

PLODNA SPOSOBNOST BOLNIKOV Z MALIGNIMI TUMORJI NA GONADAH PO INTENZIVNEM ONKOLOŠKEM ZDRAVLJENJU

Primož Reš, Darja Kastelic, Marjeta Stanovnik

Uvod

S hitrim razvojem znanosti in tehnike se spreminjajo tudi naše navade in način življenja. Odkrivamo nove bolezni ter nov način in možnosti zdravljenja. Tudi na področju reprodukcije človeka odkrivamo stalno nova spoznanja in nove uspešnejše načine zdravljenja neplodnosti v zakonu. O neplodnosti govorimo, če po enem letu rednih spolnih odnosov brez uporabe kontracepcije ne pride do nosečnosti. Po iskanju vzrokov ugotovimo, da je pri 30 % vzrok na strani moža. Možnosti zdravljenja moške neplodnosti so različne in bolj ali manj uspešne. V nekaterih primerih pride v poštev le preventiva.

Vzroki za neplodnost so različni, med njimi tudi tako imenovani iatrogeni. Sem spadajo tudi mladi moški v plodnem obdobju po agresivnem onkološkem zdravljenju, kot so obsevanje, kemoterapija in radikalne operacije, ki pripeljejo do hude okvare germinativnega epitela seminalnih stebričkov v testisih, česar posledica je pri večini popolna neplodnost (1). Reševanje njihove težave je preventivni ukrep, in sicer konzerviranje semenskega izliva (SI) s pomočjo globokega zamrzovanja v tekočem dušiku pred izvedbo onkološkega zdravljenja. Globoko zamrzovanje semenskega izliva je edina dokazano uspešna metoda preprečevanja neplodnosti pri mladih moških s temi malignimi obolenji (2).

V naših ambulantah za neplodnost so se po letu 1970 med drugimi začele pojavljati žene, katerih možje so bili uspešni ozdravljenci po malignomih.

Rezultati naših analiz so pokazali, da imajo bolniki kvalitetno zelo slab semenski izliv ali celo azoospermijo ali pa so brez semenskega izliva, kar je pogosten pojav po radikalni limfadenektomiji (LDN). Večina takih zakoncev se je odločila za heterologno artificialno inseminacijo, tj. umetno osemenitev s tujo spermo. Zakonca sta dobila otroka, vendar so prav taki primeri dali povod za preventivno akcijo, da bi pred začetnim agresivnim onkološkim zdravljenjem semenski izliv konzervirali z globokim zamrzovanjem v tekočem dušiku. V ta namen smo ga prvič konzervirali leta 1978 pri bolniku s seminomom. To je bil začetek načrtovane skupne akcije Inštituta za načrtovanje družine in Onkološkega inštituta v Ljubljani. Od tedaj dalje smo tako skušali preventivno zajeti vse mlade moške, ki v času odkritja bolezni še niso imeli družine. Predhodne študije prikazujejo konzerviranje semenskega izliva pred začetkom onkološkega zdravljenja in uspešno uporabo odmrznjenih vzorcev za umetno oploditev in rojstvo zdravih otrok (3).

Metabolni procesi globoko zamrznjenega semenskega izliva praktično mirujejo, zato lahko tako konzervirane vzorce bolj ali manj uspešno uporabimo čez nekaj let, ko zakonca načrtujeta družino.

Poznan problem globokega zamrzovanja semenskega izliva je zmanjšana gibljivost semenčič po odmrznitvi. Praviloma kvalitetno dobri semenski izlivi prenašajo šok globokega zamrzovanja dovolj dobro, kjer se delež gibljivosti zmanjša le za 20%. Pri kvalitetno slabših vzorcih je padec deleža gibljivih semenčič lahko bistveno večji. Individualno pa vsak vzorec prenaša šok globokega zamrzovanja zelo različno, zato je tudi razpon takega padca deleža gibljivosti velik od 10 do 95%. Kateri vzorec bo globoko zamrzovanje prenašal bolj in kateri slabše, je možno ugotoviti le po odtajanju (3). Odmrznjene vzorce semenskega izliva lahko uporabimo bolj ali manj uspešno, v času pričakovane ovulacije, ko lahko opravimo umetno osemenitev žene (AIH-artificial insemination with frozen-thawed husband sperm) (tabela 1).

Tabela 1. Pregled objavljenih podatkov različnih avtorjev o nosečnosti po umetni osemenitvi z odmrznjenim semenom

Avtorji in reference	Štev. parov	Štev. nosečnosti
Hendry in sod. (6)	15	3
Milligan in sod. (7)	131	25
Reed in sod. (8)	7	2
Redman in sod. (9)	11	3
Rhodes in sod. (10)	4	1
Rothman in sod. (11)	1	1
Scammell in sod. (12)	22	8
SKUPAJ	191	43 (22,5%)

Uspešnost te metode je sorazmerno majhna, odvisna predvsem od števila gibljivih semenčič na 1 ml po odmrznitvi, ki naj znaša vsaj 12×10^6 progresivno gibljivih semenčič na mililiter (4).

Veliko boljše možnosti za uspešno uporabo odmrznjenega semena omogočajo tehnike asistirane reprodukcije, kot sta npr. oploditev zunaj telesa in prenos zarodkov (IVF-ET) ter možnost uporabe mikroinseminacije (MAF: micro-assisted fertilization) z laserjem ali brez njega (tabela 2).

Literatura navaja sicer majhno število primerov, vendar je uspešnost asistirane reprodukcije pomembno boljša kot po umetni osemenitvi. Velika prednost asistirane reprodukcije je zlasti ta, da je uspešna tudi, ko je odmrznjeni ejakulat slabše kvalitete, saj lahko pričakujemo nosečnost že, ko dobimo $0,2$ do $4,2 \times 10^6$ /ml progresivno gibljivih semenčič (2).

Upošteevajoč dobre rezultate najnovejših tehnik asistirane reprodukcije, tudi kadar je odmrznjeni ejakulat slabše kvalitete, nas vodi v to, da bomo odslej zamrzovali tudi kvalitetno slabše ejakulate.

Tabela 2. Pregled objavljenih najnovejših podatkov različnih avtorjev o nosečnosti po uporabi različnih tehnik asistirane reprodukcije z odmrznjenim semenom

Avtorji in reference	Štev. parov	Štev. nosečnosti
Davis in sod. (13)	1	1
Milligan in sod. (7)	2	2
Naz in sod. (14)	1	1
Rowland in sod. (15)	2	2
Schill in sod. (16)	1	1
Tournaye in sod. (17)	8	7
Khalifa in sod. (2)	10	4
Levron in sod. (18)	1	1
v.d Zwan in sod. (19)	1	1
SKUPAJ	27	20 (74,0%)

Pričakujemo, da bodo te nove in najnovejše tehnike asistirane reprodukcije postale rutinske metode v vseh večjih in manjših, državnih in zasebnih ordinacijah s programom IVF-ET. To bo uspešna priložnost za zdravljenje neplodnosti tudi zaradi ekstremne oligo-asteno-teratozoospermije.

Bolniki in metode dela

V dvanajstletnem obdobju od leta 1982—93 smo v obdelavo vključili skupno 236 bolnikov, od tega 186 z malignimi tumorji na gonadah, 42 z limfopatijo (Hodgkinov in ne-Hodgkinov limfom), 6 z akutno limfatično levkemijo ter 2 druga bolnika (tabela 3).

Družinska anamneza je bila po naših podatkih neobremenjujoča in negativna. Osem bolnikov je imelo predhodno v otroških letih orhidopeksijo. Vse bolnike so nam poslali z Onkološkega inštituta po semikastraciji oziroma tik pred začetkom nadaljnjega onkološkega zdravljenja (kemoterapije, radioterapije ali radikalne limfadenektomije oziroma kombinacije vseh). Po razgovoru in kliničnem pregledu je sledil odvzem semenskega izliva za laboratorijsko oceno kvalitete. Ejakulate, ki so bili še primerne kvalitete, smo takoj tudi konzervirali, to je globoko zamrznili v tekočem dušiku. Lahko bi rekli, da so bili bolniki ob sprejemu večinoma prizadeti, problematični in v slabi psiho-

Tabela 3. Prikaz števila bolnikov glede na diagnozo in starost v obdobju od 1982 do 1993

Diagnoza	Število bolnikov	Povprečna starost	Leta od — do
Razni tumorji testisov	186	27,7	SD 6,3 8 — 49
Hodgkinov in ne-Hodgkinov limfom	42	25,4	SD 5,2 15 — 40
Akutna limfatična levkemija	6	27,5	SD 6,4 1 — 38
Drugi	2	21	

fizični kondiciji; večina pa tudi šele nekaj dni po semikastraciji in zato obremenjeni s spoznanjem, da imajo hudo bolezen. Vsi so obenem imeli veliko željo po čimbolj uspešnem vsestranskem zdravljenju. Prav zato so se pri nekaterih posameznikih pojavile težave pri odvzemu semenskega izliva.

Med razgovorom smo jim razložili vpliv onkološkega zdravljenja na plodno sposobnost in namen naše preventivne dejavnosti, zakaj moramo pred nadaljnjim zdravljenjem konzervirati semenski izliv, s čimer obidemo možno neplodnost, ki se lahko pojavi po onkološkem specifičnem zdravljenju. Razložili smo jim možnost uspešne uporabe odmrznjenih vzorcev ejakulata za umetno osemenitev oziroma za možnost uporabe v eni izmed tehnik asistiranе reprodukcije. Obdelava teh bolnikov je bila hitra in včasih smo še isti dan nadaljevali predvideno zdravljenje.

Globoko zamrzovanje semenskega izliva v tekočem dušiku (pri -196°C)

Konzervirali smo vse ejakulate, ki so kvalitetno še primerni za globoko zamrzovanje in pri katerih po odmrznitvi pričakujemo še realno možnost za oploditev. Vseh semenskih izlivov s hujšo oligo-asteno-teratozoospermijo doslej nismo zamrzovali.

Odvzem je bil vedno z masturbacijo. Ejakulate smo laboratorijsko analizirali eno uro po odvzemu. Držimo se priznanih meril Svetovne zdravstvene organizacije (20).

Normalno zahtevamo za odvzem semenskega izliva predhodni spolni post 2 do 5 dni. V tej skupini bolnikov smo spolni post samo zapisali in je bil zelo različen: od 1 do 60 dni. Če nam je čas dopuščal, smo semenski izliv ponovno odvzeli čez dva dni, tako dobili morda kvalitetno boljšega za uspešnejšo zamrznitev in seveda tudi boljšo možnost konzerviranja večjega števila doz semena. Laboratorijska analiza poudarja zlasti koncentracijo semenčic, delež hitro gibljivih semenčic in morfologijo.

Nativnemu semenskemu izlivu, ki je po kvaliteti seveda primeren za konzerviranje, dodamo volumsko enako količino pufru TRIS (pH 7,2 do 7,4) z dodatkom 20 % jajčnega rumenjaka in 12 % glicerola, ki je biokrioprotektiv. Sledi aspiracija tako pripravljene mešanice ejakulata in pufru TRIS v označene plastične slamice z volumnom 0,5 ml. Število tako zamrznjenih doz je odvisno od volumna semenskega izliva. Tako pripravljene semenske vzorce pustimo nato eno uro v hladilniku pri 4°C , da bi dosegli t.i. ekvilibracijo. Sledi ji globoko zamrznjenje v hlapih tekočega dušika, to je 5 cm nad nivojem tekočega dušika za 30 minut, nato jih potopimo v tekoči dušik. V zadnjem času je tak ročni način zamrzovalnega postopka zamenjan z avtomatsko, računalniško programirano napravo, ki pa je pri nas žal še nimamo.

Tako konzerviran semenski izliv lahko tudi čez nekaj let bolj ali manj uspešno uporabimo za umetno osemenitev bolnikove žene ali za oploditev ženinih jajčnih celic z eno od tehnik asistiranе reprodukcije.

Uspešnost želenega končnega cilja, to je načrtovane nosečnosti, je odvisna zlasti od kvalitete semenskega izliva po odmrznitvi. Glede na količino in kvaliteto semenskega izliva izberemo najprimernejšo tehniko za pripravo in vitro, s katero selekcioniramo zadostno število dobro gibljivih, hiperaktiviranih semenčic in tako izboljšamo stopnjo oploditve. Najpogosteje uporabljeni tehniki sta: naplavljanje semenčic (swim-up) s centrifugiranjem ali brez njega in uporaba gostotnih gradientov s Percollom (21).

Uspešnost lahko zboljšamo tudi z dobro predpripravo bolnikove žene, to je zlasti s primerno obliko in dobrim vodenjem stimulacije ovulacije in z izbiro najprimernejše tehnike umetne oploditve ali asistirane reprodukcije.

Rezultati

Vse bolnike s tumorjem na modu smo razdelili po podatkih o dosedanji plodni sposobnosti v 4 skupine (tabela 4).

Tabela 4. Bolniki s tumorjem testisa glede na dosedanjo plodno sposobnost

Dosedanja plodna sposobnost	Število bolnikov	%	Povprečna starost bolnikov	
niso imeli spolnih odnosov	12	0,07	17,9	SD 4,3
ni dokazane plodne sposobnosti	83	0,45	25,6	SD 5,1
imajo družino (1 do 4 otroke)	78	0,42	31,4	SD 5,3
v anamnezi samo abortus	13	0,07	27,8	SD 3,8

Naša pozornost velja predvsem mlajši skupini bolnikov, ki še nimajo otrok. Teh je bilo skupno 108 (58%) od vseh s tumorjem na gonadah. Odvzem semenskega izliva nam ni uspel pri osmih bolnikih bodisi zaradi znanih ali neznanih vzrokov, medtem ko o 10 nimamo podatkov. Pri vseh preostalih smo semenske izlive laboratorijsko pregledali in razvrstili po kvaliteti v 4 skupine (tabela 5).

Konzervirali smo vse semenske izlive, ki so po kvaliteti obetali kasnejšo uspešno uporabo za dosego zelene nosečnosti. Tako smo iz prve skupine bolnikov, ki še niso imeli spolnih odnosov in so bili povprečno stari 17,9 let, konzervirali 6 ejakulatov (50%). Trije so imeli preslabo kvaliteto semenskega izliva, eden je imel azoospermijo, pri dveh pa nam odvzem ni uspel.

V drugi skupini bolnikov, ki še niso imeli doslej dokazane plodne sposobnosti in so bili povprečno stari 25,6 let, smo konzervirali 46 ejakulatov (56%). Med njimi jih je 24 imelo kvalitetno preslab semenski izliv, 9 azoospermijo in pri dveh odvzem ni uspel.

Tretja skupina bolnikov je zajela očete, ki so že imeli od 1 do 4 otroke, in so bili povprečno stari 31,4 let. Tu smo konzervirali 46 ejakulatov (65%), 17 je imelo kvalitetno preslab semenski izliv, 3 celo azoospermijo in pri štirih od-

Tabela 5. Prikaz spolnega posta, volumna in kvalitete SI posameznih skupin bolnikov glede na dosedanja plodna sposobnost in število konzerviranih vzorcev SI

Dosedanja plodna sposobnost	Število bolnikov	Spolni post (dnevi)	Vol. SI ml	N	Kval. SI OL	OT	A	Z	O
niso imeli spolnih odnosov ni dokazane plodne sposobnosti	12	5,6	2,5	4	2	3	1	6	2
imajo družino (1 do 4 otroke) v anamnezi	81	8,4	3,4	34	12	24	9	46	2
samo abortus	70	7,7	3,1	31	15	17	3	46	4
	13	7,1	3,1	6	4	3		10	

Legenda

- N normozoospermija
- OL oligozoospermija lažje oblike
- OT oligozoospermija težje oblike
- Z konzerviran SI
- O odvzem SI ni uspel
- SI semenski izliv
- A azoospermija

vzem ni uspel. V četrti skupini bolnikov so bili moški, kjer smo med podatki zasledili, da so imele njihove žene umetno prekinitve nosečnosti. Povprečno so bili stari 27,8 let. Konzervirali pa smo lahko 10 ejakulatov (77%), v treh primerih je bil preslab.

Po naših podatkih je bilo od vseh pri nas obravnavanih 186 bolnikov 98 takoj nato operiranih, in sicer so imeli radikalno limfadenektomijo. Od teh je prišlo do januarja 1994 na kontrolo le 34 bolnikov, od katerih 28 ni imelo več semenskega izliva (82%), 6 pa z njegovo različno kvaliteto.

Od vseh 186 bolnikov z malignimi tumorji na gonadah se jih je v ambulanti za neplodnost oglasilo 29. So poročeni in načrtujejo družino (tabela 6).

Pri 9 bolnikih smo se glede na kvaliteto globoko zamrznjenega ejakulata odločili za umetno osemenitev. Pri njihovih ženah smo v ta namen stimulirali ovulacijo s klomifenom in v preovulacijskem času opravili umetno osemenitev z odmrznjenim moževim semenom. Zanosile so tri žene in rodile zdrave

Tabela 6. Pregled zanositve pri parih po uspešnem zdravljenju moža

Število parov	Način oploditve	Število porodov
9	AIH z zamrznjenim SI	3
11	AID	5
2	IVF/ET-SI slabe kv.	2
5	spontane zanositve	3 (2ab)
4	AIH SI po EE	(še ni rezultata)

otroke. Pri preostalih pa smo odnehali z umetno osemenitvijo, ker so doze zamrznjenega bolnikovega semena pošle. Ker gre pri teh bolnikih za aspermijo oziroma retrogradno ejakulacijo, pri štirih nadaljujemo z odvzgom semenskega izliva s pomočjo aparata za elektrostimulacijo (EE) po Seagerju (22). Ta aparat uporabljamo na ginekološki kliniki od septembra 1993 in imamo dobre izkušnje. Za bolnike, ki po radikalni limfadenektomiji nimajo semenskega izliva, pomeni edino realno možnost za doseg do načrtovane nosečnosti. Doslej smo z elektrostimulacijo vedno dobili semenski izliv različne kvalitete, ki smo ga nato laboratorijsko pripravili z eno od prej navedenih tehnik za pripravo semenskega izliva in vitro. Temu je sledila umetna osemenitev. Doslej še nimamo podatkov o nosečnosti.

Enajst zakoncev se je odločilo za umetno osemenitev z donorsko spermo, ker je bila moževa pred začetno onkološko terapijo preslaba in je zato nismo konzervirali. Pet žena je zanosilo in rodilo zdravega otroka.

Dvema paroma smo pomagali zaradi slabe kvalitete semenskega izliva in ker žena ni spontano zanosila tako, da smo opravili oploditev zunaj telesa in prenos zarodkov (IVF/ET). Obe ženi sta zanosili in rodili zdrava otroka.

V petih primerih je po nam znanih podatkih prišlo do spontane nosečnosti. Nosečnost se je dvakrat končala s spontanim abortusom, trikrat pa z rojstvom zdravih otrok.

En par se je odločil za posvojitev.

Razprava in sklep

Poročamo o 186 bolnikih z malignimi tumorji na gonadah. Vsi so bili poslani na Ginekološko kliniko z Onkološkega inštituta takoj po semikastraciji in preden so začeli z onkološko agresivno terapijo. Razgovoru z bolnikom in pregledu je sledil odvzem semenskega izliva. Bolniki so bili v tem trenutku v dokaj slabi psihofizični kondiciji, posamezni so imeli pred tem po nekaj dni visoko temperaturo, zato je bil odvzem pri nekaterih neuspešen ali pa je bila kvaliteta semenskega izliva preslaba za uspešno konzerviranje. Redkokdaj je čas bolniku dopuščal, da smo odvzem po 2 do 3 dneh ponovili.

Bolnike smo po podatkih o dosedanji plodni sposobnosti razdelili v 4 skupine. Zanimivo je, da je kvaliteta semenskega izliva v vseh skupinah enako slaba, tudi pri tistih, ki so že očetje. Tako nam je od 186 bolnikov uspelo konzervirati semenski izliv le pri 108 bolnikih (58 %).

Čez leto in več po prvem pregledu je na kontrolo prišla le $\frac{1}{3}$ bolnikov. Da bi dobili čimbolj točne podatke o stanju in plodni sposobnosti po zdravljenju ter želji po načrtovanju družine, smo jih januarja 1994 začeli načrtno vabiti na kontrolni pregled. Ko bomo akcijo končali, bomo dobili dokaj točen odgovor in popolnejše podatke o svojih bolnikih.

Po nam znanih podatkih je doslej 13 žena uspešno zdravljenih mož rodilo zdrave otroke, in sicer 3 po umetni osemenitvi s konzervirano spermo, 5 po umetni osemenitvi z donorsko spermo, 2 po postopku IVF/ET z uporabo

moževe manj kvalitetne sperme in 3 po spontani zanositvi. En par se je odločil za posvojitvev.

Pri 82 % bolnikov je po radikalni limfadenektomiji prišlo do okvare mehanizma ejakulacije, zato se semenski izliv pri spolnem odnosu izloči v mehur. Uporaba elektrostimulacije daje tej skupini bolnikov dokaj realno možnost za uspešno načrtovanje nosečnosti.

Najnovejše laboratorijske tehnike za pripravo zamrznjenega ali svežega semena za umetno osemenitev ali oploditev jajčne celice v epruveti pomembno dvigujejo stopnjo oploditve in zanositve kljub zelo slabi kvaliteti semenskega izliva. Zato je za v bodoče smotno konzervirati tudi manj kvalitetne ejakulate.

Pridružujemo se ugotovitvi Tournayea in sod. (5), da v prihodnje ne bo etično uporabljati zamrznjene semenske vzorce po odmrznitvi za umetno osemenitev, ker je le-ta premalo uspešna, temveč bo smotno uporabiti tisto tehniko asistirane reprodukcije, ki za konkretni primer obeta najuspešnejšo metodo za doseganje zelene nosečnosti.

Zahvala

Zahvaljujemo se vsem sodelavcem Onkološkega inštituta in Ginekološke klinike, ki so kakorkoli sodelovali pri predstavljenem delu.

Literatura

1. Sutcliffe 1987; Blackwell Scientific Publication.
2. Khalifa in sod. Hum Reprod 1992; 7: 105.
3. Reš P. Poročilo o raziskovalni nalogi 1979.
4. Holt in sod. Hum Reprod 1989; 4: 292.
5. Tournaye in sod. International Symposium on Male Infertility and Assisted Reproduction, Genk, Belgium 1993: Ab. 120.
6. Hendry in sod. Br J Urol 1983; 55: 769.
7. Milligan in sod. Br J Cancer 1989; 60: 966.
8. Reed in sod. J Clin Oncol 1986; 4: 537.
9. Redman in sod. J Clin Oncol 1987; 5: 233.
10. Rhodes in sod. Fert Steril 1985; 44: 512.
11. Rothmann in sod. Clev. Clin Q 1986; 53: 95.
12. Scammell in sod. Lancet 1985; 2: 31.
13. Davis in sod. Fert Steril 1990; 53: 377.
14. Naz in sod. J IVF Embryo Transfer 1985; 2: 143.
15. Rowwland in sod. Urology 1985; 26: 33.
16. Schill in sod. Hautartz 1984; 35: 313.
17. Tournaye in sod. Fertil Steril 1991; 55: 443.

18. Levron in sod. *Fertil Steril* 1992; 58: 839.
19. Zwan in sod. 7th World Congress on IVF and Assisted Procreations, Paris 1991: Ab. 131.
20. WHO laboratory manual; WHO 1992.
21. Meden-Vrtovec H, Hren-Vencelj H. Zunajtelesna oploditev. V: Meden-Vrtovec s sod. Neplodnost. CZ, 1989: 343.
22. Seager in sod. International Symposium on Male Infertility and Assisted Reproduction, Genk, Belgium 1993: Ab 40.