

## *Zamrzovanje gamet in tkiva jajčnika za ohranitev plodne sposobnosti pri onkoloških bolnicah*

**Martina Ribič-Pucelj in Irma Virant-Klun**

Eden največjih napredkov na področju zunajtelesne oploditve je nedvomno razvoj laboratorijskih postopkov, s katerimi je mogoče uspešno zamrzniti/odmrzniti genetski material. Ti dosežki pa nimajo velikega pomena le v zdravljenju neplodnosti, temveč so postali izredno pomembni tudi v onkologiji. Sodobni diagnostični postopki in načini zdravljenja raka pri otrocih in mladih ženskah v reproduktivnem obdobju so namreč pomembno izboljšali preživetje teh bolnic. Poleg visoke stopnje preživetja pa je pogosto posledica tega zdravljenja prezgodnja menopavza zaradi kirurške odstranitve jajčnikov, radiološke kastracije ali kemoterapije, ki če že ne povzroči dokončne kastracije, v večji ali manjši meri lahko okvari gamete (1). Medtem ko je zamrzovanje/odmrzovanje spermijev že dolga leta uveljavljen postopek za ohranitev plodne sposobnosti pri moških z rakom, zlasti tistih s seminomom, pa je zamrzovanje/odmrzovanje genetskega materiala pri ženskah z rakom dosežek novejšega datuma. Do nedavnega so te bolnice prišle do otroka le s posvojitvijo, do zaželene nosečnosti pa v novejšem času le v postopku zunajtelesne oploditve z darovano jajčno celico. Izkušnje in napredek pri tehnikah asistirane reprodukcije pa danes z uspešno tehniko zamrzovanja/odmrzovanja omogočajo ohranjanje lastnih gamet, s katerimi je mogoče po ozdravljenju doseči zanositev.

Indikacija za ohranjanje zamrznjenih gamet so sistemske bolezni (Hodgkinov in drugi limfomi ter levkemije), ginekološki malignomi (rak jajčnika nizke stopnje malignosti, enostranski rak jajčnika v stadiju 1A1 in zgodnji rak materničnega vratu), rak dojke, ščitnice, sakralni tumorji ter rak sigme in danke (2). Ker so postopki pridobivanja jajčnih celic in tkiva jajčnika sorazmerno invazivni in bolnice resno bolne, je treba indikacijo za poseg za vsako bolnico posebej resno pretehtati skupaj z onkologom. Upoštevati je treba vrsto malignoma in stadij, načrtovani način zdravljenja in prognozo ter morebitni učinek obsevanja na maternico. Poleg tega je pomembna tudi starost bolnic, ki naj ne bi bile starejše od 38 let.

Pri ženskah je mogoče zamrzniti in shraniti zarodke, jajčne celice in tkivo jajčnika.

Jajčno celico za zamrznitev oziroma za oploditev in zamrznitev zarodkov je mogoče pridobiti v naravnem ciklu, vendar pa pridobitev ene same celice močno zmanjšuje možnosti za poznejši uspeh in nosečnost, zato se jajčne celice praviloma pridobivajo v postopku nadzorovane hiperstimulacije jajčnikov s humanimi oziroma v novejšem času z rekombinantnimi gonadotropini. Uporabljata se dva načina nadzorovane hiperstimulacije jajčnikov, in sicer dolgi in kratki protokol. Pri dolgem protokolu s

petnajstdnevno uporabo gonadoliberinov (analogov GnRH) povzročimo desenzibilizacijo jajčnikov, čemur sledi v povprečju desetdnevno spodbujanje ovulacije z gonadotropini. Čeprav je način uspešen, je zaradi dolgotrajnosti postopka neugoden za bolnice z rakom, ker je začetek predvidene kemo-/radioterapije oziroma operativnega posega odložen za najmanj šest tednov. Po uspešnosti je primerljiv novejši kratki protokol, pri katerem se začne ovulacija spodbujati z gonadotropini drugi dan menstruacije, rast foliklov se spremlja z vaginalno ultrazvočno preiskavo, ko pa so folikli veliki 13 do 14 mm, se začnejo dodajati gonadoliberini (GnRH antagonist cetorelix) za preprečitev prezgodnjega vrha LH (3). Ovulacija se sproži s 5000 do 10000 I. U. humanega horionskega gonadotropina, ko so folikli veliki od 20 do 22 mm, po dvaintridesetih urah pa sledi aspiracija foliklov z vaginalno, ultrazvočno vodeno punkcijo v lokalni narkozi. Postopek traja povprečno le dvanajst dni in poteka ambulantno.

Čeprav uspešnost prenosa zamrznjenih/odmrznjenih zarodkov presega 30 % na prenos, zlasti odkar se prenašajo v stadiju blastociste (4), pa je žal to možnost le za ženske, ki imajo partnerje, ne pa za deklice in mladostnice, pri katerih pride v poštev le zamrzovanje jajčnih celic in tkiva jajčnika. Pri ženskah, ki imajo po končanem zdravljenju ohranjen menstruacijski cikel, se prenesejo zarodki v naravnem ciklu, pri tistih, pri katerih je nastopila menopavza, pa se endometriji pripravi z nadomestnim hormonskim zdravljenjem. Na Ginekološki kliniki v Ljubljani je **bil prvi prenos zarodkov pri bolnici zdravljeni zaradi raka dojke opravljen marca 2005.**

Čeprav se je prvi otrok iz zamrznjene/odmrznjene jajčne celice rodil že leta 1987, pa so se do nedavnega pojavljali številni pomisleki o upravičenosti zamrzovanja jajčnih celic. Eden od teh je bila uporaba dolgega protokola spodbujanja ovulacije za pridobitev jajčnih celic, ki pa se z uvedbo antagonistov GnRH vedno bolj umika kratkemu. Pomembnejše pa so bile ugotovitve laboratorijskih raziskav. Ugotovili so, da zamrzovanje močno vpliva na cono pelucido in jo otrdi, da zamrzovanje povzroči depolimerizacijo delitvenega vretena in da pride do okvare celičnega skeleta, kar zmanjšuje možnost uspešne oploditve ter lahko pri potomcih povzroči nepravilosti in malformacije (5). Vse te ugotovitve pa so danes že ovržene, saj je po izboljšanju postopkov zamrzovanja postalo zamrzovanje jajčnih celic klinična praksa in se vrstijo poročila o rojstvih zdravih otrok (6), tudi na Ginekološki kliniki v Ljubljani.

Pridobitev zrele jajčne celice, sposobne za oploditev iz tkiva zamrznjenega tkiva jajčnika, je še vedno predmet

številnih kliničnih in laboratorijskih raziskav, vendar pa shranjevanje tkiva jajčnika pred uvedbo kemo-/radioterapije in pri kirurški odstranitvi jajčnikov nedvomno predstavlja možnost dolgoročnega ohranjanja plodne sposobnosti ter manj nevarnosti za genetske nepravilnosti pri potomcih (7, 8). Prednost zamrzovanja tkiva jajčnika je predvsem v tem, da tkivo izredno dobro prenese tako zamrzovanje kot odmrzovanje in da vsebuje mm<sup>2</sup> ovarijske skorje 30 do 35 primordijalnih foliklov, kar je bistveno več, kot jih pridobimo s spodbujanjem ovulacije (9). Slaba stran shranjevanja tkiva jajčnika je, da je postopek odvzema invaziven (kirurški poseg), da še ni povsem razjasnjen postopek za pridobivanje zrelih jajčnih celic – ali s avtotransplantacijo, heterotransplantacijo ali z zorenjem foliklov in vivo oziroma in vitro. Čeprav so poskusi na živalih spodbudni, junija 2004 pa je Donnez na kongresu ESHRE v Berlinu že objavil prvo klinično nosečnost pri onkološki bolnici po avtotransplantaciji tkiva jajčnika, ostaja zamrzovanje tkiva jajčnika bolj stvar bližnje prihodnosti kot sedanjosti. Kljub temu rezultati dosedanjih raziskav nedvomno opravičujejo postopek in ustvarjanje bank za shranjevanje tkiva, zlasti pri zelo mladih bolnicah.

## Rezultati

Na Ginekološki kliniki v Ljubljani, na Kliničnem oddelku za reprodukcijo, smo v obdobju od leta 2001 do 2005 pred uvedbo kemo-/radioterapije in pri kirurški odstranitvi jajčnikov zamrznili in shranili genetski material 12 onkoloških bolnic. Vse postopke je odobril Konzilij za postopke oploditve z biomedicinsko pomočjo Ginekološke klinike v sodelovanju z lečečim onkologom. Indikacija za postopek je bila pri osmih bolnicah mejno maligni tumor jajčnika, pri eni rak dojke, pri eni limfom, pri eni možganski tumor in pri eni bolnici rak danke. Povprečna starost bolnic je bila 27 (20 do 35) let. Vrsto in število zamrznjenega genetskega materiala prikazuje Razpredelnica 1.

### Razpredelnica 1.

| Vrsta genetskega materiala      | Št. bolnic | Št. vseh gamet (tkiva) |
|---------------------------------|------------|------------------------|
| Zarodki                         | 3          | 8                      |
| Jajčne celice                   | 4          | 42                     |
| Tkivo jajčnika                  | 3          | 3                      |
| Jajčne celice in tkivo jajčnika | 2          | 5 (2)                  |
| <b>Skupaj</b>                   | <b>12</b>  | <b>55 (5)</b>          |

Pri devetih bolnicah smo pridobili celice oziroma zarodke v desetih ciklih – devetih spodbujenih, enem spontanem – pri eni bolnici pa je bila pridobljena zrela jajčna celica iz tkiva odstranjenega jajčnika. Od devetih spodbujenih ciklov smo v treh uporabili dolgi protokol (GnRH analoge in gonadotropine), v šestih pa kratkega (gonadotropine in antagonist cetrorelix). Tkivo jajčnika je bilo pridobljeno pri kirurški odstranitvi jajčnikov. Prenos prvih zarodkov je predviden marca 2005.

## Sklep

Za zdaj so poročila o nosečnostih iz zamrznjenega/odmrznjenega genetskega materiala pri

onkoloških bolnicah redka. Glavni razlog je, da je postopek še sorazmerno nov, da so številne bolnice še zelo mlade in še ne načrtujejo nosečnosti ter da je po končanem zdravljenju navadno potrebno nekaj let, da bolnico obravnavamo kot ozdravljeno in sposobno za nosečnost. Glede na dobre klinične rezultate in vedno številnejša poročila o rojstvu zdravih, živorojenih otrok iz zamrznjenih/odmrznjenih jajčnih celic pri neplodnih bolnicah (tudi na Ginekološki kliniki v Ljubljani) je zamrzovanje jajčnih celic nedvomno upravičeno pri bolnicah, ki želijo ohraniti plodno sposobnost in še nimajo partnerja, še zlasti ker se z uporabo kratkega protokola čas od postavitve diagnoze do načrtovane kemo-/radioterapije pomembno ne podaljša. Zelo verjetno pa je, da je prihodnost v zamrzovanju tkiva jajčnika, zlasti pri deklicah in mladostnicah in bolnicah, pri katerih je treba zaradi malignoma jajčnik kirurško odstraniti. Shranjevanje genetskega materiala za onkološke bolnice ne pomeni zgolj realne možnosti, da bodo po ozdravljenju lahko imele lastnega otroka, temveč tudi močno psihološko podporo. Na žalost se postopek preredko omogočajo mladim bolnicam, kar je razvidno iz naših rezultatov. Glavni razlog za to je, kljub našim naporom, predvsem premajhna seznanjenost zdravnikov, s tem pa tudi bolnic, saj jih ne seznanijo z možnostjo shranitve lastnega genetskega materiala.

## Viri

1. Chapman RM, Sutcliffe S, Malpas JS. Cytotoxic-induced Ovarian Failure in Women With Hodgkin's Disease. *JAMA* 1977; 242: 1877–81.
2. Donnez J, Godin PA, Nisolle M. Gonadal cryopreservation in the young patient with gynecological malignancy. *Current Opinion in Obstet Gynaecol* 2000; 12: 1-9.
3. Sauer MV, Thornton MH 2nd, Schoolcraft W, et al. Comparative efficacy and safety of cetrorelix with or without mid-cycle recombinant LH and leuprolide acetate for inhibition of premature LH surge in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2004; 9 (5): 487–93.
4. Virant-Klun I, Tomažević T, Bačar-Kermavner L, et al. Successful freezing and thawing of blastocysts cultured in sequential media, using a modified method. *Fertil Steril* 2003; 79 (6): 1428–33.
5. Trounson A, Kirby C. Problems in the cryopreservation of the unfertilized eggs by slow cooling in dimethyl-sulfoxide. *Fertil Steril* 1989; 52: 778–86.
6. Fossas N, Marina F, Torres PJ, et al. The births of five Spanish babies born from cryopreserved donated oocytes. *Hum Reprod* 2003; 18 (7): 1417–21.
7. Fabbri R, Venturoli S, Iannascoli C, et al. Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation. *Gynecol Oncol* 2003; 89 (2): 259–2.
8. Smitz J, Cortvrindt R. Oocyte in-vitro maturation and follicle culture: current clinical achievements and future directions. *Hum Reprod* 1999; 14 (suppl.): 145–61.
9. Meirou D, Fasouliotis S, Nugent N, et al. A laparoscopic technique for obtaining ovarian cortical specimens for fertility conservation in patients with cancer. *Fertil Steril* 1999; 71: 948–51.