodę zachowania płodności u młodych dziewcząt i kobiet leczonych z powodu choroby nowotworowej.

Celem krioprezerwacji tkanki jajnikowej jest przywrócenie płodności po leczeniu z powodu choroby nowotworowej, a także leczeniu chorób autoimmunologicznych, z zastosowaniem radioterapii i chemioterapii [7].

Przedwczesne wygasanie funkcji jajników (premature ovarian failure - POF) jest znanym od dawna efektem ubocznym leków stosowanych w chemioterapii nowotworów, jednak w ostatnich latach, w wyniku postępów w leczeniu onkologicznym, coraz więcej młodych pacjentek zostaje wyleczonych z choroby nowotworowej i wkracza w dorosłe życie z problemem niepłodności po leczeniu [3, 7, 8].

Głównym czynnikiem mającym wpływ na wystąpienie POF jest całkowita dawka leków cytotoksycznych przyjętych przez pacjentkę [7].

Zmiany histologiczne stwierdzane w jajnikach po leczeniu przeciwnowotworowym wahają się od jedynie niewielkiego zmniejszenia liczby pęcherzyków, aż do całkowitego braku pęcherzyków z równoczesnym włóknieniem jajnika [7].

Chapman i wsp. [1] stwierdzili, że u 69% kobiet (w wieku do 29 lat) i aż u 96% (w wieku ponad 30 lat) występuje niewydolność jajników po chemioterapii z powodu choroby Hodgkina, natomiast jeżeli jajniki uległy ekspozycji na promieniowanie w dawce >300 cGy to u ponad 60% kobiet występuje trwała niewydolność jajników po radioterapii [2].

Od wielu lat badane są metody umożliwiające zachowanie płodności po agresywnym leczeniu przeciwnowotworowym. Obecnie stosowane są następujące metody ochrony gonad w okresie terapii przeciwnowotworowej: ochrona farmakologiczna, czyli stosowanie doustnej antykoncepcji a także agonistów GnRH oraz progesteronu; chirurgiczna transpozycja jajnika w miejsce nie podlegające ekspozycji na promieniowanie, a także krioprezerwacja oocytów (niedojrzałych i dojrzałych), embryonów i tkanki jajnikowej [7].

Pierwsze doświadczenia z krioprezerwacją jajników przeprowadzono w latach 50-tych XX wieku na myszach i szczurach [4, 9]. W 1960 r. po raz pierwszy uzyskano zdrowe potomstwo od myszy po owariektomii, a następnie przeszczepie krioprezerwowanej tkanki jajnikowej w miejsce ortotopowe [10]. W kolejnych latach przeprowadzono badania na modelu zwierzęcym, w tym między innymi na owcach, a także naczelnymi.

W 1994 roku Gosden opublikował pracę, w której opisał model przeszczepiania jajnika po krioprezerwacji i rozmrażaniu stosowany u owcy. Wybór owcy, jako modelu zwierzęcego podyktowany był podobieństwem anatomicznym między nią a ludźmi. Badano przetrwanie pęcherzyków

jajnikowych po zamrożeniu, a następnie rozmrożeniu, zachowanie funkcji endokrynnych przeszczepionej gonady oraz przywrócenie płodności po przeszczepie rozmrożonych pasków z kory jajnika owcy [5].

W badaniach na naczelnymi stwierdzono z kolei, że u dwóch z czterech małp, u których przeprowadzono przeszczep autologiczny podskórnie krioprezerwowanych jajników poza obręb miednicy mniejszej zachowana została funkcja jajników przez okres 9 miesięcy po operacji wycięcia gonad [7].

Od lat 90-tych XX wieku prowadzone były badania nad zastosowaniem tej metody u ludzi. W marcu 2004 Oktay i wsp. [8] opisał pierwszy przeszczep zamrożonej, a następnie rozmrożonej tkanki jajnikowej (paski z kory jajnika) u kobiety, w wyniku czego uzyskano komórkę jajową. Od 30-letniej kobiety z rakiem sutka przed chemioterapią, której skutkiem była przedwczesna menopauza, pobrano i zamrożono tkankę jajnikową. Następnie w 6 lat po krioprezerwacji tkanka jajnikowa została rozmrożona i przeszczepiona w powłoki brzuszne pacjentki. Przeprowadzono stymulację tkanki jajnikowej przy użyciu FSH i ludzkich gonadotropin menopauzalnych, a następnie stosowano rekombinowaną ludzką gonadotropinę kosmówkową; w każdym cyklu stosowano także suplementację progesteronu. Uzyskaną komórkę jajową pobrano i przeprowadzono zabieg IVF-ICSI, w wyniku którego uzyskano dwa embryony. Jeden z nich wykazywał nieprawidłową budowę i jego rozwój zatrzymał się na stadium trzech komórek, natomiast drugi embryon w dobę po zapłodnieniu, posiadający prawidłową, czterekomórkową budowę, został przeniesiony do jamy macicy pacjentki. Niestety nie uległ on zagnieżdżeniu i nie uzyskano ciąży.

Przełomowe doniesienie opublikował Donnez i wsp. [3] w 2004 roku uzyskując pierwsze żywo urodzone dziecko po ortotopowym przeszczepie krioprezerwowanej tkanki jajnikowej u ludzi. Pacjentką była 25-letnia kobieta, u której w 1997 roku przeprowadzono krioprezerwację tkanki jajnikowej przed chemioterapią z powodu choroby Hodgkina. Po przeprowadzonej następnie chemioterapii i radioterapii wystąpił u niej wtórny brak miesiączki (stężenia FSH, LH i estradiolu potwierdzały kastrację). W grudniu 2002 roku, w porozumieniu z onkologami (potwierdzającymi remisję choroby), zdecydowano o reimplantacji krioprezerwowanej tkanki jajnikowej. Na 7 dni przed reimplantacją przeprowadzono pierwszą laparoskopię w celu wytworzenia otworu w otrzewnej, w którym umieszczony zostanie przeszczep oraz indukcji angiogenezy w tym miejscu. Krioprezerwowana tkanka jajnikowa została rozmrożona i w trakcie kolejnej laparoskopii umieszczona w wytworzonym okienku otrzewnej w sąsiedztwie naczyń jajnikowych i strzępków jajowodu po stronie prawej. W 4 miesiące po reimplantacji

przeprowadzono trzecią laparoskopię w celu oceny przeszczepu, sprawdzenia czy nie ma nieprawidłowych rozrostów komórkowych, także w trakcie tego zabiegu przeszczepiono pozostałe fragmenty krioprezwowanej tkanki jajnikowej. W okresie od 5 do 9 miesiąca po zabiegu w badaniach ultrasonograficznych stwierdzano rozwój pęcherzyków jajnikowych z następowym powstawaniem ciała żółtego w każdym cyklu miesięcznym po stronie reimplantowanej tkanki jajnikowej. W 10 miesiącu po reimplantacji pacjentka zaszła w ciążę, która zakończyła się porodem o czasie. Urodziła się zdrowa dziewczynka (9 punktów w skali Apgar) o masie 3720g .

Pomimo uzyskania pomyślnych wyników w zastosowaniu tej metody u ludzi pozostaje nadal otwarta kwestia ryzyka związanego z jej stosowaniem. Krioprezewacja tkanki jajnikowej, a następnie jej przeszczepianie może powodować między innymi wystąpienie po przeszczepie reakcji autoimmunologicznej przeciw przeszczepionej tkance jajnikowej. Z kolei, między innymi Gosden i wsp. [6] oraz Shaw i wsp. [12], podnieśli kwestię potencjalnego przeszczepienia złośliwych komórek nowotworowych, obecnych w zamrożonej tkance, pacjentkom w remisji choroby. Istnieje także obawa infekcji wirusowych (wirusem obecnym w przeszczepianej tkance), szczególnie wirusami powolnymi [6, 7, 12].

Pomimo wszystkich tych obaw niewątpliwie jest to metoda obiecująca, jednak wymaga ona wielu badań, szczególnie w celu doskonalenia techniki pobierania, przechowywania, rozmrażania a także implantacji pobranej tkanki jajnikowej.

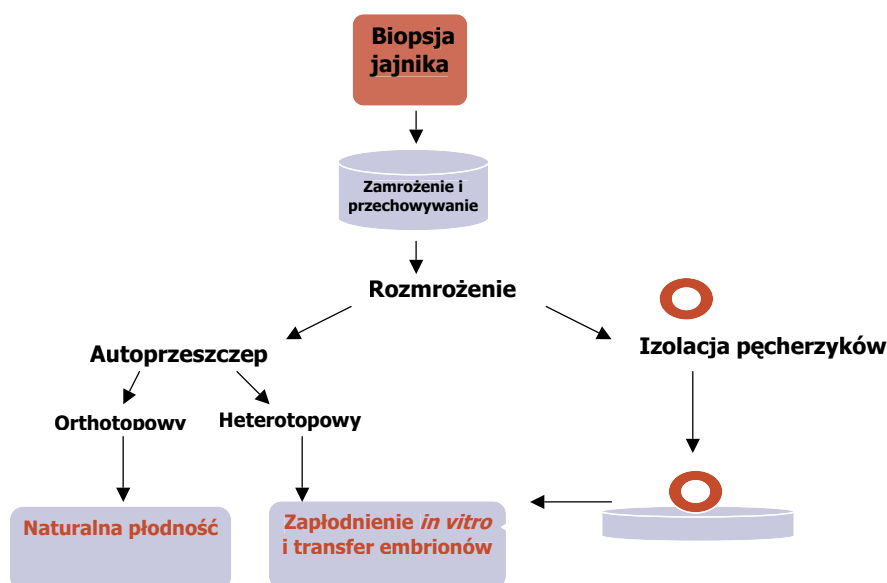
Ogólnie zasada krioprezewacji tkanki jajnikowej, przeprowadzonej przez Donneza, polega na pobraniu fragmentu jajnika, i następnie uzyskaniu z kory jajnika cienkich pasków oraz umieszczeniu

ich w ciekłym azocie. Po odpowiednim czasie, poddawane zostają one procedurze rozmrożenia i przeszczepione pacjentce [7].

Docelowo unaczynioną i nieunaczynioną tkankę jajnikową przeszczepia się w miejsce ortotopowe (w miednicy) lub heterotopowe: podskórną na przedramieniu, okolicy miednicy oraz pod powłokami brzuszными [3, 7].

Teoretycznie możliwe jest, w przypadku przeszczepu ortotopowego, uzyskanie ciąży w sposób naturalny, lub konieczne jest przeprowadzenie procedury IVF. Również po rozmrożeniu, z uzyskanych fragmentów tkanki jajnikowej, także na razie teoretycznie, możliwe jest przeprowadzenie izolacji pęcherzyków jajnikowych w warunkach laboratoryjnych i następnie przeprowadzenie procedury IVF, jednak ta metoda nadal pozostaje w sferze badań (Ryc. 1).

Zamrażanie dużych fragmentów tkanki jajnikowej oraz całych jajników stanowi problem techniczny z powodu trudności z odpowiednią dyfuzją środków konserwujących oraz uszkodzeniem naczyń spowodowanym przez wewnętrzne powstawanie lodu. Ponadto znaczna utrata pęcherzyków, występuje w czasie fazy niedokrwienia przeszczepianej tkanki jajnikowej, aż do momentu powstania nowych naczyń krwionośnych [11, 13]. Szybkie zapewnienie dopływu krwi do rozmrożonych całych jajników chroni je przed masywną utratą pęcherzyków związaną z fazą niedokrwienia i pozwala na powrót pełnej funkcji jajnika, co udowodniono w badaniach na owcach [13]. Pomimo stwierdzanych zmian udowodniono na modelu zwierzęcym oraz na ludziach, że zamrożony, a następnie rozmrożony przeszczep allogeniczny jajnika umożliwia powrót płodności nawet po długim okresie czasu, pomimo znacznej redukcji całkowitej liczby pęcherzyków [11, 13].



Ryc. 1 Procedura krioprezewacji oraz transplantacji tkanki jajnika

Wnioski

Krioprezewacja jajników i ich przeszczepianie doprowadziło do wystąpienia owulacji, ciąży i urodzenia żywego, zdrowego potomstwa wśród badanych myszy, szczurów, owiec, myszy oraz ostatnio ludzi.

Zachowanie płodności powinno stać się w przyszłości integralną częścią leczenia chorób nowotworowych, ponieważ wśród osób wyleczonych niepłodność stanowi poważny problem społeczny i osobisty.

Ryzyko przeniesienia komórek nowotworowych wraz z reimplantowaną tkanką jajnikową wymaga bardzo starannego doboru potencjalnych pacjentek, u których planuje się stosowanie tej metody leczenia.

Piśmiennictwo

1. Chambers S.K., Chambers J.T., Kier R., Peschel R.E. Sequelae of lateral ovarian transposition in irradiated cervical cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1991;20:1305-8
2. Chapman R.N., Sutcliffe S.B., Malpas J.S., Cytotoxic - induced ovarian failure in Hodgkin disease hormone function. *JAMA* 1979;242:1877-81
3. Donnez J., Dalmans M.M., Demylle D. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405-10
4. Deansley R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *J. Endocrinol.* 1954;11:197-200
5. Gosden R.G., Baird D.T., Wade J.C. et al. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C . *Hum. Reprod.* 1994;9:597-603
6. Gosden R.G., Rutherford A.J., Rutherford D.R. Transmission of malignant cells in ovarian grafts. *Hum. Reprod.* 1997; 12:403
7. Newton H. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preventing the fertility of cancer patients. *Hum. Reprod. Update* 1998;4:237-47
8. Oktay K., Buyuk E., Veeck L. et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:172-7
9. Pakes A.S., Smith A.U. Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. *Proc. R. Soc. Lond.* 1953;140B:455-67
10. Parrot D.M.V. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J. Reprod. Fertil.* 1960; 1:230-41
11. Salle B., Demirci B., Franc M. et al. Long term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertility and Sterility* 2003;80:172-7
12. Shaw J., Trounson A. Oncological implication in the replacement of ovarian tissue. *Hum. Reprod.* 1997;12:403-405
13. Wang X., Huifang C., Hang Y. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002;415:385