

Ανασκόπηση

Μεταμόσχευση και κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού

Α. Σόρτσης
Β.Κ. Ταρλατζής
Γ. Πάντος
Ι.Ν. Μπόντης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διατήρηση της γονιμότητας σε γυναίκες ασθενείς, οι οποίες έχουν διαγνωστεί ότι πάσχουν από καρκίνο, υπήρξε πρόσφατα ένας τομέας εντατικής έρευνας. Υπάρχει μια αυξημένη απαίτηση με την νέα τεχνολογία στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή για την προστασία της γονιμότητας. Πολλαπλές στρατηγικές έχουν προκύψει στοχεύοντας στη διατήρηση γονιμότητας, όπως είναι η κρυοσυντήρηση των εμβρύων, η κρυοσυντήρηση άωρων και ώριμων ωοκυττάρων, η κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού ή η κρυοσυντήρηση ωοθηκών και η μεταμόσχευση των ωοθηκών.

Όροι ευρετηρίου: καρκίνος, υπογονιμότητα, κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού, μεταμόσχευση ωοθηκών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρώτες προσπάθειες για μεταμόσχευση ωοθηκών σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο έγιναν τον 19^ο αιώνα. Αργότερα, στην αρχή του 20^{ου} αιώνα, οι Carrel και Cuthrie ανέπτυξαν μεθόδους για την αναστόμωση των αγγείων με πολύ καλά αποτελέσματα σε μια σειρά μεταμοσχευμένων οργάνων, συμπεριλαμβανομένων και των ωοθηκών.⁽¹⁾ Ο πρότερος πειραματισμός τους είχε οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι μια ισχυρή βιολογική δύναμη εμπόδιζε τη μεταμόσχευση οργάνων μεταξύ δύο διαφορετικών ατόμων και πίστευαν ότι θα ήταν αδύνατο ένα ξένο όργανο να καταστεί λειτουργικό σε έναν άλλο οργανισμό. Συνεπώς η απόρριψη των μεταμοσχευμένων οργάνων φαινόταν απειλητική για την υλοποίηση του όλου εγχειρήματος. Αυτό που πραγματικά άλλαξε ριζικά τα δεδομένα στις μεταμοσχεύσεις ήταν η ανακάλυψη των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων. Σημαντικός σταθμός ήταν η ανακάλυψη και η κλινική χρησιμοποίηση της κυκλοσπορίνης, το 1983. Αργότερα, και για πολλές δεκαετίες, οι πειραματικές μελέτες για την μεταμόσχευση ωοθηκών και ωοθηκικού ιστού συνέχισαν να απασχολούν διάφορους ερευνητές.^(2,3,4)

Όσον αφορά τις μελέτες πάνω στη κρυοσυντήρηση του ωοθηκικού ιστού, αυτές χρονολογούνται από τη δεκαετία του 1950. Οι αρχικές μελέτες ήταν απογοητευτικές, μέχρι την ανακάλυψη αποτελεσματικών σύγχρονων προστατευτικών μέσων και τη διαθεσιμότητα των αντόματων μηχανημάτων ψύξης. Οι Parkes AS & Smith AU (1953) ήταν οι πρώτοι που πραγματοποίησαν επιτυχή κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού. Η γλυκερόλη ήταν το μόνο προστατευτικό μέσο για ψύξη τη δεκαετία του 1960, αλλά βρέθηκε αναποτελεσματική για την κρυοσυντήρηση των ανθρώπινων ωο-

Α' Μαιευτική Γυναικολογική Κλινική
 ΑΠΘ, Γενικό Νοσοκομείο
 «Παπαγεωργίου», Θεσσαλονίκη

Αλληλογραφία:
 Α. Σόρτσης
 Α' Μαιευτική Γυναικολογική Κλινική
 ΑΠΘ, Γενικό Νοσοκομείο
 «Παπαγεωργίου» Θεσσαλονίκης
 Περιφερειακή Οδός Θεσσαλονίκης
 564 03 Νέα Ευκαρπία
 Τηλ.: 2310 693131
 Fax: 2310 991510
 E-mail: asortsis@med.auth.gr
 Κατατέθηκε: 9/9/2006
 Εγκρίθηκε: 7/11/2006

κυττάρων και του ωοθηκικού ιστού.⁽⁵⁾ Με την εμφάνιση αποτελεσματικότερων μέσων προστασίας, όπως το αιθυλένιο γλυκόλης, η διμεθυλοσουλφοξείδη (DMSO) και η προπανεδιόλη (PROH), οι μελέτες στα ζώα επαναλήφθηκαν και αναφέρθηκαν επιτυχείς εγκυμοσύνες σε πολλά είδη.⁽⁶⁻⁸⁾

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΟΥ ΩΑΡΙΟΥ

Η θεμελιώδης αναπαραγωγική μονάδα της ωοθήκης είναι τα αρχέγονα ωοθυλάκια. Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται αρχικά με μιτώσεις και σχηματίζουν τα ωογόνια. Τα ωογόνια συνεχίζουν με μίτωση με πολύ γρήγορους ρυθμούς έτσι ώστε την 6^η εμβρυϊκή εβδομάδα οι ωοθήκες περιέχουν περίπου 10.000 ωογόνια, ενώ τον δεύτερο μήνα το ανθρώπινο έμβρυο περιέχει 600.000 ωογόνια. Τον 4^ο μήνα της εμβρυϊκής ζωής ο αριθμός των ωογονίων φθάνει την μέγιστη τιμή των 6-7 εκατομμυρίων.^(9,10) Μετά την φάση του ασύγχρονου έντονου πολλαπλασιασμού, η μιτωτική διαίρεση των ωογονίων σταματά και ακολουθείται από την μείωση του αριθμού των ωογονίων, όπου σταματούν στο στάδιο της διπλοταινίας της μειωτικής διαίρεσης I. Τα γεννητικά κύτταρα που έχουν εισέλθει στη διαδικασία της μείωσης, καλούνται ωοκύτταρα. Η μετατροπή των ωογονίων σε ωοκύτταρα έχει ολοκληρωθεί μέχρι την γέννηση. Από την 18^η εμβρυϊκή εβδομάδα κάθε ωοκύτταρο, που έχει φθάσει στο στάδιο της διπλοταινίας της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, αρχίζει να περιβάλλεται από ένα στοιχείο σωματικών κυττάρων, που ονομάζονται κοκκιώδη κύτταρα. Το σύμπλεγμα του ωοκυττάρου με κοκκιώδη κύτταρα καλείται αρχέγονο ωοθυλάκιο. Έτσι, κατά την γέννηση, ο αριθμός των ωοθυλακίων είναι περίπου 1-2 εκατομμύρια, ενώ κατά την έναρξη της ήβης οι ωοθήκες περιέχουν 300.000-400.000 ωοθυλάκια. Από την μεγάλη αυτή αποθήκη, μόνο 400 ωοθυλάκια θα επιλεγούν, εκείνα τα οποία μετά από αλληλοδιάδοχα στάδια εξέλιξης απελευθερώνουν ένα ώριμο ωάριο στο μέσο του κύκλου.⁽¹¹⁻¹⁴⁾

Η ωοθυλακιογένεση θα σταματήσει μόνο στην εμμηνόπαυση, μετά την εξάντληση των ωοθυλακίων. Σε κάθε ωοθυλακιορρηκτικό κύκλο, ένα ωοθυλάκιο επιτυγχάνει πλήρη ωρίμανση και εμφανίζει ωοθυλακιορρηξία. Έτσι, συνολικά, κατά την αναπαραγωγική ηλικία μιας υγιούς γυναίκας, 300-400 ωοθυλάκια θα υποστούν ωοθυλακιορρηξία, ενώ το υπόλοιπο 99,9% από τα 300.000 ωοθυλάκια, που έχει η γυναίκα στην εφηβεία, θα υποστούν ατροφία.^(15,16)

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΩΟΘΗΚΩΝ

1. Κακοήθεις παθήσεις στην προεφηβεία και στην εφηβεία

Αποτελούν την δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου στην ηλικία από 1 μέχρι 14 ετών. Οι παθήσεις αυτές εί-

να η λευχαιμία, το νευροβλάστωμα, το λέμφωμα Hodgkin, το οστεοσάρκωμα, το ραβδομυοσάρκωμα, το σάρκωμα Ewing's, ο όγκος του Wilm και το λέμφωμα Non Hodgkin.⁽¹⁷⁾ Σήμερα, η μόνη λύση για τα παιδιά αυτά είναι η κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού και αργότερα, όταν αποθεραπευτούν, να ακολουθήσει η μεταμόσχευση του κρυοσυντηρημένου ωοθηκικού ιστού.

2. Κακοήθεις παθήσεις στην αναπαραγωγική ηλικία

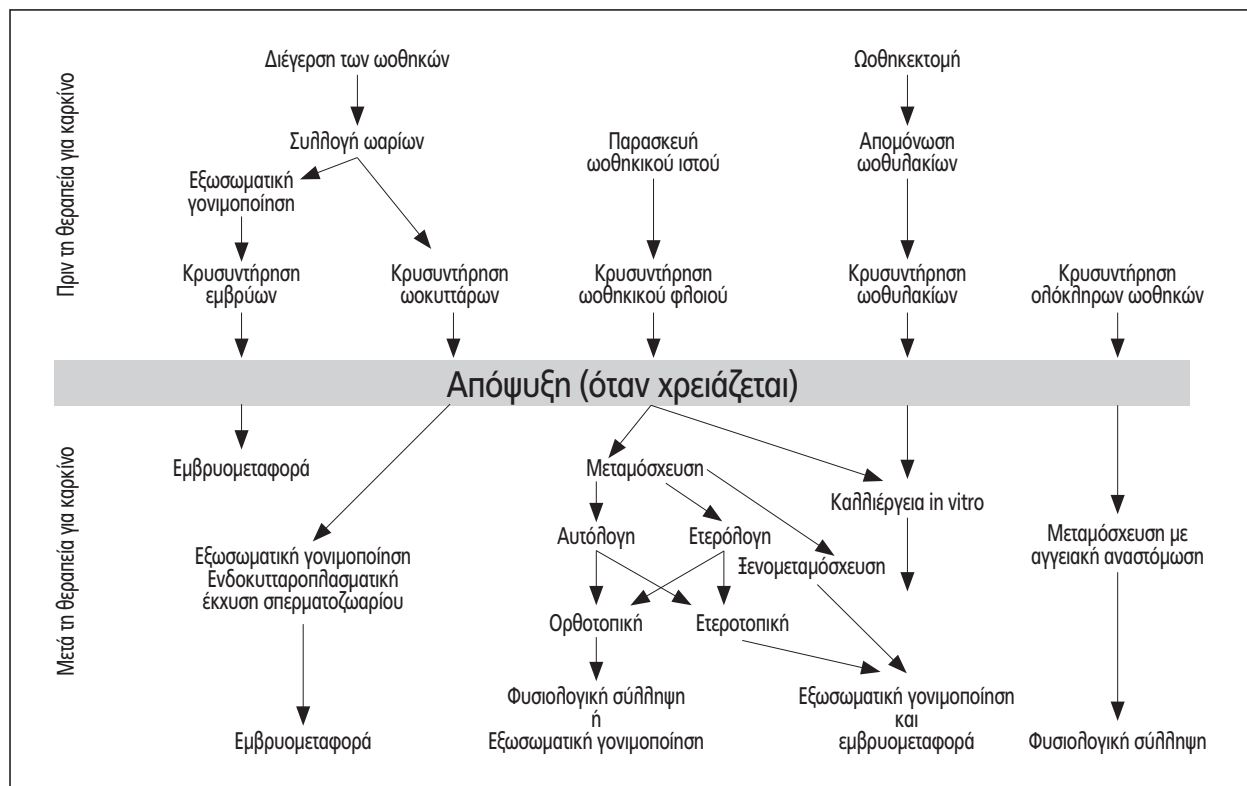
Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή κακοήθης κατάσταση στην αναπαραγωγική ηλικία της γυναίκας, ενώ 216.000 νέες περιπτώσεις αναφέρθηκαν στις ΗΠΑ το 2004. Το 30% αυτών των ασθενών θα παρουσιάσουν προβλήματα υπογονιμότητας, λόγω της θεραπείας στην οποία υποβάλλονται για τον καρκίνο. Οι ασθενείς αυτοί, επίσης, μπορεί να είναι και υποψήφιοι για κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού.^(18,19) Ένας άλλος καρκίνος που αποτελεί σοβαρό πρόβλημα υγείας, που προσβάλλει περίπου 500 χιλιάδες γυναίκες κάθε χρόνο παγκοσμίως, είναι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας. Το 2004, το 43% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου στις ΗΠΑ διαγνώσθηκε σε γυναίκες μικρότερες των 45 ετών. Η συμμετοχή των ωοθηκών είναι πολύ σπάνια στο καρκίνο του τραχήλου της μήτρας από πλακώδες επιθήλιο.⁽²⁰⁾ Στις ΗΠΑ, 18% όλων των περιπτώσεων καρκίνου των ωοθηκών θα εμφανιστεί σε γυναίκες κάτω των 45 ετών. Η μεγάλη πλειοψηφία των περιπτώσεων καρκίνου των ωοθηκών σε νεότερες γυναίκες περιλαμβάνει τρεις χαρακτηριστικούς τύπους: οριακοί ωοθηκικοί όγκοι, διθητικός επιθηλιακός καρκίνος και κακοήθεις όγκοι κυτταρικού σπέρματος της ωοθήκης. Επομένως, η διατήρηση της γονιμότητας αποτελεί ένα σοβαρό θέμα στη θεραπεία τέτοιων όγκων, ενώ η γονιμότητα διατηρείται αποτελεσματικά μετά από συντηρητική επέμβαση και οι περισσότεροι ασθενείς που επιχειρούν μια εγκυμοσύνη μπορούν να την επιτύχουν. Η μετάθεση των ωοθηκών είναι αμφισβητούμενη, ενώ η κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού για μελλοντική αυτομεταμόσχευση αποτελεί μια άλλη εναλλακτική λύση.

3. Ασθενείς που υποβάλλονται σε πυελική ακτινοβολία

Η ακτινοθεραπεία είναι απαραίτητη για επιτυχή έλεγχο των τοπικών στερεών όγκων που παρουσιάζονται στην πύελο, όπως το οστεοσάρκωμα, το σάρκωμα Ewing's, μερικοί καλοήθεις όγκοι των οστών.⁽²¹⁻²³⁾ Οι ασθενείς αυτοί μπορούν να καταφύγουν στην κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού.

4. Συστηματικές αυτοάνοσες παθήσεις

Ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ), τυπικά, επηρεάζει την γυναίκα στην αναπαραγωγική της ηλικία. Υψηλή δοσολογία κυκλοφosphαμίδης, με ή χωρίς μεταμόσχευση μυελού των οστών, χρησιμοποιείται μερικές



Σχήμα 1. Στρατηγικές για τη διατήρηση της γονιμότητας.

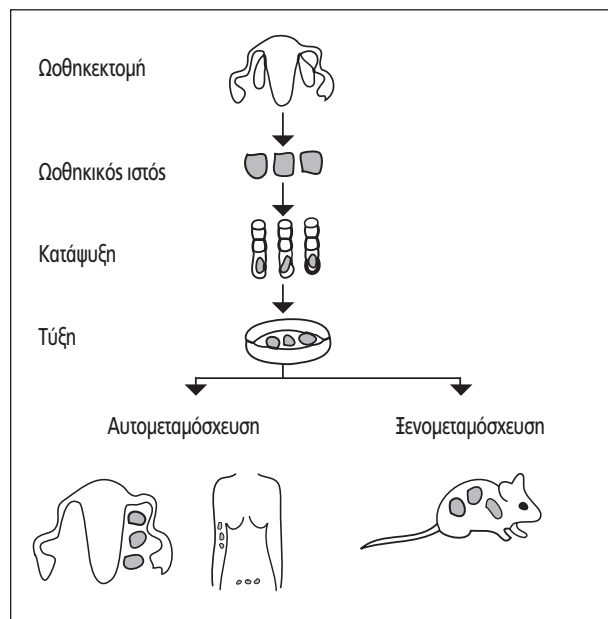
φορές για τη θεραπεία του ΣΕΑ με αποτέλεσμα πρόωμη ωοθηκική ανεπάρκεια σε αυτούς τους ασθενείς.⁽²⁴⁾ Σε άλλες αυτοάνοσες παθήσεις αναφέρεται, επίσης, ότι υπάρχουν οφέλη από την κυτταροτοξική θεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες όπως η σπειραματονεφρίτις ανθεκτική στα στεροειδή, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου και η κοινή πέμφιξ.^(25,26) Οι ασθενείς αυτοί μπορεί να είναι υποψήφιοι για κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού.

5. Ασθενείς με μεταμόσχευση μυελού των οστών

Η μεταμόσχευση μυελού των οστών αποτελεί μια θεραπευτική προσέγγιση σε παθήσεις όπως η λενχαιμία, ο καρκίνος του μαστού, πολλαπλούν μυέλωμα και το λέμφωμα.⁽²⁷⁾ Μεταξύ των μη κακοήθων καταστάσεων, στις οποίες συνιστάται η θεραπεία με μεταμόσχευση μυελού των οστών, είναι η απλαστική αναιμία, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η αυτοάνοση θρομβοκυτταροπενία, η προοδευτική συστηματική σκλήρυνση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η νεανική ιδιοπαθής αρθρίτις και η αγγειίτις.⁽²⁸⁾ Επειδή πριν την μεταμόσχευση μυελού των οστών προηγείται χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία, δυστυχώς επέρχεται ανεπάρκεια της ωοθηκικής λειτουργίας στο 92% των περιπτώσεων, γι' αυτό ενδείκνυται η κρυοσυντήρηση και η μεταμόσχευση ωοθηκικού ιστού.⁽²⁹⁾

6. Αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομή

Σε περιπτώσεις ωοθηκεκτομής λόγω καλοήθων κύστεων, συχνά ο υγιής ωοθηκικός ιστός απομονώνεται και κρυοσυντηρείται. Στην αντιμετώπιση της βαρείας ενδομητρίωσης, η ωοθηκεκτομή ενδείκνυται όταν δεν υπάρχει ανταπόκριση στην φαρμακευτική θεραπεία. Για τις γυναίκες που ενδέχεται να υποβληθούν σε ωοθηκεκτομή λόγω ενδομητρίωσης, η λήψη ωοθηκικού ιστού γίνεται κατά την διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Κατά την διάρκεια της ωοθηκεκτομής, υγιής ωοθηκικός ιστός απομονώνεται με την βοήθεια μικροσκοπίου. Ο ιστός αυτός εν συνεχεία μεταμοσχεύεται άμεσα ή κρυοσυντηρείται για μελλοντική ορθοτοπική ή ετεροτοπική μεταμόσχευση.⁽³⁰⁾ Επίσης, σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού ιδιαίτερα όταν είναι οιστρογονοεξαρτώμενος, συνιστάται η αφαίρεση των ωοθηκών, όταν αυτές βρίσκονται στην αναπαραγωγική ηλικία, με στόχο την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης. Και σε αυτές τις γυναίκες ενδείκνυται η κατάψυξη του ωοθηκικού ιστού ή η κρυοσυντήρηση εμβρύων για μελλοντική χρήση. Μια άλλη κατηγορία γυναικών με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου των ωοθηκών, και με παρουσία κληρονομικής μετάλλαξης, κυρίως BRCA-1 και BRCA-2, εμφανίζονται σε ένα ποσοστό 10% των επιθηλιακών ωοθηκικών καρκίνων. Ο αθροιστικός κίνδυνος στην διάρκεια της ζωής



Σχήμα 2. Ανάπτυξη των ωοκυττάρων σε κρυοσυντηρημένο ωοθηκικό ιστό

για ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών σε γυναίκες με BRCA-1 είναι 60% και 10%-20% σε γυναίκες με BRCA-2 μετάλλαξη. Επιπρόσθετα δε ο αθροιστικός κίνδυνος στην διάρκεια της ζωής για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού σε γυναίκες με BRCA-1 είναι 80%-90%.⁽³¹⁾ Ενώ δεν έχει ακόμη εμφανισθεί καρκίνος σε γυναίκες με BRCA θετικό, συστήνεται προφυλακτική ωοθηκτομή όταν έχει συμπληρώσει τον αναπαραγωγικό της κύκλο, ή μεταξύ των 35-40 ετών, για να ελαττώσει τον κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών και μαστού.^(32,33) Η κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού πρέπει να προτείνεται στις γυναίκες αυτές που δεν έχουν τεκνοποιήσει, μετά την ηλικία των 35 ετών. Όταν δε η γυναίκα επιθυμεί να τεκνοποιήσει, τότε γίνεται μεταμόσχευση του ωοθηκικού ιστού, κατά προτίμηση υποδόρια, επειδή η παρακολούθηση είναι πιο εύκολη, και αφαιρείται ο ιστός όταν επιτευχθεί εγκυμοσύνη, προς αποφυγή έκθεσης στο κίνδυνου του καρκίνου. Οι γυναίκες αυτές μπορούν αργότερα να χρησιμοποιήσουν τον ωοθηκικό ιστό και για ανάπτυξη in vitro ωοκυττάρων.

ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΣΕΣ ΕΠΙΛΟΓΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑΣ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Πολλαπλές στρατηγικές έχουν προκύψει στοχεύοντας στη διατήρηση γονιμότητας οι οποίες περιλαμβάνουν:^(34,35) 1) κρυοσυντήρηση των εμβρύων, 2) κρυοσυντήρηση άωρων και ώριμων ωοκυττάρων, 3) κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού ή κρυοσυντήρηση ωοθηκών,

4) μεταμόσχευση των ωοθηκών, 5) χορήγηση GnRH, 6) χορήγηση αντι-αποπτωτικών παραγόντων (π.χ. σφινγοσίνη 1- φωσφατάση). Όλες οι στρατηγικές, εκτός από την κρυοσυντήρηση των εμβρύων, είναι προς το παρόν σε πειραματικό στάδιο (σχήμα 1).⁽³⁶⁾

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Η κρυοσυντήρηση των άωρων ωοθυλακίων στον ωοθηκικό ιστό έχει πιθανά πλεονεκτήματα, έναντι της κρυοσυντήρησης του εμβρύου και του ωοκυττάρου. Εκατοντάδες άωρα ωοθυλάκια που περιέχουν άωρα ωοκύτταρα μπορούν να κρυοσυντηρηθούν, χωρίς την αναγκαιότητα της ωοθηκικής διέγερσης. Οι Parkes AS & Smith AU (1953) ήταν οι πρώτοι που έδειξαν ότι τα ωοθυλάκια σε ωοθηκικά ιστοτεμάχια, που διατηρούνται σε ψύχος και ψύχονται στους -79°C , σε $>3^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$, αναπτύχθηκαν και παράγααν ωοθηκικές στεροειδείς ορμόνες μετά τη μεταμόσχευση.⁽³⁷⁾ Ο ωοθηκικός ιστός μπορεί, στο μέλλον, να χρησιμοποιηθεί ώστε να απομονωθούν ωοθυλάκια και να καλλιεργηθούν in vitro ή να χρησιμοποιηθούν και για ξενο-μεταμόσχευση (σχήμα 2).⁽³⁸⁾

Ο ωοθηκικός ιστός δεν καταψύχεται ως σύνολο, αλλά σε λεπτές τομές του φλοιού. Με τον τρόπο αυτό, η διείσδυση της κρυοπροστατευτικής ουσίας είναι καλύτερη. Ένα πρωτόκολλο αργής κατάψυξης έχει σχηματίσει τον «πυρήνα» για διατήρηση σε ψύξη του ωοθηκικού ιστού, γύρω από την οποία έχουν πραγματοποιηθεί ένας αριθμός τροποποιήσεων.⁽³⁹⁾ Η βασική διαδικασία ενέχει εκτομή του εξωτερικού φλοιού της ωοθήκης σε τεμάχια τα οποία δεν είναι μικρότερα από 1–2 mm.

Η πλέον συνηθισμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η βραδεία κατάψυξη, χρησιμοποιώντας την προπαινεδιόλη (PROH) - σουκρόζη και τη διμεθυλοσουλφοξείδη (DMSO) σαν κρυοπροστατευτικά υλικά.⁽⁴⁰⁾ Μετά την λήψη του ωοθηκικού ιστού μεταφέρεται στο εργαστήριο και τοποθετείται σε κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό για να ελαχιστοποιηθεί η απόπτωση. Η ωοθήκη τεμαχίζεται σε μικρούς ιστούς (1x1 mm περίπου) και τοποθετείται σε επωαστήριο, στους 37°C , για 30 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται τοποθέτηση των ιστών σε κρυοπροστατευτικά υλικά και σε αυτόματο καταψύκτη αρχίζοντας από τους 18°C όταν το υλικό είναι PROH-σουκρόζη και από τους 0°C όταν το υλικό είναι DMSO. Ακολουθεί η βραδεία κατάψυξη με αυτόματο καταψύκτη (Planet Kryo 10). Εν συνεχεία γίνεται αφυδάτωση των κυττάρων με ένα ρυθμιστικό διάλυμα και, τέλος, γρήγορη κατάψυξη στα περισσότερα προγράμματα που έχουν χρησιμοποιηθεί για την κρυοσυντήρηση του ανθρώπινου ωοθηκικού ιστού (πίνακας 1).

Οι κύριοι περιορισμοί της διατήρησης σε ψύχος και της μεταμόσχευσης είναι ότι ούτε οι διαδικασίες ψύξης και απόψυξης, ούτε οι διαδικασίες μεταμόσχευσης έχουν βελτιωθεί για τον άνθρωπο, ή για οποιοδήποτε

Πίνακας 1. Προγράμματα κρυοσυντήρησης ανθρώπινου ωθηθικού ιστού με PROH-συνκρόζη και DMSO (ΘΔ=Θερμοκρασία δωματίου).

	PROH-συνκρόζη	DMSO
Συγκέντρωση κρυοπροστατευτικών	PROH 1,5 mol/l συνκρόζη 1,5 mol/l	0,1 mol/l
Αύξηση θερμοκρασίας	+18 °C	0 °C
Χρόνος αφυδάτωσης	15 min	15 min
Ρυθμός αργικής ψύξης	2 °C/min	2 °C/min
Σταθερή θερμοκρασία	-8 °C/min	-7 °C/min
Διατήρηση θερμοκρασίας	10 min	10/min
Ακολουθεί ψύξη μέχρι -30 °C	0,3 °C/min	0,3 °C/min
Συνέχιση ψύξης με υγρό αζώτου μέχρι -150 °C	50 °C/min	10 °C/min

Μεταφορά σε Απόψυξη:

ΘΔ 30 sec	ΘΔ 2 min
Νερό 30 °C	Νερό 30 °C
Υλικό με 1,5 mol/l PROH	Πλύσιμο με καλλιερρητικό υλικό
+ 0,2 mol/l συνκρόζη	
+ 20% ορό σε ΘΔ, 5 min	
0,5 mol/l PROH,	
0,2 mol/l συνκρόζη 10 min	
Υλικό σε ΘΔ 10 min και μετά στο Επωαστήριο	

άλλο είδος, και αυτές οι διαδικασίες θα πρέπει, επομένως, να θεωρηθούν πειραματικές. Ο ωθηθικός ιστός, σε αντίθεση με τα ωάρια και τα έμβρυα, μπορεί να λειτουργήσει ως αποθήκη μόλυνσεων και ασθενειών. Επομένως, οι ωθηθικοί ιστοί που περιέχουν καρκινικά κύτταρα, ιούς ή άλλα παθογόνες καταστάσεις κατά το χρόνο συλλογής ίσως μεταδώσουν τη μόλυνση ή ασθένεια στον λήπτη.⁽⁴¹⁾

Η ευκολία με την οποία μπορούν να συλλεχθούν ωθηθικοί ιστοί χειρουργικά, καθιστά τη μεταμόσχευση ωθηθικών μια ελκυστική επιλογή για την αποκατάσταση της γονιμότητας. Μόνο τα μοσχεύματα ωθηθικών μπορούν να αποκαταστήσουν τη γονιμότητα, αν ο ιστός περιέχει βιώσιμα ωοκύτταρα μέσα σε υγιή ωοθυλάκια. Για να μεγιστοποιηθεί ο αριθμός των υγιών θυλακίων μέσα σε ένα ιστοτεμάχιο, οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες επικεντρώνονται στη συλλογή ιστών που είναι πλούσια σε άωρα ωοθυλάκια, παρά σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια. Τα άωρα ωοθυλάκια αποτελούν τον πιο άφθονο τύπο ωοθυλακίων μέσα στην ωοθήκη. Σε είδη όπως τον άνθρωπο, τα άωρα ωοθυλάκια ανευρίσκονται μέσα στη λεπτή, σκληρή, πλούσια σε κολλαγόνο, στοιβάδα κοντά

στην επιφάνεια της ωοθήκης.⁽⁴²⁾ Μία απλή βιοψία, σφηνοειδής εκτομή ή επιφανειακό τμήμα του ωθηθικού ιστού, μπορεί, επομένως, να περιέχει πολλές χιλιάδες άωρα ωοθυλάκια ανά mm³. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η κατανομή των άωρων ωοθυλακίων δεν είναι ομοιόμορφη στην επιφάνεια της ωοθήκης. Έτσι, αν αφαιρεθούν μόνο μικρά τεμάχια, μπορεί, απλώς από τύχη, να περιέχουν λίγα ή καθόλου ωοθυλάκια. Ο κίνδυνος κατά τη λήψη ιστοτεμαχίων που δεν περιέχουν άωρα ωοθυλάκια θα μπορούσε να αυξηθεί με την ηλικία, καθώς ο συνολικός αριθμός ωοθυλακίων μειώνεται.⁽⁴³⁾

Η κρυοσυντήρηση ολόκληρων των ωθηθικών, μέχρι πρόσφατα, ήταν δύσκολη. Η ανατομία των ωθηθικών αγγείων σε εκτομή των ωθηθικών και διάχυση της ωοθήκης με προστατευτικά μέσα, μέσω αυτών των αγγείων, έχει βελτιώσει την επιβίωση των ιστών και οδήγησε σε παρόμοια ποσοστά βιωσιμότητας των ωοθυλακίων. Ενώ αυτά τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, ο κίνδυνος μεταστατικής νόσου παραμένει ένα σημαντικό θέμα. Η κρυοσυντήρηση των ωθηθικών παρέχει ένα απλό τρόπο συλλογής και αποθήκευσης μεγάλων αριθμών ωοκυττάρων για μία γυναίκα ή ένα θηλυκό ζώο. Η μεταμόσχευ-

ση των ωοθηκών μπορεί τότε να χρησιμοποιηθεί για να παραχθούν ώριμα ωοκύτταρα και να επιζήσουν νέα.⁽⁴⁴⁾

ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ο αντικειμενικός στόχος στη μεταμόσχευση των ωοθηκών είναι πάντα η διαφύλαξη της ωοθηκικής λειτουργίας και κατ' επέκταση η διατήρηση της γονιμότητας. Η στρατηγική μεταμόσχευση ωοθηκών μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας: 1) ολόκληρες ωοθήκες 2) ιστοτεμάχια ωοθήκης, και, 3) απομονώνοντας αρχέγονα κύτταρα ή ωοθυλάκια. Όσον αφορά τον τεχνικό προσανατολισμό, αυτό μπορεί να γίνει: α) με κρυοσυντήρηση του μοσχεύματος, β) αναστόμωση των αγγείων του μοσχεύματος, και, γ) κατευθείαν μεταμόσχευση του οργάνου χωρίς αναστόμωση των αγγείων, που μπορεί να είναι ορθοτοπική ή και ετεροτοπική.

Μεταμόσχευση ωοθηκικού ιστού

Ο λόγος για την πραγματοποίηση μεταμόσχευσης ωοθηκικού ιστού, για την αποκατάσταση της γονιμότητας ή μόνο της ενδοκρινούς λειτουργίας, θα καθορίσει την ποσότητα ιστού που πρέπει να αντικατασταθεί και τη θέση στην οποία πρέπει να τοποθετηθεί. Εάν ο στόχος είναι να αποκατασταθεί η γονιμότητα για αυτόματη σύλληψη, τα μοσχεύματα πρέπει να τοποθετηθούν έτσι, ώστε τα ωοκύτταρα να απελευθερωθούν ελεύθερα στην φυσιολογική γυναικεία αναπαραγωγική οδό για να επιτραπεί η γονιμοποίηση. Αυτό μπορεί να γίνει τοποθετώντας μικρά τεμάχια, 1–3 mm, της ωοθήκης στον ωοθηκικό βόθρο με λαπαροσκόπηση (ορθοτοπική μεταμόσχευση). Τα μοσχεύματα που τοποθετούνται σε άλλες (ετεροτοπικές) θέσεις (π.χ. υποδορίως, ενδομυϊκώς, κάτω από τη νεφρική κάψουλα, τη σπλήνα, την επιφάνεια της μήτρας) θα καταλήξουν σε εγκυμοσύνη μόνο αν τα ώριμα ωοκύτταρα μπορούν να ληφθούν με επακόλουθη *in vitro* ωρίμανση, εξωσωματική γονιμοποίηση και μεταφορά του εμβρύου.⁽⁸⁾

Μεταμόσχευση ολόκληρων των ωοθηκών

Η μεταμόσχευση ωοθηκών μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας και ολόκληρες ωοθήκες. Η μεταμόσχευση ολόκληρων των ωοθηκών θα εξασφάλιζε, κατά ιδανικό τρόπο, την μακροπρόθεσμη γονιμότητα. Οι μελέτες πάνω στα πειραματόζωα υποδεικνύουν ότι ολόκληρες ωοθήκες μπορούν να μεταμοσχευτούν επιτυχώς. Ωστόσο, η αγγειακή επαναστόμωση ολόκληρων ωοθηκών είναι τεχνικά δύσκολη. Χρησιμοποιώντας μικρά ζώα στα οποία εκτελείται χειρουργική επέμβαση η διαδικασία της αναστόμωσης είναι πρακτικά δύσκολη διαδικασία.^(45,46)

Μία μελέτη στην οποία μία ολόκληρη ωοθήκη ενός εμβρύου-ποντικού μεταμοσχεύτηκε στον ωοθηκικό θύλακο, σε ποντίκια που είχαν υποβληθεί σε εκτομή, και το αποτέλεσμα παρακολούθηθηκε για 1 χρόνο, έδειξε

ότι αυτά τα μοσχεύματα δημιούργησαν μακροπρόθεσμα κύκλους.⁽⁴⁷⁾

Η αγγειακή επαναστόμωση των ολόκληρων ωοθηκών επιτρέπει στις ωοθήκες να μετακινηθούν σε θέσεις εύκολης πρόσβασης όπως το λαιμό και έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλα θηλαστικά, όπως πρόβατα, για να ληφθούν πληροφορίες για τη λειτουργία των ωοθηκών.⁽⁴⁸⁾ Μέχρι σήμερα η αγγειακή επαναστόμωση ολόκληρων ωοθηκών δεν έχει εφαρμοστεί μετά από κρυοσυντήρηση, σε οποιοδήποτε μοντέλο μεγάλων ζώων, παρόλο που πρόσφατες αναφορές δείχνουν ότι τα δυο μπορούν να συνδυαστούν στον αρουραίο. Τέτοιες ωοθήκες αρουραίων, που διατηρήθηκαν σε ψύξη και αναστομάθηκαν ξανά, μπορούν να επανακτήσουν πλήρη λειτουργία.⁽⁴⁹⁾

Μεταμόσχευση μέρους των ωοθηκών

Η μεταμόσχευση ολόκληρων ωοθηκών με τα συννοδά αιμοφόρα αγγεία είναι μια πολύτιμη τεχνική, αλλά η πιο συνήθης προσέγγιση είναι η μεταμόσχευση μέρους των ωοθηκών ή ιστοτεμαχίων χωρίς επαναστόμωση. Αυτή η προσέγγιση είναι πιο κατάλληλη όταν: (1) μόνο ένα μικρό μέρος μιας ωοθήκης μπορεί ή χρειάζεται να ληφθεί, (2) μόνο ένα μικρό μέρος μιας ωοθήκης μπορεί ή χρειάζεται να μεταμοσχευθεί, (3) η ωοθήκη πρέπει να μεταμοσχευθεί σε πολλές θέσεις ή περισσότερους λήπτες, (4) το υλικό διατηρείται σε ψύξη με την πρόθεση να μεταμοσχευτεί σε διαφορετικά σημεία εγκαίρως, και, (5) χρησιμοποιώντας μικρά ζώα στα οποία η επέμβαση για αγγειακή αναστόμωση δεν είναι πρακτική. Η ευκολία και η αξία αυτών των προσεγγίσεων χρειάζεται να εξισορροπηθεί σε σχέση με την αυξημένη απώλεια των ωοθυλακίων.

Τα ωοθυλάκια μέσα στην ωοθήκη εξαρτώνται από το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που παρέχονται από την κυκλοφορία του αίματος. Αν η παροχή αίματος διακοπεί, ο ιστός γίνεται υποξικός και τα ωοθυλάκια αρχίζουν να εκφυλίζονται. Τα ωοθηκικά ιστοτεμάχια που μεταμοσχεύονται χωρίς καθυστέρηση σε ένα λήπτη (αλλά χωρίς αναστόμωση) περιέχουν σημαντικά περισσότερα βιώσιμα ωοθυλάκια απ' ό,τι τα μοσχεύματα που κρατούνται *in vitro* για 3 ώρες ή περισσότερο πριν την μεταμόσχευση.^(50,51) Ένα ιστοτεμάχιο που κρατείται *in vitro*, ή ένα πρόσφατα μεταμοσχευμένο ιστοτεμάχιο, θα πρέπει να βρίσκεται σε περιβάλλον με οξυγόνο. Η ποσότητα του οξυγόνου που εισέρχεται από διάχυση από το περιβάλλον θα είναι μικρή, αλλά σημαντική για την επιβίωση των ωοθυλακίων. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί γιατί τα ωοθηκικά μοσχεύματα συνήθως περιέχουν περισσότερα βιώσιμα ωοθυλάκια στην περιφέρεια παρά πιο βαθιά μέσα στον ιστό, και γιατί το ιστοτεμάχιο που κρατείται σε διαλύματα που εκτίθενται στον αέρα (20% οξυγόνο) έως 48 ώρες πριν τη μεταμόσχευση περιέχουν ακόμα βιώσιμα ωοθυλάκια. Αντιθέτως, το αποτέλεσμα της μεταμόσχευσης (αριθμός βιώσιμων ωοθυλακίων)

μειώνεται δραματικά όταν οι ωοθήκες δεν αφαιρούνται από το σώμα του νεκρού ζώου μέσα σε 3 ώρες (από την ώρα θανάτου), ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία συντήρησης^(50,51). Φαίνεται πιθανό ότι οι ωοθήκες βιώνουν εξαιρετική υποξία μέσα στην κοιλότητα του σώματος πριν από την λήψη, από την οποία δεν μπορούν να «αναρρώσουν». Η μεταμόσχευση μειώνει τον αριθμό των βιώσιμων ωοθυλακίων που βρίσκονται στα ωοθηκικά ιστοτεμάχια αλλά τα νωπά και τα κρυσταλλωμένα μοσχεύματα μπορούν να περιέχουν συγκρίσιμες ποσότητες ωοθυλακίων.^(52,53)

ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΩΟΘΗΚΩΝ: ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Μεγάλος αριθμός μελετών έχουν δημοσιευθεί όσον αφορά την μεταμόσχευση και κρυσταλλωμένη των ωοθηκών σε πειραματόζωα. Οι Denjean R και συν (1982), μετά από μικροχειρουργική εκλεκτική μεταμόσχευση ωοθηκών, έδειξαν λειτουργικότητα των ωοθηκών στο 71% των περιπτώσεων στην ορθοτοπική μεταμόσχευση και 83% στην ετεροτοπική μεταμόσχευση σε κόνι-κλους.⁽⁵⁴⁾ Η ιστολογική ανάλυση των αποτελεσμάτων εμφανίζει παρόμοια αποτελέσματα των κρυσταλλωμένων ιστών με αυτά των νωπών ωοθηκικών ιστών.⁽⁵⁵⁾ Σε μια μελέτη που έγινε από τον Gosden και συν (1994), μελετήθηκε η διαφορά μεταξύ νωπού και κρυσταλλωμένου ωοθηκικού ιστού σε πρόβατα. Δεν υπήρξε καμία διαφορά μεταξύ των νωπών και κρυσταλλωμένων μοσχευμάτων, αν και υπήρξε μια ουσιαστική μείωση του αριθμού των αρχέγονων ωοθυλακίων.⁽⁷⁾

Οι Cox και συν (1996) μεταμόσχευσαν εμβρυϊκές ωοθήκες ποντικών είτε ορθοτοπικά είτε ετεροτοπικά, σε ενήλικους ποντικούς. Η μεταμόσχευση των νωπών εμβρυϊκών ωοθηκών οδήγησε στην αποκατάσταση της κυκλικής δραστηριότητας, σε 3 εβδομάδες αφότου παρατηρήθηκαν ωοθυλάκια, σε 4 εβδομάδες μετά από τη μεταμόσχευση στις ετεροτοπικές περιοχές και μέσα σε 6 εβδομάδες στις ορθοτοπικές θέσεις.⁽⁵⁶⁾ Μια ενδιαφέρουσα μελέτη από Newton και συν (1996) εξέτασε την επιβίωση των ανθρώπινων ωοθυλακίων σε τέσσερα υλικά κρυσταλλωμένης: DMSO, αιθυλική γλυκερόλη, γλυκερίνη και PROH. Το καλύτερο ποσοστό επιβίωσης (84%) παρατηρήθηκε κατά τη χρησιμοποίηση της αιθυλικής γλυκερόλης.⁽⁵⁷⁾ Οι Gunasena και συν (1997) αξιολόγησαν την δυνατότητα μεταμόσχευσης ολόκληρων των ωοθηκών σε ενήλικους ποντικούς, χωρίς αναστόμωση των αγγείων, μετά από κρυσταλλωμένη. Στο 73% των περιπτώσεων επήλθε εγκυμοσύνη και τοκετός.⁽⁵⁸⁾ Οι Von Eye Corleta και συν (1998) μετά από υποδόρια αυτόλογη μεταμόσχευση ωοθηκών σε ποντίκια wistar, στον έλεγχο της ιστολογικής εξέτασης έδειξαν ότι, στο 60% των περιπτώσεων, προέκυψε λειτουργικότητα των ωοθηκών.⁽⁵⁹⁾

Η λειτουργία νωπού και κρυσταλλωμένου ωοθη-

κικού ιστού σε ετεροτοπική και ορθοτοπική μεταμόσχευση συγκρίθηκε, επίσης, από τους Aubard και συν, το 1999. Τα τεμάχια του ωοθηκικού ιστού μεταμοσχεύθηκαν στο κέρασ της μήτρας σε έξι θήλα πρόβατα, στην ορθοτοπική μεταμόσχευση, και κάτω από το δέρμα της κοιλιάς σε εννέα θήλα πρόβατα, στην ετεροτοπική μεταμόσχευση. Στους ετεροτοπικούς μεταμοσχευμένους ιστούς δεν βρέθηκε καμία σημαντική διαφορά ως προς τον αριθμό των ωοθυλακίων, μεταξύ του νωπού και του κρυσταλλωμένου ωοθηκικού ιστού. Στην ορθοτοπική μεταμόσχευση παρατηρήθηκε αύξηση των ωοθυλακίων και στις δύο κατηγορίες. Αυτή η μελέτη απέδειξε ότι ο βασικός παράγοντας αρμόδιος για τη επιβίωση των ωοθυλακίων είναι η ισχαιμία μετά την μεταμόσχευση και όχι η διαδικασία της κρυσταλλωμένης-απόψυξης.⁽⁶⁰⁾

Οι Calleio J και συν (1999) μετά από ετεροτοπική μεταμόσχευση των ωοθηκών (ενδοπεριτοναϊκά και υποδόρια) σε συγγενικά ποντίκια Lewis, χωρίς αναστόμωση των αγγείων και μετρώντας την FSH για περισσότερο από έξι μήνες, διαπίστωσαν ωοθηκική λειτουργία σε όλες τις περιπτώσεις.⁽⁶¹⁾ Μια μακροπρόθεσμη μελέτη από τους Baird DT και συν (1999), που πραγματοποιήθηκε για να αξιολογήσει την ενδοκρινή λειτουργία των ωοθηκών για μια περίοδο 2 ετών στα πρόβατα, αφότου έγινε μεταμόσχευση κρυσταλλωμένου ωοθηκικού ιστού, έδειξε ότι, παρά την δραστική μείωση του αριθμού των αρχέγονων ωοθυλακίων, η κυκλική ωοθηκική λειτουργία συντηρήθηκε για σχεδόν 2 έτη μετά τη μεταμόσχευση.⁽⁶²⁾ Οι Candy και συν (2000) μεταμόσχευσαν ωοθήκες που ήταν είτε νωπές, είτε μετά από κρυσταλλωμένη σε DMSO όπου έδειξε ότι εξασφαλίστηκε η σχετική μακροπρόθεσμη βιωσιμότητα του μεταμοσχευμένου ωοθηκικού ιστού.⁽⁶³⁾ Ωοθηκικός ιστός μεταμοσχεύθηκε κάτω από την κάψα νεφρών στα ποντίκια, επειδή το πλούσιο τριχοειδικό πεδίο ευνοεί την γρήγορη νεοαγγείωση του μοσχεύματος, αλλά αυτό δεν είναι μια ιδανική περιοχή για τη φυσική σύλληψη ή για τη συλλογή των ωοκυττάρων. Το κοιλιακό τοίχωμα ή ο υποδόριος ιστός είναι καταλληλότερη θέση, αν και η δημιουργία νεοαγγείωσης είναι φτωχότερη και επιζούν λιγότερα ωοθυλάκια.⁽⁶⁴⁾

Η ανάπτυξη ωοθυλακίων από φρέσκο και κρυσταλλωμένο ωοθηκικό ιστό γυναίκας, που μεταμοσχεύθηκε κάτω από την νεφρική κάψα αμφοτερόπλευρα σε ποντίκια, παρατηρήθηκε περισσότερο από 20 εβδομάδες μετά από τη μεταμόσχευση. Οι ερευνητές παρατήρησαν ανάπτυξη ωοθυλακίων ανεξάρτητα από την χορήγηση με εξωγενούς FSH ή φυσιολογικού ορού, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι οι συγκεντρώσεις FSH στην κυκλοφορία του αίματος ήταν ικανοποιητικές για τη ωοθυλακοειδή ανάπτυξη, συμπεραίνοντας ότι η FSH του ποντικού ενεργεί επάνω στον ανθρώπινο υποδοχέα της FSH.⁽⁶⁵⁾

Οι Wang και συν (2002) ανέφεραν μεταμόσχευση των

ωοθηκών σαλπίνγων σε αρουραίους Lewis. Στην ομάδα με τα κρυοσυντηρημένα μοσχεύματα, το 57% των περιπτώσεων παρουσίασαν λειτουργικότητα των ωοθηκών, ενώ όλες οι περιπτώσεις με την μεταμόσχευση νωπών οργάνων παρουσίασαν φυσιολογικούς κύκλους.⁽⁶⁶⁾ Ανάπτυξη ώριμων ωοκυττάρων (μετάφασης II) από προηγουμένη μεταμόσχευση ανθρώπινου ωοθηκικού ιστού, κάτω από την νεφρική κάψα, αμφοτερόπλευρα, σε ποντίκια SCID, μετά από χορήγηση HCG δημοσιεύθηκε, επίσης.⁽⁶⁷⁾ Σε μια πρόσφατη μελέτη σε κονίκλους μετά από αυτόλογη ορθοτοπική και ετεροτοπική μεταμόσχευση ωοθηκών, χωρίς αναστόμωση, για ένα μήνα, παρατηρήθηκε ωοθηκική λειτουργία στο 56% και 82% των περιπτώσεων αντίστοιχα.⁽⁶⁸⁾

ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΩΟΘΗΚΩΝ: ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Πειραματικές μελέτες για την μεταμόσχευση ωοθηκικού ιστού, σε ορθοτοπική και ετεροτοπική θέση, έχουν αρχίσει πρόσφατα να εφαρμόζονται και στον άνθρωπο, με αισιόδοξα αποτελέσματα. Η μεταμόσχευση ολόκληρων των ωοθηκών σε γυναίκες θεωρείται δύσκολη διαδικασία γιατί οι ωοθήκες είναι μεγάλες και ινώδεις.

Ορθοτοπική μεταμόσχευση

Η πρώτη ορθοτοπική μεταμόσχευση πραγματοποιήθηκε από τους Oktay και Karlikaya (2000) και αναφέρεται σε ασθενή 37 ετών με αμφοτερόπλευρη ωοθηκτομή λόγω επαναλαμβανόμενων καλοηθών ορσών κύστεων των ωοθηκών. Υγιής ωοθηκικός ιστός κρυοσυντηρήθηκε και τοποθετήθηκε στο πυελικό της τοίχωμα με λαπαροσκόπηση. Ακολούθησε διέγερση του ωοθηκικού ιστού με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός κυρίαρχου ωοθυλακίου και αύξηση της συγκέντρωσης των οιστρογόνων.⁽⁶⁹⁾

Ένα χρόνο μετά οι Radford και συν (2001) αναφέρθηκαν σε μια ασθενή 37 ετών που έπασχε από λέμφωμα του Hodgkin's και υποβλήθηκε σε κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού πριν την χημειοθεραπεία. Ο ωοθηκικός ιστός τοποθετήθηκε επάνω στην αριστερά ωοθήκη μετά το τέλος της χημειοθεραπείας. Επτά μήνες μετά την μεταμόσχευση παρατηρήθηκε στο ορό του αίματος της γυναίκας παραγωγή οιστραδιόλης, για τους επόμενους εννέα μήνες.⁽⁷⁰⁾

Για πρώτη φορά παγκοσμίως ανακοινώθηκε από ομάδα ιατρών του Καθολικού Πανεπιστημίου Louvain των Βρυξελλών, η πρώτη εγκυμοσύνη και γέννηση ενός υγιέστατου νεογνού το Σεπτέμβριο του 2004, μετά από μεταμόσχευση ωοθηκικού ιστού. Στην γυναίκα αυτή, ηλικίας 25 ετών, διαγνώσθηκε νόσος του Hodgkin (στάδιο IV) το 1997 και η ασθενής υποβλήθηκε σε αφαίρεση ωοθηκικού ιστού και κρυοσυντήρηση. Εν συνεχεία, έγινε χημειοθεραπεία για ένα χρόνο. Μετά από την χημειοθεραπεία, η ασθενής ελάμβανε θεραπεία ορμονι-

κής υποκατάστασης. Το 2001 εξεδήλωσε την επιθυμία της για εγκυμοσύνη και το αποτέλεσμα ήταν μετά την μεταμόσχευση ωοθηκικού ιστού η γέννηση ενός υγιούς θήλεος νεογνού.⁽⁷¹⁾ Η ομάδα του Silber JS από το St Luke's Hospital, St Louis, Missouri, ΗΠΑ, πραγματοποίησαν την πρώτη εγκυμοσύνη μετά από ετερόλογη, ορθοτοπική μεταμόσχευση ωοθηκών. Δότης ήταν η δίδυμη αδελφή της λήπτριας. Η λήπτρια έπασχε από πρόωγη εμμηνόπαυση και είχαν προηγηθεί ήδη δύο αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης. Το αποτέλεσμα της μεταμόσχευσης των ωοθηκών ήταν φυσιολογική εγκυμοσύνη. Η εγκυμονούσα έτεκε με φυσιολογικό τοκετό την 38^η εβδομάδα νεογνό με βάρος σώματος 3600 gr.⁽⁷²⁾

Οι Meirou D και συν, το 2005, ανέφεραν εγκυμοσύνη μετά από μεταμόσχευση κρυοσυντηρημένου ωοθηκικού ιστού κάτω από τον φλοιό της ωοθήκης. Η γυναίκα αυτή ήταν ηλικίας 28 ετών και είχε υποβληθεί σε επιτυχή χημειοθεραπεία για λέμφωμα non-Hodgkin's. Μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση και εμβρυομεταφορά επήλθε εγκυμοσύνη και γέννηση ενός θήλεος νεογνού, με βάρος σώματος 3000gr.⁽⁷³⁾

Οι Demeestere I και συν (2006), πολύ πρόσφατα, ανακοίνωσαν εγκυμοσύνη μετά από φυσιολογική σύλληψη σε γυναίκα που έπασχε από νόσο του Hodgkin και υποβλήθηκε σε ορθοτοπική και ετεροτοπική μεταμόσχευση κρυοσυντηρημένου ωοθηκικού ιστού. Δυστυχώς, η εγκυμοσύνη κατέληξε σε αποβολή την 7^η εβδομάδα της κύησης λόγω χρωμοσωμικών ανωμαλιών (XXY, +10).⁽⁷⁴⁾

Ετεροτοπική μεταμόσχευση

Η ετεροτοπική μεταμόσχευση αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση, με την οποία ο κρυοσυντηρημένος ωοθηκικός ιστός μεταμοσχεύεται εκτός της φυσιολογικής ανατομικής θέσης της ωοθήκης. Η μεταμόσχευση σε μία ετεροτοπική θέση, όπως στο αντιβράχιο ή στην κοιλιακή χώρα, είναι τεχνικά ευκολότερη και ενέχει λιγότερους κινδύνους απ' ό,τι η ορθοτοπική μεταμόσχευση. Επιτρέπει, επίσης, την ευκολότερη παρακολούθηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Αλλά η συλλογή ωαρίων, η εξωσωματική γονιμοποίηση και η εμβρυομεταφορά είναι απαραίτητη διαδικασία για να επιτευχθεί εγκυμοσύνη. Οι Leporrier και συν (1987) δημοσίευσαν ετεροτοπική μεταμόσχευση μιας ωοθήκης σε ασθενή με νόσο του Hodgkin. Η αριστερή ωοθήκη μεταμοσχεύθηκε στο αντιβράχιο υποδόρια και η δεξιά ωοθήκη μετατέθηκε ενδοπεριτοναϊκά. Οι εξετάσεις υπερηχογραμμικού ελέγχου της μεταμοσχευμένης ωοθήκης παρουσίασαν την φυσιολογική ανάπτυξη ωοθυλακίων. Τρεις μήνες μετά από την ακτινοθεραπεία η ενδοπεριτοναϊκή ωοθήκη ανάκτησε την κανονική της λειτουργία.⁽⁷⁵⁾

Η τυχαία υποδόρια μεταμόσχευση του ωοθηκικού ιστού αναφέρθηκε (Marconi et al, 1997) όταν, κατά τη

διάρκεια μιας λαπαροσκοπικής αφαίρεσης ενός ενδομητριομάτος, αφήθηκε ένα κομμάτι του ωθηκικού ιστού στο υποδόριο. Αρχαιότερες μήνες αργότερα, η ασθενής ανέπτυξε μια διόγκωση στη ομφαλική περιοχή. Η ιστολογική ανάλυση του ιστού έδειξε λειτουργικό ωθηκικό ιστό, ανάπτυξη ωοθυλακίου και νεοαγγείωση.⁽⁷⁶⁾

Οι Oktay και συν, το 2001, ανακοίνωσαν, επίσης, άλλη μια περίπτωση αντόλογης ετεροτοπικής μεταμόσχευσης ωθηκικού ιστού. Αναφερόταν σε ασθενή 35 ετών που έπασχε από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σταδίου ΠΙΒ. Έγινε αφαίρεση των ωθηκών πριν την έναρξη της ακτινοθεραπείας και κρυσυντήρηση ωθηκικού ιστού. Μετά την κρυσυντήρηση ωθηκικού ιστού έγινε τοποθέτηση στο δεξιό αντιβράχιο. Η συγκέντρωση της FSH και LH επανήλθε στα φυσιολογικά της όρια μετά από 120 ημέρες και δημιουργία ωοθυλακίου.⁽⁷⁷⁾

Ο Callejo και συν (2001) κατάφεραν μακράς χρονικής διάρκειας λειτουργία κρυσυντηρημένου ετεροτοπικού μοσχεύματος, μετά από μεταμόσχευση σε περιεμφανοπαυσιακές γυναίκες. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ορμονική λειτουργία μπορεί να αποκατασταθεί μετά από μεταμόσχευση με φρέσκο ή κρυσυντηρημένο ωθηκικό ιστό. Εξετάζοντας το κόστος, την ευκολία, την ασφάλεια (στην περίπτωση των ασθενών με καρκίνο) και τη μακροπρόθεσμη λειτουργία των μοσχευμάτων (ακόμα να καθοριστεί), είναι πιθανό ότι η υποδόρια ωθηκική μεταμόσχευση ιστού θα αποτελούσε ένα επαρκές υποκατάστατο HRT.⁽⁷⁸⁾

Το 2004 οι Kim και συν δημοσίευσαν περίπτωση 37χρονης ασθενούς που υποβλήθηκε σε ετεροτοπική (rectus muscles) μεταμόσχευση κρυσυντηρημένου ωθηκικού ιστού. Μετά από 14 εβδομάδες αποκαταστάθηκε η ενδοκρινική λειτουργία, αλλά μετά από 28 εβδομάδες επήλθε παύση της ωθηκικής λειτουργίας, με την παρουσία πολύ υψηλής FSH και πολύ χαμηλής τιμές των οιστρογόνων.⁽⁷⁹⁾ Επίσης, οι Oktay και συν (2004) ανέφεραν μεταμόσχευση από κρυσυντηρημένο ωθηκικό ιστό υποδόρια στο πυελικό τοίχωμα. Από τα 20 ωοθυλάκια που δημιουργήθηκαν στο μόσχευμα προέκυψε μόνο ένα έμβryo τεσσάρων κυττάρων.⁽⁸⁰⁾

Το 2005 οι Schmidt KL και συν ανακοίνωσαν δύο περιπτώσεις, ορθοτοπικής και ετεροτοπικής μεταμόσχευσης, με αποκατάσταση της ωθηκικής λειτουργίας, επαναφορά της εμμήνου ρύσεως, καθώς και παρουσία ωοθυλακίων στον υπερηχογραφικό έλεγχο.⁽⁸¹⁾

Οι Wolner-Hanssen και συν (2005) ανέφεραν υποδόρια μεταμόσχευση κρυσυντηρημένου ωθηκικού ιστού στο αντιβράχιο, με αποτέλεσμα την δημιουργία δύο ωοθυλακίων 12.6 mm και 6.7 mm. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ποιότητα των ωαρίων εξαρτάται από την θέση όπου τοποθετείται το μόσχευμα. Η θερμοκρασία και οι αλλαγές από πιεστικές καταστάσεις, στην υποδόρια περιοχή, μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στα ωοθυλάκια.⁽⁸²⁾

ΞΕΝΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Μετά από υποδόρια τοποθέτηση του ανθρώπινου ωθηκικού φλοιώδους ιστού σε ποντίκια, έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη ωοθυλακίων, σαν ανταπόκριση της εξωγενούς χορήγησης με γοναδοτροπίνη, ωρίμανση ωοθυλακίων και σχηματισμό ωχρού σωματίου. Τα επιπρόσθετα πλεονεκτήματα της ξενομεταμόσχευσης περιλαμβάνουν κατάλληλη παρακολούθηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και εύκολη πρόσβαση στην αναρρόφηση ωοθυλακίων. Τα ωθηκικά ιστοτεμάχια μπορούν να μεταμοσχευθούν ενδομυϊκά, υποδορίως ή να τοποθετηθούν κάτω από τη νεφρική κάψα.⁽⁸³⁾

Σε αντίθεση με την αυτομεταμόσχευση ή την αλλομεταμόσχευση, η ξενομεταμόσχευση θέτει πιθανά προβλήματα, όσον αφορά την πιθανότητα μετάδοσης νόσων από τον ιστό του λήπτη στον ιστό του δότη και τη δημιουργία επιγεννητικών τροποποιήσεων, εξαιτίας του ξένου φυσιολογικού περιβάλλοντος μέσα στο οποίο αναπτύσσεται ο ιστός. Ωστόσο, η πιθανή μετάδοση ασθενειών από τα ζώα στους ανθρώπους αποτελεί ένα σοβαρό θέμα, και αυτή η μέθοδος είναι απίθανο να εφαρμοστεί κλινικώς στο κοντινό μέλλον.⁽⁷⁾ Έτσι, παρόλο που τα ανθρώπινα ωθηκικά ξενομοσχεύματα παρείχαν ένα μοντέλο για τη μελέτη της αυτομεταμόσχευσης ανθρώπινου ωθηκικού ιστού, η χρήση τους ως μέσο χρησιμοποίησης διατηρημένου ωθηκικού ιστού βρίσκεται υπό συζήτηση. Θα πρέπει να εκφραστούν ερωτήματα για τις μολύνσεις από ρετροϊούς, κατά τη διασταύρωση των ειδών.

Επιπλέον, αυτή η τεχνική θα απαιτήσει να θυσιάσει ένας μεγάλος αριθμός ζώων, αφού μόνο μικρά τμήματα του ωθηκικού ιστού μπορούν να ξενομεταμοσχευθούν. Αυτό μπορεί να καταστήσει την τεχνική μη πρακτική, αλλά μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω και ηθικά ζητήματα.⁽⁸⁴⁾

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κύρια πλεονεκτήματα της συλλογής και της κρυσυντήρησης ωθηκικού ιστού είναι ότι η συλλογή είναι εφικτή για τα περισσότερα άτομα και ότι είναι ανεξάρτητη από την ηλικία και τη φάση του ωθηκικού κύκλου της γυναίκας. Ο ωθηκικός ιστός ανέχεται τη μεταφορά στον πάγο και είναι εύκολο να κρυσυντηρηθεί, ενώ είναι ανεξάρτητο από την κατάσταση του ατόμου, καθώς η γονιμοποίηση δεν απαιτείται κατά το χρόνο της λήψης, της κρυσυντήρησης ή της μεταμόσχευσης.

Αυτά τα πλεονεκτήματα θα πρέπει να εξισορροποθούν σε σχέση με τα γνωστά μειονεκτήματα της συλλογής ωθηκικών ιστοτεμαχίων, της κρυσυντήρησης και της μεταμόσχευσης, τα οποία περιλαμβάνουν, τις δυσκολίες στην εκτίμηση της ποιότητας και της ποσότητας του πληθυσμού των ωοθυλακίων μέσα στον ιστό, την πιθανότητα μετάδοσης της νόσου και τέλος τη μείωση

του πληθυσμού των ωοθυλακίων εξαιτίας της υποξίας που μπορεί να υποστεί το μόσχευμα. Η κρυοσυντήρηση και η μεταμόσχευση ωοθηρικού ιστού προσφέρει την δυνατότητα σε γυναίκες που πάσχουν από καρκίνο να διαφυλάξουν την γονιμότητά τους μετά την αποθεραπεία τους και αποτελούν πλέον μέρος των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Summary

Sortsis A, Tarlatzis BK, Pantos G, Bontis IN **Transplantation and cryopreservation of ovarian tissue**

Helen Obstet Gynecol 18(4):303-315, 2006

The maintenance of fertility in female patients, when they suffer from cancer, is an area of intensive inquires. Given the new technology, an increased demand in the assisted reproduction for the protection of fertility has been observed. Multiple strategies have been proposed, aiming at the maintenance of fertility, such as the embryo cryopreservation, oocytes cryopreservation, ovarian tissue cryopreservation and ovarian transplantation.

Key words: cancer, fertility, ovarian tissue cryopreservation, ovarian transplantation.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Carrel A & Guthrie C. Technique de la transplantation homoplastique de l'ovaire. Comptes Rendus Hebdomadaires de Seances et Memoires de la Societe de Biologie 1906; 6:466-8.
2. Krohn PL. Transplantation of the ovary. In: Ovary, Vol. II Physiology, pp.101-28. 2nd edition. (Eds.) Lord Zuckerman & BJ Weir. Academic Press, New York: London, 1977.
3. Gosden RG. Restitution of fertility in sterilized mice by transferring primordial ovarian follicles. Human Reproduction 1990; 5: 499-504.
4. Gosden RG. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. Mol Cell Endocrinol 2000; 163:125-129.
5. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. Hum Reprod Update 2001; 7:525-534.
6. Sztein IM, Sweet H, Farley J, Mobraaten I. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking. Biol Reprod 1998; 58:1071-4.
7. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb G. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at $\pm 196^{\circ}\text{C}$. Hum Reprod 1994; 9:597-603.
8. Liu J, Vander Elsi J, Van den Broecke R, Dhont M. Live off spring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. Biol Reprod 2001; 64:171-8.
9. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. Proc Roy Soc Lond 1963; 158:417.
10. Baker T, Wai Sum O. Development of the ovary and oogenesis. Clin Obstet Gynecol 1976; 3:3-26.
11. Μπόντης ΙΝ. Βασικές γνώσεις Μαιευτικής & Γυναικολογίας. University Studio Press, 2002.
12. Μανταλενάκης Σ. Σύνοψη Μαιευτικής και Γυναικολογίας. Κεφάλαιο Ι: Ωοθηρική λειτουργία και ο νευροενδοκρινικός της έλεγχος. Εκδόσεις Παρισιάνος, Αθήνα, 1992.
13. Tsafriri A, Pomerantz S, Channing C. Inhibition of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. J Reprod Fertil 1982; 64:541-551.
14. Peters H, Byscov AG, Himelstain-Graw R, Faber M. Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. J Reprod Fertil 1975; 45:559-567.
15. Hsueh AJW, Billing H, Tsafriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocrine Review 1994; 15:707-724.
16. Hsuen AJW, Fisenbauer K, Chun SY, Hsu SY, Billing H. Gonadal cell apoptosis, Recent Prog Horm Res 1996; 51:433-446.
17. Robison LL, Bhatia S. Late-effects among survivors of leukaemia and lymphoma during childhood and adolescence. Br J Haematol 2003; 122: 345-359.
18. Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA, Jemal A, Ward E, Anderson RN, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. J Nat Cancer Ins 2003; 95:159-162.
19. Oktay K, Buyuk E, Davis O, Yermakova I, Veeck L, Rosenwaks Z. Fertility preservation in breast cancer patients: IVF and embryo cryopreservation after ovarian stimulation with tamoxifen. Hum Reprod 2003; 18:90-95.
20. Nakanishi T, Wakai K, Ishikawa H, Nawa A, Suzuki Y, Nakamura S, Kuzuya K. A comparison of ovarian metastasis between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. Gynecol Oncol 2001; 82:504-509.
21. Rodi RW, Hoffmann C, Gosheger G, Leidinger B, Jurgens H, Winkelmann W. Ewing's sarcoma of the pelvis: combined surgery and radiotherapy treatment. J Surg Oncol 2003; 83:154-160.
22. Ozaki T, Flege S, Kevric M, Lindner N, Maas R, Delling G, Schwarz R, von Hochstetter AR, Salzer-Kuntschik M, Berdel WE et al. Osteosarcoma of the pelvis: experience of the Cooperative Osteosarcoma

- Study Group. *J Clin Oncol* 2003; 21:334-341.
23. Pisters PW, Ballo MT, Fenstermacher MJ, Feig BW, Hunt KK, Raymond KA, Burgess MA, Zagars GK, Pollock RE, Benjamin RS et al. Phase I trial of preoperative concurrent doxorubicin and radiation therapy, surgical resection, and intraoperative electron-beam radiation therapy for patients with localized retroperitoneal sarcoma. *J Clin Oncol* 2003; 21:3092-3097.
 24. Gladstone DE, Prestrud AA, Pradhan A, Styler MJ, Topolsky DL, Crilley PA, Hoch S, Huppert A, Brodsky I. High-dose cyclophosphamide for severe systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2002; 11:405-410.
 25. Stallmach A, Wittig BM, Moser C, Fischinger J, Duchmann R, Zeitz M. Safety and efficacy of intravenous pulse cyclophosphamide in acute steroid refractory inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52:377-382.
 26. Langford CA, Talar-Williams C, Barron KS, Sneller MC. Use of a cyclophosphamide-induction methotrexate-maintenance regimen for the treatment of Wegener's granulomatosis: extended follow-up and rate of relapse. *Am J Med* 2003; 114:463-469.
 27. Couto-Silva AC, Trivin C, Thibaud E, Esperou H, Michon J, Brauner R. Factors affecting gonadal function after bone marrow transplantation during childhood. *Bone Marrow Transpl* 2001; 28:67-75.
 28. Burt RK, Traynor AE, Craig R, Marmont AM. The promise of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31:521-524.
 29. Meirow D. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169:123-131.
 30. Σόρτζης Α, Πάντος Γ, Μπόντης ΙΝ. Η μεταμόσχευση των ωοθηκών σε σοβαρού βαθμού ενδομητρίωση. *Ελληνική Μαιευτική & Γυναικολογία* 2004; 16(4):457-463.
 31. Newman B, Mu H, Butler LM, Millikan RC, Moorman PG, King MC. Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population based series of American women. *J Am Med Assoc* 1998; 279:915-921.
 32. Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, Scheuer L, Hensley M, Hudis CA, Ellis NA, Boyd J, Borgen PI, Barakat RR et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2002; 346:1609-1615.
 33. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Van't Veer L, Garber JE, Evans G, Isaacs C, Daly MB, Matloff E, et al. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002; 346:1616-1622.
 34. Ταρλατζής ΒΚ. Εξωσωματική Γονιμοποίηση. *Ανθρώπινη Αναπαραγωγή ΑΠΘ* 2001; σ.85-95.
 35. Ταρλατζής ΒΚ, Μπίλη Ε. Διατήρηση της γονιμότητας σε γυναίκες με όγκους ωοθηκών. Θ Αγοραστός, ΙΝ Μπόντης. *Πρόληψη στη Γυναικολογική Ογκολογία*: 2003; 32:219-222.
 36. Kim S. Fertility preservation in female cancer patients: current development and future directions. *Fertil Steril* 2006 Jan; 85(1):1-11.
 37. Parkes AS, Smith AU. Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1953 Jan 15; 140(901):455-70.
 38. Kim SS, Radford AJ, Harris M et al. Ovarian tissue harvested from lymphoma patients to preserve fertility may be safe for autotransplantation. *Hum Reprod* 2001; 16: 2056-2060.
 39. Shaw IM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissues. *Theriogenology* 2000b; 53:59-72.
 40. Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *RBM Online* 2006; 10(6):729-734.
 41. Shaw JM, Bowles J, Koopman P, Wood EC, Trounson AO. Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Hum Reprod* 1996; 11:1668-73.
 42. Vom Saal E, Finch CE, Nelson JE. Natural history and mechanisms of reproductive ageing in humans, laboratory rodents and other selected vertebrates. In: *The Physiology of Reproduction* (Ed). E Knobil, JD Neill. New York, Raven Press 1994; pp.1213-315.
 43. Faddy MI. Follicle dynamics during ovarian ageing. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163:43-48.
 44. Newton H, Lingworth P. In-vitro growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. *Hum Reprod* 2001; 16:423-9.
 45. Ojeda SR, Romero C, Tapia V, Dissen GA. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *MoI Cell Endocrinol* 2000; 163:67-71.
 46. Anesetti G, Lombide PM, D' Albora H, Ojeda SR. Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell Tissue Res* 2001; 306:231-237.
 47. Shaw JM, Cox SI, Trounson AO, Jenkin G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse. Implications for human applications. *Mol Cell Endocrinol* 2000a; 161:103-110.
 48. Goding JR, Harrison EA, Heap RB, Linzel IL. Ovarian activity in the ewe after autotransplantation of the ovary or uterus to the neck. *J Physiol* 1967; 191:129-30.
 49. Wang X, Huifang Ch, Hang Y et al. Cryopreservation: fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002; 415:385-393.
 50. Cleary M, Snow M, Paris M, Shaw J, Cox SI, Jenkin G. Cryopreservation of mouse ovarian tissue following prolonged exposure to an ischemic environment. *Cryobiology* 2001; 42:121-133.

51. Snow M, Cleary M, Cox SI, Shaw I, Paris M, Jenkin G. Comparison of the effects of in vitro and in situ storage on the viability of mouse ovarian tissue collected after death. *Reprod Fertil Dev* 2001; 13:389-394.
52. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996; 14:1487-1491.
53. Newton H, Fisher J, Arnold JR, Pegg OE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 1998; 13:376-80.
54. Danjean R, Boeck W, Gordts S, Brosens I. Ovarian transplantation by selective microvascular anastomoses in the rabbit. *British J Ob & Gyn* 1982; 89:652-656.
55. Harp R, Leibach J, Black J, Keldal C, Karrow A. Cryopreservation of murine ovarian tissue. *Cryobiology* 1994; 31:336-348.
56. Cox SL, Shaw JM, Jenkin G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. *J Reprod Fertil* 1996; 107:315-322.
57. Newton H, Aubard Y, Rutherford A et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996; 11:1487-1491.
58. Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 1997; 12:101-106.
59. Von Eye Corleta H, Corleta O, Capp E, Edelweiss MI. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. *Fertil Steril* 1998; 70(1):16-19.
60. Aubard Y, Piver P, Cogni Y, Fermeaux V, Poulin N, Driancourt MA. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. *Hum Reprod* 1999; 14:2149-2154.
61. Callejo J, Jaurequi MT, Valls C, Fernandez E, Cabre S, Lailla M. Heterotopic ovarian transplantation without vascular anastomosis in syngeneic Lewis rats: six-month control of estradiol and follicle-stimulating hormone concentrations after intraperitoneal and subcutaneous implants. *Fertil Steril* 1999; 72(3):513-517.
62. Baird DT, Webb R, Campbell BK et al. Long term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at $\pm 196^{\circ}\text{C}$. *Endocrinology* 1999; 140:462-471.
63. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Restoration of a normal reproductive life span after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 2000; 15:1300-1304.
64. Imthurn B, Cox S, Jenkin G et al. Gonadotrophin administration can benefit ovarian tissue grafted to the body wall: implications for human ovarian grafting. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163:141-146.
65. Gook DA, McCully BA, Edgar DH, McBain JC. Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2001; 16:417-22.
66. Wang X, Huifang C, Hang Y et al. Cryopreservation: fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002; 415:385-397.
67. Gook DA, Edgar DH, Borg J et al. Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2003; 18:1772-1781.
68. Sortsis A, Pados G, Tarlatzis B, Saratsi K, Savas J, Skepastianos P, Tzioufa V, Kazakos P, Tzioufa V, Kazakos G, Sdrani V, Bontis J. Laparoscopic autologous orthotopic and heterotopic ovarian transplantation in rabbits. *Proceeding of the 14 th Annual Congress of the European Society for Gynaecological Endoscopy*, 2005; Abstract No: O-063:p.S28.
69. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000; 342:1919.
70. Radford JA, Lieberman BA, Brison DR, Smith AR, Critchlow JD, Russell SA, Watson AJ, Clayton JA, Harris M, Gosden RG et al. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2001; 357:1172-1181.
71. Donnez J, Dolmans MM, Delmylle D, Martinez-Madrid B. Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364:1405-1410.
72. Silber JS, Lenahan KM, David J Levine, Pineda, JA, Gorman SK, Friez MJ. Ovarian transplantation between monozygotic twins discordant for premature ovarian failure. *N Engl J Med* 2005; 353:8-63.
73. Dror M. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005; 3:353-356.
74. Demeestre I, Simon P, Buxant F, Robin V, Fernandez-Aquilar S, Center J, Delbaere A, Englert Y. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum Reprod* (19 April 2006; Epub ahead of print).
75. Leporrier M, Von Theobald P, Roffe JL, Muller G. A new technique to protect ovarian function before pelvic irradiation. *Cancer* 1987; 60:2201-2204.
76. Marconi G, Quintana R, Rueda-Leverone NG, Vighi S. Accidental ovarian autograft after a laparoscopic surgery: case report. *Fertil Steril* 1997; 68:364-6.
77. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and trans-

- plantation. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. (Eds) *Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Laboratory and Clinical Perspectives*. Martin Dunitz, London, 2001b; pp.279-284.
78. Callejo J, Salvador C, Miralles A et al. Long term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:M4489-4494.
79. Kim SS, Yang HW, Kang HG. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril* 2004; 82:679-685.
80. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 363:837-840.
81. Schmidt KL, Yding Andersen C, Loft A, Byskov AG, Ernst E, Andersen AN. Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. *Hum Reprod* 2005; 20:3539-3546.
82. Wolner-Hanssen P, Hägglund L, Ploman F, Ramirez A, Manthroe R, Thuring A. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to the right forearm 4 1/2 years after autologous stem cell transplantation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84:695-698.
83. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983; 301:527-530.
84. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Human Reproduction Update* 2006; 12(5):519-535.