

Metode očuvanja fertiliteta u pacijentica koje se liječe radi hematoloških malignih bolesti

Slekovac, Zrinka

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:799158>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Zrinka Slekovac

**Metode očuvanja fertiliteta
u pacijentica koje se liječe radi
hematoloških malignih tumora**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju, Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Rebro, pod vodstvom doc.dr.sc. Nadire Duraković i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016.

Popis kratica:

AMH- Anti- Mullerov hormon

BMD- *Bone mineral density (engl.)*- Koštana mineralna gustoća

COF- Ciklička ovarijska funkcija

FSH- Folikulo-stimulirajući hormon

GnRH- *Gonadotropin- releasing hormone (engl.)*- Hormon koji stimulira otpuštanje gonadotropina

IVF- In vitro fertilizacija

IVM- In vitro maturacija

POF- *Premature ovarian failure (engl.)*- Prerani gubitak funkcije jajnika

SADRŽAJ:

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD.....	1
1.1. Metode očuvanja fertiliteta.....	1
1.1.1. Krioprezervacija embrija.....	1
1.1.2. Krioprezervacija jajnih stanica.....	2
1.1.3. Krioprezervacija tkiva jajnika.....	3
1.1.4. Transpozicija jajnika.....	4
1.1.5. GnRH agonisti.....	4
2. HIPOTEZA.....	8
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	9
3.1. Primarni cilj istraživanja.....	9
3.2. Sekundarni ciljevi istraživanja.....	9
4. ISPITANICI I METODE.....	10
4.1. Ispitanici.....	10
4.2. Metode.....	10
5. REZULTATI.....	12
5.1. Demografski i klinički pokazatelji pacijentica.....	12
5.2. Primarni cilj istraživanja.....	14
5.3. Sekundarni ciljevi istraživanja.....	15
6. RASPRAVA.....	17
7. ZAKLJUČCI.....	24
ZAHVALE.....	25
LITERATURA.....	26
ŽIVOTOPIS.....	30

Metode očuvanja fertiliteta u pacijentica koje se liječe radi hematoloških malignih tumora

Zrinka Slekovac

SAŽETAK

Jedna od dugoročnih komplikacija kemoterapijskog liječenja u mladih bolesnica je gubitak fertiliteta i funkcije jajnika što značajno utječe na njihovu kvalitetu života. Svrha ovog istraživanja je prikazati metode očuvanja fertiliteta u žena oboljelih od limfoma i liječenih kemoterapijom, s naglaskom na korištenje agonista hormona koji oslobađaju gonadotropine (*engl.* Gonadotropin-releasing hormone agonists, GnRHa). Također, svrha je utvrditi učinkovitost GnRH agonista u održanju cikličke ovarijske funkcije (COF) nakon terapije.

Podaci iz medicinske dokumentacije žena (18-40 god.), oboljelih od limfoma u razdoblju od 2011. do 2014. godine, liječenih kemoterapijom, prikupljeni su i retrospektivno analizirani. Dobiveni su podaci o vrsti limfoma i tipu kemoterapijskog protokola koji su primale, menstrualnom statusu prije, tijekom i nakon kemoterapije, te o korištenju GnRH agonista tijekom terapije. Na temelju toga su svrstane u GnRHa i kontrolnu grupu. Primarni cilj bio je utvrditi postotak pacijentica s održanim COF-om nakon terapije.

Ukupno 48 bolesnica zadovoljilo je kriterije uključenja u istraživanje, a od toga je njih 8 tijekom terapije primalo GnRH agonist. Tijekom vremena praćenja (17-63 mj.), svih 8 bolesnica (100%) u GnRHa grupi povratilo je COF, dok je u kontrolnoj grupi to bio slučaj u njih 80% (32 od 40). Razlika se nije pokazala statistički značajnom ($p=0.316$). S druge strane, razlika u medijanu dobi između GnRHa i kontrolne grupe pokazala se značajnom ($p=0.047$), s time da je kontrolna grupa bila starija. Osim toga, analizom je dobiveno da nije bilo značajne razlike u uspostavi COF-a, ovisno o tome jesu li bolesnice mlađe ili starije od 30 godina, dok su bolesnice liječene po eBEACOPP protokolu, u značajno manjem postotku ($p=0.04$) uspostavile COF, u odnosu na one liječene po ABVD protokolu.

Premda je 20% više bolesnica u GnRHa grupi uspostavilo COF nakon terapije, razlika se nije pokazala značajnom, te stoga nije ustanovljena učinkovitost GnRH agonista. Ipak, maleni broj bolesnica koje su primale GnRH agoniste mogao je utjecati na rezultat, te bi u budućim istraživanjima trebalo uključivati više bolesnica koje bi ih primale.

Ključne riječi: očuvanje fertiliteta, GnRH agonist, limfom, COF

Methods of fertility preservation in female patients treated for hematologic malignancies

SUMMARY

Long term complications of chemotherapy treatment in young female patients include loss of fertility and ovarian function, which significantly affects their life quality. The purpose of this research was to demonstrate the methods of fertility preservation in female patients, who suffered from lymphoma and were treated with chemotherapy, with an emphasis on the use of gonadotropin-releasing hormone agonists (GnRHa). Furthermore, the purpose was to assess the efficacy of GnRH agonists in restoring cyclic ovarian function (COF) after treatment.

We collected and retrospectively analyzed data from medical records of women (18-40 years), who suffered from lymphoma in the period between 2011 and 2014, and therefore were treated with chemotherapy. The collected data included the type of lymphoma, type of chemotherapy regimen used, menstrual status before, during and after the chemotherapy, and finally, whether the patient used GnRH agonist during the therapy. Based on this, the patients were divided in the GnRHa and the control group. The primary end point was to determine the percentage of patients who maintained COF.

Total of 48 patients met the enrollment criteria of the research, while 8 of them were treated with GnRH agonist during the therapy. During the follow-up period (17-63 months), each of 8 patients (100%) in the GnRHa group restored COF, whilst in the control group 80% (32/40) of patients restored it. The difference was not statistically significant ($p=0.316$). On the other hand, the difference in the median age between the GnRHa and the control group appeared to be significant ($p=0.047$), with the control group being older. Furthermore, the analysis demonstrated that there was no significant difference in restoring COF, depending on the fact that the patients were over or under 30 years old, whilst the patients treated with eBEACOPP protocol restored COF in smaller percentage ($p=0.04$), compared with those treated with ABVD protocol.

In spite of the fact that 20% more patients in the GnRHa group restored COF after therapy, the difference was not significant, therefore the efficacy of the GnRH agonist was not proven. Still, a small number of patients receiving GnRH agonist could have affected the results, so future research should include more patients receiving this drugs.

Key words: fertility preservation, GnRH agonist, lymphoma, COF

1.UVOD

Tijekom proteklih desetljeća postignut je osobit napredak u liječenju hematoloških bolesnika. Različiti kemo- i radioterapijski protokoli razvijeni su u svrhu liječenja, kako Hodgkinove bolesti, tako i non-Hodgkinovih oblika limfoma. Bolje razumijevanje bolesti dovelo je do boljeg liječenja, stoga je sada sve veći broj bolesnika koji su u dugotrajnoj remisiji. Uz ovako zavidnu kontrolu tumorske bolesti, sve veću pažnju od strane kliničara počinju dobivati nuspojave, osobito one dugoročne, koje liječenje može uzrokovati. Među mladim ženama zasigurno se ističu se neplodnost i prijevremeni gubitak funkcije jajnika (*engl.* Premature ovarian failure, POF), kao posljedice gonadotoksičnosti citostatika. Pri tome rizik za razvoj POF-a iznosi 10-95%, ovisno o dobi, tipu kemoterapije i kumulativnoj dozi lijeka (1).

Metode krioprezervacije embrija, oocita, te tkiva jajnika, metode su očuvanja fertiliteta na raspolaganju ovim bolesnicama, dok je primjena agonista hormona koji oslobađa gonadotropine (*engl.* Gonadotropin-releasing hormone, GnRH), prije i tijekom kemoterapije, metoda ne samo metoda očuvanja fertiliteta, već i potencijalnog sprječavanja POF-a. Ideja očuvanja fertiliteta jednomjesečnom primjenom depo-injekcija (GnRH agonisti) čini se veoma atraktivnom, no treba istaknuti da je stvarna učinkovitost u ljudi još uvijek upitna, s obzirom na nejednoznačnost rezultata različitih istraživanja (2).

1.1. Metode očuvanja fertiliteta

1.1.1. Krioprezervacija embrija

In vitro fertilizacija (IVF) i krioprezervacija embrija klinički je utemeljena metoda očuvanja fertiliteta. Tehnologija iste dobro je poznata i razvijena, što ju čini dobro prihvaćenom, kako među kliničarima, tako i među bolesnicima (3). Međutim, postoje određena pitanja vezana uz korištenje ove tehnologije kod bolesnica koje se liječe od malignih bolesti. Naime, IVF i krioprezervacija embrija odgađaju početak kemoterapije za 2, do čak 6 tjedana u nekim slučajevima. U jednoj studiji (4), primjerice, ustanovljeno je da u bolesnica koje su u ranim stadijima karcinoma dojke negativnih na hormonske receptore, rana primjena kemoterapije poboljšava ishod. Osim toga, ova metoda često nije primjenjiva u vrlo mladih bolesnica, te u bolesnica koje nemaju partnera (5,6).

U slučajevima kada se visoke koncentracije estradiola smatraju opasnim, kao u slučaju karcinoma dojke pozitivnih na estrogenske receptore, potreban je dodatan oprez vezan uz

primjenu ove metode. Preporuke su da se u ovim slučajevima u proces ovarijske stimulacije uključi inhibitor aromataze poput letrozola, kako bi se pokušao smanjiti potencijalni pozitivan učinak estradiola na rast tumorskih stanica (7). Konačno, kako bi se što više smanjilo vrijeme odgađanja kemoterapije, kontrolirana ovarijska hiperstimulacija gonadotropinima može se početi bilo koji dan menstrualnog ciklusa (8). Treba naglasiti da u studiji (9) koja je uspoređivala ishode ove metode u bolesnica liječenih radi malignoma i onih koje to nisu, ustanovljeno je da nije bilo razlike u ukupnoj količini korištenih jedinica gonadotropina, broju prikupljenih jajašaca, te generiranih embrija. Kumulativna stopa trudnoća u bolesnica liječenih radi malignoma bila je 37%, a u kontrolnoj skupini 43%. I konačno, kumulativna stopa živorođenih bila je 30% naprama 32% u korist kontrolne skupine.

1.1.2. Krioprezervacija jajnih stanica

Unazad nekoliko godina, krioprezervacija jajnih stanica ne smatra se više eksperimentalnom metodom. U odnosu na krioprezervaciju embrija postoje određene sličnosti i razlike. Krioprezervacija jajnih stanica, naime, također zahtijeva stimulaciju jajnika gonadotropinima, što je vezano uz odgodu početka kemoterapije i potencijalno opasne razine estradiola. S druge strane, ova opcija je prihvatljivija u mlađih bolesnica, te u onih koje nemaju partnera (1). Ova metoda, premda sve više prihvaćena kao metoda očuvanja fertiliteta, također ne garantira uspjeh, i znatno ovisi o broju dobivenih zrelih jajnih stanica (5, 10).

1.1.3. Krioprezervacija tkiva jajnika

Krioprezervacija tkiva jajnika, eksperimentalna je metoda koja podrazumijeva laparoskopsko uzimanje tkiva jajnika prije početka kemo- odnosno radioterapije, s ciljem zamrzavanja tkiva. Nakon završetka liječenja, cilj je bilo ortotopičnom, bilo heterotopičnom reimplantacijom, omogućiti ženi ponovnu funkciju jajnika, u slučaju da ista zakaže (5,10). Ova metoda predmet je brojnih istraživanja, vezanih uz njen uspjeh, ali i potencijalne komplikacije i bolesnice kojoj je dijagnosticiran Hodgkinov limfom stadija 4, te je prije aplikacije MOPP/ABV protokola zamrznuto tkivo jajnika. Pacijentica je, posljedično kemoterapiji, razvila POF, te joj je iz tog razloga reimplantirano tkivo zamrznutog jajnika pet godina nakon završetka kemoterapijskog liječenja. Nekoliko mjeseci nakon toga funkcija jajnika je ponovno uspostavljena i bolesnica je spontano zatrudnjela.

Do sada je ova metoda omogućila rađanje četrdesetak zdrave novorođenčadi (1). Ipak, određene zabrinutosti vežu se uz nju. U prvom redu to je potencijalna opasnost postojanja malignih stanica u zamrznutom tkivu jajnika, i posljedična reimplantacija tih stanica u tijelo žene. Tako je, primjerice Kopenhagenska grupa istraživača, iskusnih u ovom području, detektirala maligne stanice u jajnicima većine žena oboljelih od leukemije. Zaključak istog je bio, da se reimplantacija tkiva jajnika u žena oboljelih od leukemije ne preporuča (12). Druga studija (13) analizirala je 5571 autopsijskih nalaza žena mlađih od 40 godina koje su oboljele od različitih karcinoma. Nađene su metastatske maligne stanice u jajnicima 22.4% žena, a u žena oboljelih od limfoma u 14.7% slučajeva. Ovi nalazi upućuju na nužnost pronalaska metode koja bi sa sigurnošću otkrivala maligne stanice u jajnicima.

Izuzev reimplantacije tkiva jajnika, jedna od potencijalnih koristi zamrzavanja istog, zasigurno će u budućnosti, s razvitkom adekvatne tehnologije, biti mogućnost in vitro maturacije (IVM) primordijalnih folikula. Tako krioprezervacija tkiva jajnika postaje, na neki način, ulaganje u budućnost (1).

1.1.4. Transpozicija jajnika

Opcija transpozicije jajnika, iz pelvične regije u gornju abdominalnu, opcija je koja se može preporučiti mladim ženama s karcinomom cerviksa, limfomom u području male zdjelice, ili kod planiranja bilo kojeg adjuvantnog radioterapijskog liječenja (1). Uspjeh je između 50% i 90% i ovisi o dobi bolesnice, adjuvantom kemoterapijskom protokolu, mjestu transpozicije, vaskularnoj opskrbi jajnika, te opsegu radijacije (14). Osim varijabilnog uspjeha zahvata, zabrinutosti postoje i u vezi utjecaja zračenja na uterus, koje bi također moglo dovesti do poremećaja fertiliteta (1).

1.1.5. GnRH agonisti

S obzirom na način primjene, najjednostavnija metoda očuvanja fertiliteta zasigurno je primjena GnRH-a agonista u obliku depo-injekcija prije i za vrijeme kemoterapije. Riječ je o metodi čiji je točan mehanizam djelovanja i dalje predmet rasprava, ali u osnovi se vodi idejom da ovi lijekovi smanjenjem lučenja gonadotropina, smanjuju dozrijevanje folikula jajnika, čineći ih manje osjetljivima na pogubno djelovanje kemoterapije (15). Očito je kako bi ovaj mehanizam djelovanja, u idealnom slučaju, ne samo omogućivao očuvanje fertiliteta, već i sprječavanje POF-a. Istraživanja na životinjskim modelima (16,17) dala su

poticaj brojnim istraživanjima na ljudima koja do danas nisu uspjela dokazati stvarnu djelotvornost GnRH agonista u ljudi (2).

Prvo istraživanje na životinjskim modelima koje je dalo obećavajuće rezultate u vezi uloge GnRH agonista u zaštiti gonada od toksičnosti alkilirajućih agensa je ono Glodea i sur. (16). Ta skupina izložila je skupina mužjaka miševa ciklofosfamid, te je dijelu skupine prije i za vrijeme apliciranja ciklofosfamida dala GnRH agonist. Pokazalo se kako je isti u znatnoj mjeri zaštitio miševe od testikularnog oštećenja.

S obzirom na to da istraživanja u ljudi u svakom slučaju ne mogu koristiti tako invazivne metode procjene broja folikula, kao ona u životinja, možda najzanimljivije istraživanje je ono provedeno na skupini rhesus majmuna (17). Ta skupina je izložila grupu od šest ženki rhesus majmuna ciklofosfamid, s time da su tri majmuna dobivala injekcije GnRH agonista. Prije početka tretmana, svim ženkama uklonjen je jedan jajnik, koji je po završetku tretmana uspoređivan s drugim jajnikom, izloženim tretmanu. U skupini koja je primala samo ciklofosfamid 64.6% primordijalnih folikula bilo je izgubljeno, u usporedbi s gotovo 28.9% u skupini koja je primala i GnRH agonist.

Mehanizmi potencijalnog protektivnog djelovanja GnRH agonista prema Blumenfeldu i sur. (15):

a) Smanjivanje lučenja folikulostimulirajućeg hormona (FSH)

Analozi GnRH-a su sintetske tvari koje se vežu na receptore endogenog GnRH-a, te s obzirom na kontinuirani način primjene interferiraju s cikličkim izlučivanjem endogenog GnRH-a. Upravo ova promjena iz cikličke u kontinuiranu izloženost hipofize gonadotropinima, dovodi do smanjenja izlučivanja tih hormona. U bolesnika koje su na kemoterapiji, alkilirajući agensi dovode do destrukcije folikula jajnika, što pak smanjuje izlučivanje inhibina i spolnih hormona, te posljedično dovodi do povećanog izlučivanja gonadotropina. Ovaj slijed događaja uzrokuje povećano aktiviranje preantralnih folikula, koji sazrijevanjem postaju osjetljiviji na djelovanje kemoterapeutika. Upravo taj začarani krug prekidaju GnRH agonisti, remeteći hipotalo-hipofizarnu osovinu tako da je dovode u takoreći prepubertetno stanje (15,18). Ideja prepubertetnog stanja kao potencijalno protektivnog u žena ima svoju podlogu u istraživanju (19) koje je u dugotrajnom praćenju djece mlađe od 15 godina liječene radi Hodgkinovog limfoma, pokazalo kako je samo 13% djevojčica razvilo POF, dok je u 83% dječaka dokazana azoospermija. Zanimljivo je još

istaknuti kako je sadašnje načelo da su primordijalni folikuli neovisni o djelovanju gonadotropina. Ipak neka istraživanja (20,21) došla su do otkrića koja će možda u budućnosti promijeniti to načelo. Naime, pokazala su kako primordijalni i primarni folikuli jajnika izražavaju mRNA za receptore gonadotropina. Osim toga, ako se zanemari potencijalni direktni učinak gonadotropina na folikule, još uvijek ostaje onaj indirektni. Naime, faktori rasta koje luče preantralni folikuli ovisni o gonadotropinima, djeluju stimulacijski na primarne i primordijalne folikule (22).

b) Smanjenje utero-ovarijske perfuzije

Smanjeno lučenje estrogena, kao rezultat smanjene aktivacije folikula jajnika, uslijed djelovanja GnRH agonista, dovodi do smanjenja utero-ovarijske krvne opskre (23,24). Na taj način GnRH agonisti, indirektno, smanjuju izloženost jajnika gonadotoksičnim lijekovima, odnosno smanjuju njegovu kumulativnu izloženost istima.

c) Aktivacija GnRH-receptora

Prethodno navedeni mehanizmi posredovani su djelovanjem gonadotropina. Nekoliko istraživanja (25,26,27), s druge strane, pokazalo je da spolne žlijezde, kako primata, tako i ljudi, posjeduju GnRH receptore. Osobito je zanimljivo istraživanje Grundkera i Emonsa (26), koje je na stanicama ovarijskog karcinoma pokazalo kao aktivacija GnRH receptora dovodi do smanjenog broja apoptoza u staničnim linijama tog karcinoma.

d) Povećanje razine sfingozin-1-fosfata

Sfingozin-1-fosfat molekula je čija se uloga u programiranoj smrti stanica intenzivno istražuje. Istraživanja na hematopoetskim stanicama (28,29) pokazala su kako ova molekula blokira proapoptotičko djelovanje ceramida. Osim toga, istraživanje na miševima (30) kojima je u okolicu jajnika injiciran sfingozin-1-fosfat prije zračenja, pokazalo je kako dva tjedna poslije zračenja nema razlike u analiziranim jajnicima između ozračenih i neozračenih miševa. Ipak, ovo je tek početak istraživanja uloge ove molekule u programiranoj staničnoj smrti, kao i mogućeg djelovanja GnRH agonista na razinu iste u stanici.

e) Zaštita nediferenciranih spolnih matičnih stanica

Jedan od postulata reproduktivne biologije je onaj da ženke sisavaca još u fetalnom razdoblju formiraju konačnu rezervu jajnih stanica, koje u daljnjem životu postupno

propadaju. Istraživanje Johnsona i sur. (31) dovelo je do revolucionarnih rezultata u tom području, pokazavši kako bi jajnici prepubertetnih ženki miševa mogli posjedovati mitotički aktivne zametne stanice. Izlaganje tih miševa mitotičkom toksinu busulfanu dovelo je do uništenja zalihe primordijalnih folikula bez induciranja atrezije. Može se nagađati kako bi GnRH agonisti mogli imati ulogu u zaštiti ovih nediferenciranih matičnih stanica (15)

Istraživanja GnRH agonista u ljudi

Prema najnovijim podacima (1) do sad je 20 istraživanja (15 retrospektivnih i 5 randomiziranih kontroliranih pokusa) pokazalo kako je u 2038 bolesnica tretiranih GnRH agonistom za vrijeme kemoterapije, došlo do značajnog smanjenja broja prijevremenog zatajenja funkcije jajnika u usporedbi s kontrolom. S druge strane u 8 istraživanja (2 retrospektivna i 6 randomiziranih kontroliranih pokusa) na ukupno 509 bolesnica, rezultati su bili negativni, tj. nije dokazan protektivni učinak GnRH agonista. Osim toga 10 metaanaliza došlo je do zaključka kako su GnRH agonisti korisni u protekciji jajnika za vrijeme gonadotoksične terapije.

Jedno od najvećih prospektivnih istraživanja (3) uključivalo je 281 ženu oboljelu od karcinoma dojke. U 1-godišnjem praćenju bolesnica nakon kemoterapijskog liječenja ustanovljena je značajna razlika u broju slučajeva prijevremene menopauze (25.9% vs 8.9% u korist kontrolne grupe u odnosu na onu tretiranu GnRH agonistima). Istraživanje Demeestere i sur. (2) dovelo je do ponešto drukčijih rezultata. Naime, nakon 1-godišnjeg praćenja 84 bolesnice liječene radi limfoma, ustanovljeno je kako je incidencija POF-a, kako u GnRHa grupi, tako i u kontrolnoj grupi, otprilike 20%. No, značajna razlika evidentirana je u razinama anti-Mullerovog hormona (AMH) (1.4 ± 0.35 v 0.5 ± 0.15 ng/ml; $p=0.040$) u korist GnRHa grupe.

Posebno su zanimljivi rezultati Njemačke grupe za istraživanje Hodgkinove bolesti (32). Istraživanje je uključivalo ukupno 254 žene liječene radi Hodgkinovog limfoma ranog stadija s nepovoljnim prognostičkim čimbenicima. Podijeljene su u dvije skupine, prva skupina primila je 4 ciklusa terapije po ABVD protokolu, a druga je nakon 2 ciklusa terapije po ABVD protokolu primila i 2 ciklusa po BEACOPP protokolu. Podjednaki udio žena iz svake skupine primao je GnRH agoniste. Ono što je zanimljivo je broj trudnoća, koji je išao u prilog skupine koja je primila kombiniranu 2ABVD+ 2BEACOPP terapiju, ali i statistički značajan ($p=0,001$) veći broj trudnoća u žena koje su primale GnRH

agoniste bez obzira na to u kojoj su skupini bile. Jasno je iz prikaza ovih istraživanja kako procjenu fertiliteta u žena, i potencijalno protektivno djelovanje GnRH agonista, nipošto nije jednostavno jednoznačno odrediti.

S druge strane, jedno od prvih randomiziranih prospektivnih istraživanja (33), uključivalo je 30 muškaraca i 18 žena liječenih od Hodgkinove bolesti. Dvadeset muškaraca i 8 žena za vrijeme kemoterapijskog liječenja primalo je buserelin, te je nakon 3 godine praćenja utvrđeno kako su svi muškarci oligo/azoospermični, a 4 od 8 žena (50%) je amenoroično, u usporedbi sa 6 od 9 (67%) amenoroičnih žena u kontrolnoj skupini. Zaključeno je kako su GnRH agonisti neefektivni. Do sličnih zaključaka dovelo je još jedno istraživanje (34), premda nešto drukčijom metodologijom. Istraživanje je uključivalo 20 bolesnica oboljelih od Hodgkinove bolesti od kojih je 10 primalo GnRH agoniste za vrijeme kemoterapije, dok je drugih 10 bilo usklađeno s njima prema dobi i terapiji. Osim toga, dodano je još deset zdravih žena čiji su parametri također analizirani. Istraživanje je provedeno tako da su ženama, minimalno 6 mjeseci nakon završetka terapije, nekoliko puta određivani hormonski parametri ovarijske rezerve, u prvom redu AMH, te im je rađen ultrazvuk radi određivanja broja antralnih folikula. Nije pronađena razlika između grupe koja je primala GnRH agoniste u odnosu na onu koja nije, što se tiče parametara ovarijske rezerve. Štoviše, rezultati su u obje grupe bili značajno lošiji u odnosu na one zdravih žena.

2. HIPOTEZA

Hipoteza je da korištenje GnRH agonista za vrijeme kemoterapije, u žena oboljelih od limfoma, omogućuje u značajno većem postotku očuvanje cikličke ovarijske funkcije (COF) nakon prestanka terapije, u odnosu na one koje ne primaju ništa.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Primarni cilj istraživanja

Primarni cilj ovog istraživanja je utvrditi da li korištenje GnRH agonista za vrijeme kemoterapijskog liječenja žena oboljelih od limfoma, povećava izgleda za očuvanje COF-a nakon terapije.

3.2. Sekundarni ciljevi istraživanja

Sekundarni ciljevi ovog istraživanja uključuju:

- Analizu demografskih i kliničkih značajki bolesnica
- Utvrđivanje povezanosti između dobi i zadržavanje COF-a nakon terapije
- Utvrđivanje povezanosti kemoterapijskog protokola i i zadržavanja COF-a
- Zabilježene su i sve trudnoće evidentirane u vremenu praćenja bolesnica

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U istraživanju su retrospektivno analizirani podaci bolesnica koje su započele liječenje radi dijagnoze histološki verificiranog limfoma, na Zavodu za hematologiju KBC-a Rebro, u razdoblju od početka 2011. god. do kraja 2014. god. Ukupno su identificirane 52 bolesnice koje su odgovarale kriterijima koje je zahtijevalo istraživanje. Od toga su za 48 bolesnica bili dostupni svi podaci potrebni za analizu.

Kriteriji prema kojima su bolesnice uključene u istraživanje su sljedeći:

- Dob između 18 i 40 godina prilikom početka kemoterapije
- Premenopauza
- Prvi put postavljena dijagnoza limfoma
- Liječenje limfoma uključivalo je kemoterapiju
- Postignuta kompletna remisija bolesti
- Nije zabilježen relaps bolesti u promatranom vremenu
- Isključene bolesnice sa smrtnim ishodom

4.2. Metode

Bolesnice obuhvaćene ovim istraživanjem identificirane su prema vodećim dijagnozama, putem podataka iz Bolničkog informacijskog sustava (BIS), te medicinske dokumentacije sadržane u bolničkoj arhivi. Relevantni podaci o bolesnicama prikupljeni su na isti način. Analizirani su podaci o dobi, datumu postavljanja dijagnoze limfoma, tipu limfoma, zatim prvoj liniji kemoterapije i postizanju kompletne remisije. Nadalje, utvrđeno je da li je bolesnica primala GnRH agonist u tijeku kemoterapije, zatim postojanje i redovitost menstrualnih ciklusa prije, za vrijeme i nakon kemoterapije, te konačno, da li je došlo do trudnoće u razdoblju nakon liječenja.

Bolesnice koje su primale GnRH agonist, dobivale su 7-14 dana prije, te za vrijeme kemoterapije, jednom mjesečno, depo-injekcije goserelin (3.6 mg)- odnosno triptorelin (3.75 mg)-acetatata supkutano. Pacijentice su GnRH agonist primale prema vlastitom izboru.

Glavni ishod prema kojemu je ovom istraživanju određivana učinkovitost GnRH agonista, bio je spontani povratak, odnosno zadržavanje, redovitog menstrualnog ciklusa nakon kemoterapije, uz napomenu da je minimalno 17 mjeseci prošlo od početka kemoterapijskog liječenja do trenutka kada je evidentiran menstrualni status u pojedine bolesnice.

OBRADA PODATAKA I STATISTIČKE METODE

Demografski i klinički pokazatelji bolesnica prikazani su tablično, a postotci COF-a u pojedinim skupinama grafički. Karakteristike populacije, izražene medijanima, uspoređivane su korištenjem Mann-Whitney U testa, radi nenormalne distribucije podataka. Razlika COF-a između pojedinih grupa analizirana je korištenjem Fisherovog egzaktnog testa. Značajnima su se smatrale razlike za $p < 0.05$.

ETIČKA PITANJA

Istraživanje je provedeno u sklopu planiranog istraživanja pod nazivom „Učinkovitost agonista GnRH u očuvanju funkcije jajnika u oboljelih od malignih hematoloških bolesti liječenih kemoterapijom ili transplantacijom hematopoetskih matičnih stanica“, koje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb. S obzirom na retrospektivni karakter ovog istraživanja, nije bila potrebna informirana suglasnost bolesnica.

5.REZULTATI

5.1. Demografske i kliničke značajke bolesnica

U razdoblju od siječnja 2011. god. do prosinca 2014. god. ukupno 52 žene oboljele od limfoma u dobi od 18 do 40 godina, započele su kemoterapijsko liječenje na KBC Rebro, te su ostvarile kompletnu remisiju bez relapsa bolesti. Od njih 52, kompletni podaci potrebni za analizu u ovom istraživanju bili su dostupni za njih 48. Osam od 48 pacijentica (16,67%) dobilo je prije i za vrijeme kemoterapijskog liječenja GnRH agonist.

Što se tiče dobne raspodjele, medijan dobi u GnRHa grupi iznosi 22.5 god (raspon godina 18-38), dok onaj u kontrolnoj grupi iznosi 28 god (raspon godina 18-40). Analiza je pokazala statistički značajnu razliku u medijanima dobi između GnRHa i kontrolne grupe ($p=0.047$).

Što se tiče dijagnoza, u GnRHa grupi 7 od 8 žena (87,5%) oboljelo je od Hodgkinovog limfoma, u usporedbi s 22 od 40 žena (55%) u kontrolnoj grupi. S obzirom na raspodjelu dijagnoza u ove dvije grupe, razlikovao se i raspored kemoterapijskih protokola kako je i vidljivo iz priložene tablice. (Tablica 1.)

Medijan vremena praćenja u GnRHa grupi iznosi 32 mjeseca, dok onaj u kontrolnoj grupi iznosi 41 mjesec. Analiza je pokazala da razlika nije značajna ($p=0.146$)

Osim podataka navedenih u tablici, treba naglasiti kako su sve bolesnice, izuzev dvije, imale prije početka kemoterapije redovite menstrualne cikluse. Jedna bolesnica s nepravilnim ciklusima je iz GnRHa grupe, a druga je iz kontrolne grupe.

Tablica 1. Demografske i kliničke značajke bolesnica

Karakteristike	GnRHα grupa (n=8)		Kontrolna grupa (n=40)	
	No.	%	No.	%
Dob, godine				
1) Medijan		22,5		28
2) Raspon		18-38		18-40
Dijagnoza*				
1) Hodgkinov limfom	7	87,5	22	55
2) Non-Hodgkinov limfom (ukupno):	1	12,5	18	45
a) DLCL	1	12,5	14	35
b) FL	0	0	2	5
c) MZL	0	0	1	2,5
Kemoterapijski protokol**				
1) ABVD	4	50	9	22,5
2) eBEACOPP	2	25	10	25
3) CHOP/CHOEP	1	12,5	16	40
4) ABVD+BEACOPP(2+2)	1	12,5	3	7,5
Vrijeme praćenja, mjeseci				
1) Medijan		32		41
2) Raspon		20-56		17-63

Kratice: DLBCL (Difuzni B-velikostanični limfom), TCL (Limfom T-stanica), FL (Folikularni limfom), MZL (Limfom marginalne zone), ABVD (doksorubicin, bleomicin, vinblastin, dakarbazin), eBEACOPP (bleomicin, etopozid, doksorubicin, ciklofosamid, vinkristin, prokarbazin, prednizolon), CHOP (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednison) CHOEP (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, etopozid, prednison)

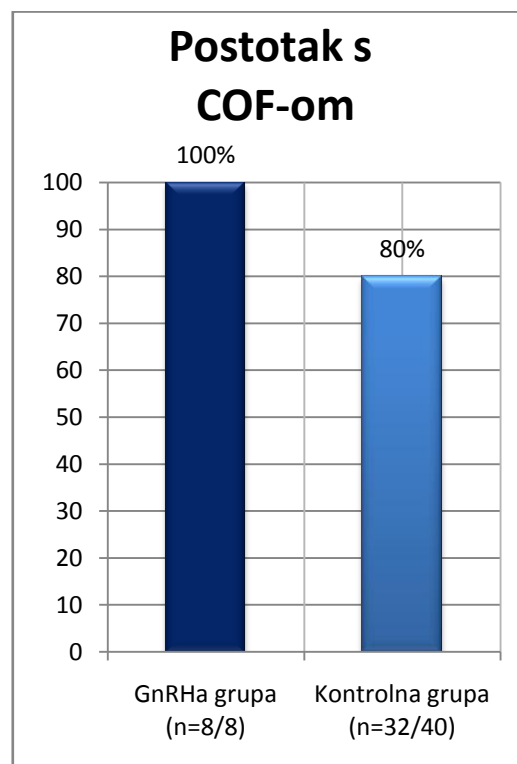
*Kao posebna dijagnoza nevrštena u ove navedene u tablici je limfom mozga tretiran specifičnim protokolom HD MTX ARAC (također nevršten među protokole)

**Kao poseban kemoterapijski protokol (nevršten) primijenjen kod jedne bolesnice oboljele od non-Hodgkin limfoma, korišten je rituksimab-bendamustin

5.2. Primarni cilj istraživanja

Primarni cilj istraživanja bio je usporediti postotak žena s održanom cikličkom ovarijskom funkcijom nakon kemoterapijskog liječenja, u ovisnosti o tome jesu li primale GnRH agonist ili nisu.

Svih 8 bolesnica (100%) koje su primale GnRH agoniste ponovno su nakon kemoterapije uspostavile regularne menstruacijske cikluse. U kontrolnoj grupi ukupno 32 od 40 bolesnica (80%) uspostavilo je regularne cikluse tijekom vremena praćenja. Statistička analiza nije pokazala značajnu razliku između ovih dviju grupa ($p=0.316$), pri čemu treba naglasiti kako je analiza bila ograničena zbog toga što je broj bolesnica u GnRHa grupi bio vrlo mali (8). Podaci su prikazani na Slici 1.

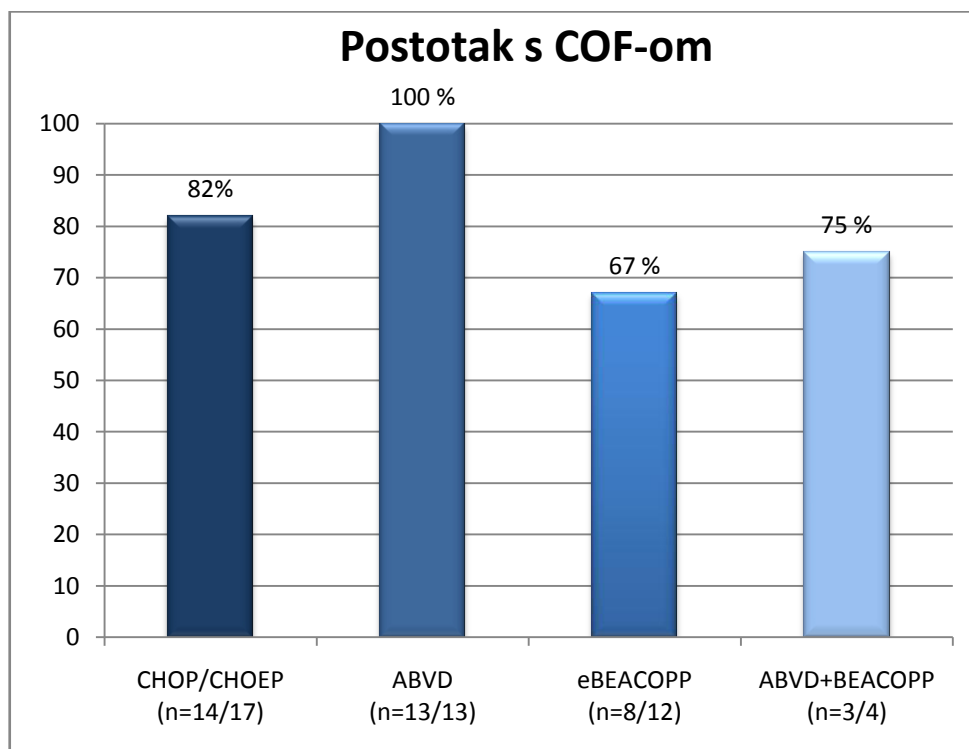


Slika 1. Postotak bolesnica s održanom cikličkom ovarijskom funkcijom (COF) nakon kemoterapije u ovisnosti o primanju GnRH agonista

5.3. Sekundarni ciljevi istraživanja

- **Povezanost vrste kemoterapijskog protokola i postotka bolesnica s COF-om nakon kemoterapije**

Sve bolesnice koje su primale terapiju po ABVD protokolu (13/13) nakon kemoterapije imaju regularne cikluse. U skupini koja je primala terapiju po eBEACOPP protokolu, 8 od 12 bolesnica (67%) također ima regularne cikluse, dok je u skupini koja je primala terapiju po CHOP ili CHOEP protokolu to slučaj s 14 od 17 bolesnica (82%). I konačno, 4 bolesnice primale su kombinaciju od 2 ciklusa ABVD- i 2 ciklusa BEACOPP-a, od njih 4 ukupno 3 ima regularne cikluse. (Slika 3.) S obzirom na 100%-ni oporavak ovarijske funkcije u bolesnica tretiranih ABVD protokolom, analizirano je postoji li značajna razlika između bolesnica tretiranih tim protokolom i onih tretiranih drugim protokolima. Dobiveni podaci su sljedeći: ne postoji značajna razlika između bolesnica tretiranih ABVD protokolom i onih tretiranih CHOP ili CHOEP protokolom ($p=0.238$), značajna razlika pak postoji između bolesnica tretiranih ABVD i eBEACOPP protokolom ($p=0.04$). Kombinaciju ABVD+BEACOPP (2+2 ciklusa) primao je premalen broj bolesnica za adekvatnu analizu.

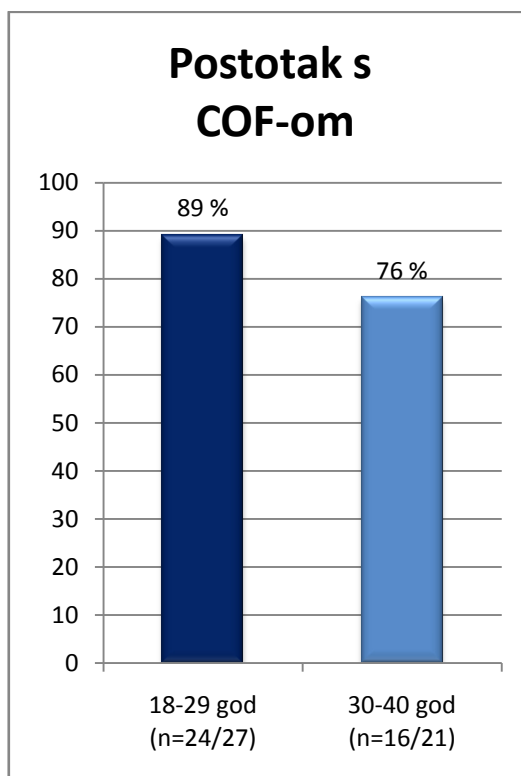


Slika 3. Postotak bolesnica s održanom cikličkom ovarijskom

funkcijom (COF) nakon kemoterapije u ovisnosti o kemoterapijskom protokolu

- **Povezanost dobi i postotka bolesnica s COF-om nakon kemoterapije**

Od 48 bolesnica, 27 ih je imalo između 18 i 29 godina, dok je preostalih 21 imalo između 30 i 40 godina. U starosnoj skupini 18-29 godina, 24 od 27 bolesnica (89%) zadržalo je COF nakon kemoterapije, dok je u skupini 30-40 godina, istu zadržalo 16 od 21 bolesnica (76%). (Slika 2.) Statistička analiza pokazale je kako ova razlika u postotku zadržavanja COF-a nije značajna ($p=0.272$)



Slika 2. Postotak pacijentica s održanom cikličkom

ovarijskom funkcijom (COF) nakon kemoterapije u ovisnosti o dobi

- **Trudnoće**

Dvije bolesnice iz kontrolne grupe su ostale trudne za vrijeme praćenja.

Treba naglasiti kako zbog premalog broja bolesnica koje su primale GnRH agoniste, nije bilo moguće analizirati učinkovitost GnRH agonista u s obzirom na dobnu skupinu odnosno s obzirom na kemoterapijski protokol koji su primale.

6. RASPRAVA

Ovo istraživanje bavilo se problemom očuvanja gonadalne funkcije ukupno 48 premenopauzalnih bolesnica liječenih radi limfoma. Njih 8 primalo je GnRH agoniste, i premda su sve one (100%) nakon kemoterapije ponovno imale uspostavljenu COF, u usporedbi s kontrolom (40 bolesnica, u 80% uspostavljena COF), nije utvrđena značajna razlika po tom pitanju. Medijan vremena praćenja ovih grupa nije bio bitno različit, no analiza je pokazala značajnu razliku u dobi među grupama, s time da je kontrolna grupa starija (medijan; 28 vs 22.5 god).

Osim toga, usporedbom starosnih skupina 18-29 i 30-40 godina, bez obzira na primjenu GnRH agonista, nije dobivena značajna razlika u COF-u nakon terapije. Značajnom se pak pokazala usporedba kemoterapijskih protokola, ponovno bez osvrta na primanje GnRH agonista, pri čemu je analizom dobiveno da terapija po eBEACOPP protokolu, u usporedbi s terapijom po ABVD protokolu, značajno smanjuje šansu za oporavak COF-a.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ne podupiru korištenje GnRH agonista u protekciji ovarijske funkcije, no treba naglasiti neka ograničenja u samom istraživanju. U prvom redu, to je nesrazmjer broja bolesnica u GnRH i kontrolnoj grupi, ali i sam po sebi relativno mali uzorak bolesnica. Osim toga, način na koji je određivan učinak GnRH agonista, je isključivo kroz povratak menstrualnih ciklusa, što je s obzirom na trajanje i retrospektivnu narav istraživanja bilo jedino moguće.

Također treba istaknuti da je pitanje koliko su održani cikličkih ovarijski ciklusi nakon kemoterapije, relevantni kao mjerilo očuvane funkcije jajnika i fertiliteta. Odnosno, cilj korištenja GnRH agonista je jasan, ali unatoč jasno postavljenom cilju, problem se javlja prilikom evaluacije ostvarenja istog. Naime, različita istraživanja koja se bave ovom tematikom, prilikom evaluacije ovarijske funkcije, koriste različite metode. Upravo razlike u metodologiji dovode u pitanje usporedivost rezultata različitih istraživanja.

Generalno gledajući, smatra se da je uspostavljanje redovitih menstrualnih ciklusa nakon kemoterapije znak oporavka ovarijske funkcije. Redovitost menstrualnih ciklusa jednostavno je ustanoviti, te je upravo ta jednostavnost glavna prednost ovakvog definiranja normalne ovarijske funkcije. No jedno istraživanje (35), primjerice, pokazalo je da su u amenoroičnih bolesnica koje su dobivale kemoterapijsko liječenje radi karcinoma dojke, detektirane razine estradiola ekvivalentne onima u premenopauzalnih žena. S druge

strane, redoviti ciklusi nakon kemoterapije ne podrazumijevaju adekvatnu ovarijsku rezervu (3).

U procjeni ovarijske rezerve najčešće je korištenje različitih testova, uključujući mjerenja hormona (razine FSH, AMH, inhibina B), te procjenu broja antralnih folikula transvaginalnim ultrazvukom. Među svim ovim testovima, mjerenje razine AMH trenutno se smatra vjerojatno najrelevantnijim markerom ovarijske rezerve (36). AMH je rezultat proizvodnje malih (do 6 mm) rastućih folikula, s dominantno parakrinim utjecajem na primordijalne folikule, čiji daljnji rast inhibiraju. Takvom negativnom povratnom spregom kontroliran je broj rastućih folikula. Starenjem se razina AMH u žena s redovitim ciklusima postupno smanjuje da bi konačno, u menopauzi, postala nemjerljiva. Iz navedenih razloga, možemo pretpostaviti da bi potencijalnu učinkovitost GnRH agonista mogli istražiti uz pomoć AMH. Značajne razlike u razinama AMH u serumu, između žena koje su za vrijeme kemoterapije primale GnRH agoniste i onih koje nisu, u teoriji bi upućivale na protektivan učinak ovih lijekova, bez obzira na menstrualni status. Povratak cikličke ovarijske funkcije, naime, ne daje nikakve podatke o tome koliko će ona trajati, što je osobit problem u žena izloženih kemoterapiji, u primjerice tridestima, koje žele u budućnosti imati djecu. Mjerenje razine AMH bi u ovom slučaju bilo korisnije.

Jedno od istraživanja (34) je na uzorku od 20 bolesnica ustanovilo kako nema razlike, na temelju hormonskih i ultrazvučnih parametara, između GnRHa i kontrolne grupe. S druge strane, Demeestere i sur. (2) u svom prospektivnom, randomiziranom istraživanju na 84 bolesnice prezentiraju drukčije podatke. Statistički značajna razlika ($p=0,040$), naime, u vrijednostima AMH, registrirana je u korist GnRH grupe u odnosu na kontrolnu. Ono što je još zanimljivo, je kako je postotak bolesnica kojima je dijagnosticiran POF nakon kemoterapije, bio podjednak u obje grupe. Ovaj rezultat ide u prilog upitnoj koristi menstrualnog statusa kao pokazatelja normalne ovarijske funkcije.

Behringer i sur. (32,37) baveći se pitanjem korisnosti GnRH agonista u očuvanju fertiliteta bolesnica oboljelih od Hodgkinovog limfoma, dolaze do možda najvišeznačajnijih rezultata. Njihovo istraživanje iz 2010. god. prekinuto je prijevremeno, jer uspoređujući vrijednosti AMH u bolesnica koje su primale GnRH agoniste u odnosu na one koje su primale oralne kontraceptive, utvrđeno je kako bitne razlike nema. Povrh toga, sve bolesnice su poslije kemoterapije imale izrazito nisku ovarijsku rezervu. Treba naglasiti da su bolesnice uključene u ovo istraživanje imale dijagnozu uznapredovalog Hodgkinovog

limfoma, i eBEACOPP kao prvu liniju kemoterapije. Osim toga, ovi zabrinjavajući podaci bili su praćeni sljedećim podacima o menstrualnom statusu pacijentica nakon kemoterapije: 2 od 10 bolesnica u GnRH grupi bilo je amenoroično, u usporedbi 3 od 9 amenoroičnih bolesnica u grupi koja je primala oralne kontraceptive. Istraživanje Behringera i sur. iz 2012. god. (32) uključivalo je znatno veći broj bolesnica (263) i nešto drukčije terapijske protokole, ali i značajno drukčije rezultate. Ova studija uspoređivala je parametre normalne funkcije jajnika u dvije skupine bolesnica liječenih od Hodgkinovog limfoma (jedna skupina primala je 4 ciklusa terapije po ABVD protokolu, druga 2 ciklusa po ABVD + 2 ciklusa po BEACOPP protokolu). Istraživanje je uspoređivalo menstrualni status i razine AMH u serumu nakon terapije, ali i broj trudnoća, definitivnog pokazatelja očuvane fertilne funkcije. Upravo ovaj sveobuhvatni prospektivni pristup, pokazuje vjerojatno najtemeljitije rezultate, ali je i jasno kako je vremenski vrlo zahtjevan. Istraživanje je pokazalo kako je broj trudnoća u drugoj skupini (2ABVD+ 2BEACOPP) veći, premda su u toj grupi bili lošiji rezultati po pitanju razine AMH. Što je još važnije, multivarijatna analiza pokazala je kao je upravo korištenje GnRH agonista u bilo kojoj od ovih grupa značajno povećala izgleda za trudnoću (OR=12.87). Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako je moguće kako hormonski pokazatelji ovarijske rezerve u ovih bolesnica ne moraju nužno korelirati sa šansama za začeće. No, smanjena ovarijska rezerva ni u kojem slučaju ne znači kako bolesnica ne može spontano ostati trudna. Tako da ovi rezultati ne moraju biti interpretirani kao paradoksalni, već mogu upućivati na važnost toga da bolesnice koje su u opasnosti od smanjene ovarijske rezerve, poput onih koje su bile na kemoterapiji, trebaju razmotriti što skoriju trudnoću.

Jedan od problema analiziranih u ovom istraživanju bila je i povezanost različitih kemoterapijskih protokola s različitim stopom oporavka ovarijske funkcije. Kako je već navedeno, analiza je u ovom istraživanju pokazala kako postoji značajno manja šansa za oporavak ovarijske funkcije u bolesnica liječenih po eBEACOPP protokolu (100% oporavak u ABVD grupi vs 67% oporavak COF-a u eBEACOPP grupi). Prema drugom istraživanju (38) rizik za POF u bolesnica koje primaju terapiju po eBEACOPP protokolu iznosi čak 50%. Zbog premalog broja bolesnica koje su primale GnRH agoniste u ovom istraživanju nije se mogao odrediti potencijalni protektivan učinak GnRH agonista s obzirom na kemoterapijski protokol. Već je spomenuto kako je njemačka grupa istraživača (37), izjavila kako GnRH agonisti u ovih bolesnica ne omogućuju zaštitu ovarijske

funkcije. Ipak, ukupni broj bolesnica u ovom istraživanju iznosio je samo 21, što je u svakom slučaju premalen uzorak. Možemo pretpostaviti kako bi u slučaju ovako agresivnih protokola, istraživanje trebalo uključivati značajno veći broj bolesnica (39), u najboljem slučaju nekoliko stotina, da bi se pokušao ustanoviti stvarni učinak GnRH agonista. Tako i dalje ostaje pitanje da li GnRH agonisti, ukoliko i imaju protektivan učinak, imaju isti bez obzira na to koliko je agresivan protokol kojem se bolesnice izlažu.

Poznato je, naime, kako je najveći rizik od trajne amenoreje u hematoloških bolesnica, povezan s transplantacijom matičnih stanica, odnosno s kemo- i radioterapijskim protokolima koji joj nužno prethode (3). Prema literaturi on iznosi i do 80% (40). Upravo ovom problematikom, i potencijalnom koristi GnRH agonista, bavilo se istraživanje Blumenfelda i sur. (41). Ukupno 83 bolesnice, koje su podvrgnute autotransplantaciji matičnih stanica, promatrane su radi ispitivanja povratka COF-a. Postotak onih kojima se vratila ovarijska funkcija u GnRHa skupini bio je 38,3%, dok je u drugoj skupini on iznosio 11,1%. Statistički se značajnom pokazala razlika u COF- jedino između bolesnica oboljelih od limfoma (66% vs 18% u korist GnRHa skupine), dok u skupini bolesnica oboljelih od leukemije protektivni učinak GnRH agonista nije analizom dobiven. S obzirom na rizik kojem se izlažu mlade bolesnice podvrgnute ovakvom obliku liječenja, što se tiče vlastitog fertiliteta, riječ je definitivno o pitanju koje zaslužuje pažnju liječnika koji se njima bave. Metode očuvanja fertiliteta, u ovom slučaju osobito, mogle bi se kombinirati (primjerice IVF i GnRH agonisti), kako bi im se omogućile što veće šanse za kasniju reprodukciju.

Jedan od potencijalnih čimbenika zabune u ovom istraživanju definitivno je dob bolesnica, s obzirom na to da je pokazana statistički značajna razlika u medijanu godina naših bolesnica. Ipak, postotak COF-a u različitim starosnim skupinama nije se pokazao značajno različitim.

Vezano uz dob pacijentica, postavlja se pitanje da li je potencijalna efikasnost GnRH agonista vezana uz to u kojoj se starosnoj skupini koristi. Samo dvije bolesnice starije od trideset su primale GnRH agoniste u ovm istraživanju, i u obje je nakon terapije došlo do uspostave regularnih ciklusa, ali to je bio premali broj da bi se mogla raditi statistička analiza efikasnosti GnRH agonista u ovisnosti o dobi. U svakom slučaju može se smatrati upitnim da li je liječenje u žena starijih od 30 jednako korisno, s obzirom na to da one

liječenje počinju s manjom ovarijском rezervom u odnosu na one u dvadesetima. To jest, da li bi GnRH agonisti, u slučaju da djeluju protektivno, djelovali jednako protektivno bez obzira na to koje je stanje folikularne rezerve. Ako bi i djelovali jednako, opet je ona smanjena u odnosu na one mlađe. Imalo bi smisla u ovoj skupini bolesnica, osobito ako su liječene agresivnijim protokolom, kombinirati više metoda očuvanja fertiliteta, kako je već prije navedeno. One bi najviše mogle profitirati, od recimo kombinacije IVF- a i GnRH agonista, pod uvjetom da se pokažu djelotvornima (1).

Smatra se (42) kako je premenopausalnim ženama koje su podvrgnute kemoterapijskom liječenju, suđeno da uđu u preuranjenu menopauzu. Ima smisla pitati se koliko žene koje uspostave regularne cikluse nakon kemoterapije, zadržavaju iste, i da li korištenje GnRH agonista može to vrijeme produljiti, a ne samo utjecati na to da dolazi li do ponovne uspostave ciklusa. Nema objavljenih istraživanja koja bi potvrđivala ili negirala ovo, što je u prvom redu vezano uz činjenicu da bi takva istraživanja zahtijevala vrijeme praćenja od nekoliko desetaka godina. Ipak, kada bi se pokazalo da GnRH agonisti odgađaju početak menopauze u žena tretiranih kemoterapijom, to bi bio jasan pokazatelj da čuvaju folikularnu rezervu, te bi uz trudnoću bio najvrjedniji način određivanja efikasnosti ovih lijekova.

Da bi došlo do željenog utjecaja na hipotalamo-hipofizarnu osovinu, GnRH agoniste je nužno početi primjenjivati 7-14 dana prije početka kemoterapije. Naime, ove tvari stimulirajući GnRH receptore, u početku dovode do porasta lučenja gonadotropina iz hipofize, da bi nakon nekoliko dana kontinuirana aktivacija receptora dovela do postupnog smanjenja lučenja istih. Upravo ova činjenica potaknula je razmišljanja o potencijalnoj učinkovitosti GnRH antagonista u ovom pitanju. Naime, blokada GnRH receptora koju bi antagonisti odmah omogućili, eliminirala bi period od 7-14 dana nužan za željeno djelovanje agonista.

Rezultati istraživanja, vezanih uz antagoniste, zasada su provedeni jedino na životinjskim modelima, te su doveli do različitih zaključaka. Jedno od njih (43) ispitalo je da li primjena GnRH antagonista cetoreliksa, prije izlaganja ciklofosfamidu, utječe na broj preživjelih primordijalnih folikula u jajniku miša. Rezultati su u ovom istraživanju išli u prilog cetoreliksa, pokazajući statistički značajnu ($p=0.001$) redukciju broja primordijalnih folikula. Drugo istraživanje pak (44), bavilo se uspoređivanjem djelovanja GnRH agonista (leuprolin) i antagonista (cetoreliks, antid) na folikule jajnika, i to sa i bez

istodobne primjene ciklofosfamida. Pokazali su da GnRH antagonisti, ne samo da ne smanjuju štetno djelovanje ciklofosfamida na broj primordijalnih folikula, već prilikom samostalne aplikacije antagonista, dolazi do smanjenja broja folikula. Pretpostavka je u ovom slučaju da je moguće da je riječ o direktnom utjecaju na folikule.

Novije istraživanje (45) vezano uz ovu temu, provedeno je na skupini od 10 maccaca majmuna. Ispitivan je isključivo efekt GnRH antagonista antida na broj primordijalnih folikula, bez paralelne primjene alkilirajućeg agensa. Šest od 10 majmuna primalo je kroz 14 dana antid, dok su ostala 4 primala vehikl. Tretman antidom rezultirao je 13%-om redukcijom broja primordijalnih folikula, što se pokazalo statistički značajnim ($p=0.048$) u odnosu na kontrolu u kojoj nije bilo promjene. Treba naglasiti da je kod 3 od 6 majmuna koja su primala antid, primijećena značajna redukcija broja primordijalnih folikula, dok kod ostala 3 to nije bio slučaj. Ovi podaci upućuju na to da kod primata nije primijećen tako značajan reducirajući učinak na broj primordijalnih folikula kao kod miševa. Ipak, s obzirom na to da ipak dovode do redukcije broja primordijalnih folikula primata, čak i kod samostalne upotrebe, vrlo je upitna njihova potencijalna korist u očuvanju funkcije jajnika kod žena.

Treba također naglasiti ulogu drugih metoda očuvanja fertiliteta. Najnovije smjernice Američkog društva za kliničku onkologiju (*engl.* American Society of Clinical Oncology, ASCO) iz 2013. godine (46), vezane uz očuvanje fertiliteta u bolesnika oboljelih od raka, ističu nekoliko stvari. U prvom redu, treba istaknuti kako je ovo područje interesa ne samo onkologa, već svih zdravstvenih djelatnika koji se bave ovim bolesnicima. Zatim, svi bolesnici reproduktivne dobi imaju pravo biti upućeni u potencijalne metode očuvanja fertiliteta, s time da ih treba izravno pitati o tom pitanju, i informirati ih o rizicima koje nosi liječenje kemoterapijom. Bolesnici često neće sami prvi postaviti pitanja, bilo zbog neznanja o rizicima, bilo zbog preplavljenosti samom činjenicom da boluju od karcinoma. Zato je uloga zdravstvenih djelatnika tu ključna.

Trenutne smjernice jasno ističu kako je krioprezervacija embrija zlatni standard u ovom pitanju. Krioprezervacija oocita, odnedavno ne više eksperimentalna, također je opcija, osobito za žene bez trenutnog partnera. Ostale metode, uključujući i korištenje GnRH agonista, predmet ovog istraživanja, smatraju se nedovoljno istraženima, i zato im je djelotvornost još uvijek upitna. Tako se GnRH agonisti ne preporučaju kao metoda

očuvanja fertiliteta, ali ističe se njihova potencijalna korist u smanjenju vaginalnog krvarenja u pacijentica koje imaju trombocitopeniju induciranu kemoterapijom. No ističu se i potencijalne nuspojave ove metode, vezane uz njezin mehanizam djelovanja. Među njima se ističu smanjenje koštane gustoće, te prolazni naleti vrućine, poput onih u menopauzi.

Već je spomenuta moguća korist od potencijalnog kombiniranja metoda očuvanja fertiliteta. Ona doduše nije spomenuta u prethodno navedenim smjernicama, već je navedena u nedavno objavljenom sistematskom pregledu literature (1). Autori rada navode kako je pristup bolesnicama koje žele očuvati fertilitet značajno ovisan o njihovoj dobi i kemoterapijskom protokolu koji dobivaju. Tako bi primjerice, 40- godišnja bolesnica koja se podvrgava agresivnim kemo- i radioterapijskim protokolima, prije recimo transplantacije koštane srži, mogla dobiti na raspolaganje sve metode očuvanja fertiliteta koje se nude. Dok se recimo bolesnica u dvadesetima koja se tretira ABVD protokolom, može odlučiti samo za krioprezervaciju embrija i GnRH agoniste. U svakom bi slučaju, korištenje više metoda, moglo značajno povećati šanse bolesnicama da kasnije zatrudne, premda je očito kako su cijena i kompleksnost takvog liječenja značajno veći, pa bi u budućnosti korist od njega trebala biti jasno definirana.

Nuspojave liječenja GnRH agonistima, već spomenuto smanjenje koštane gustoće i naleti vrućine, rezultat su hipoestrogenog stanja do kojeg ovi lijekovi dovode. Jedno od malobrojnih istraživanja koje je uzelo u obzir te nuspojave je ono Castela-Branca i sur. (47). Istraživanje je uključivalo 56 premenopauzalnih žena liječenih radi Hodgkinovog limfoma. Trideset bolesnica dobivalo je GnRH agonist za vrijeme kemoterapije, ali su uz njega dobivale i tibolon. Uloga tibolona odgovara u ovom slučaju onoj hormonske nadomjesne terapije, s obzirom na to da je riječ o sintetskom steroidu, koji u prvom redu djeluje kao agonist estrogenskih receptora, uz mješoviti učinak na progesteronske i androgenske receptore. Koštana mineralna gustoća (*engl.* Bone mineral density, BMD) određivana je prije početka kemoterapije, te po završetku terapije. Usporedba GnRHa i kontrolne grupe nije pokazala značajne razlika u BMD-u, dok su razlike u razinama gonadotropina i estradiola u serumu nakon kemoterapije bili značajne. S obzirom na to, autori preporučaju korištenje, bilo tibolona, bilo hormonske nadomjesne terapije, kao dodatka GnRH agonistima sa svrhom smanjenja nuspojava. Treba naglasiti da u ovom istraživanju nije određivan AMH, koji se danas smatra relevantnijim u određivanju ovarijske rezerve u odnosu na FSH (36).

7. ZAKLJUČCI

Jedna od značajnijih dugoročnih posljedica kemoterapijskog liječenja u mladih žena je gubitak fertiliteta i razvoj prijevremenog gubitka funkcije jajnika.

Trenutne strategije za očuvanje jajnika i/ili fertiliteta uključuju krioprezervaciju embrija, oocita, te tkiva jajnika, zatim transpoziciju jajnika, i konačno, korištenje GnRH agonista prije i za vrijeme kemoterapije.

Dok su krioprezervacija embrija i oocita klinički utemeljene metode, korištenje GnRH agonista, predmet ovog istraživanja, još uvijek je upitne efikasnosti i predmet brojnih istraživanja. Rezultati dobiveni analizom pacijentica u ovom istraživanju ne upućuju na korist GnRH agonista u održanju COF-a nakon završetka kemoterapijskog liječenja, uz naglasak na maleni uzorak bolesnica koji je analiziran.

Što se tiče fertiliteta, najbolji način za procjenu efikasnosti GnRH agonista, zasigurno je broj trudnoća bolesnica nakon terapije. Zato bi buduća istraživanja trebala, ne samo uključivati znatno veći broj bolesnica koje primaju GnRH agoniste, već bi i vrijeme praćenja nakon kemoterapije trebalo biti značajno duže, kako bi se dobili vjerodostojniji podaci.

Zahvaljujem se u prvom redu svojoj mentorici doc.dr.sc Nadiri Duraković na pristupačnosti i suradljivosti kojima mi je olakšala pisanje ovog rada. Posebno hvala dragoj prijateljici i kolegici mag. math. Maji Ciguli bez čijeg stručnog znanja o statistici ovog rada ne bi bilo.

Hvala svim mojim prijateljima na tome što su sve učinili jednostavnijim, a osobito hvala Antoneli bez koje mi studentski život ne bi bio ono što je bio. Na kraju, najviše hvala mojoj obitelji, a posebno mojoj majci, koje je bila i uvijek će ostati moja najveća potpora i inspiracija.

LITERATURA

1. Blumenfeld Z, Evron A. Preserving fertility when choosing chemotherapy regimens- the role of gonadotropin-releasing hormone agonists. *Expert Opin Pharmacol.* 2015;16:1009-20
2. Demeestere I, Brice P, Peccatori FA, Kentos A, Gaillard I, Zachee i sur. Gonadotropin-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy induced ovarian failure in patients with lymphoma; 1-year follow-up of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol.* 2012; 31: 903-09
3. Del Mastro L, Giraudi S, Levaggi A, Ponzato P. Medical approaches to preservation of fertility in female cancer patients. *Expert Opin Pharmacol.* 2011;12(3):387-396
4. Colleoni M, Bonetti M, Coates AS, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Price K i sur. Early start of adjuvant chemotherapy may improve outcome for premenopausal breast cancer patients with tumors not expressing estrogen receptors. *J Clin Oncol.* 2000;18:584-90
5. De Vos M, Smits J, Woodruff TK. Fertility preservation in woman with cancer. *Lancet.* 2014;384:1302-10
6. Waimey KE, Duncan FE, Su HI, Smith K, Wallach H, Jona K i sur. Future directions in oncofertility and fertility preservation: a report from the 2011 oncofertility consortium conference. *J Adolesc Young Adult Oncon.* 2013; 2:25-30
7. Revelli A, Porcu E, Levi Setti PE, Delle Piane L, Merlo DF, Anserini P. Is letrozole needed for controlled ovarian stimulation in patients with estrogen- receptor positive breast cancer? *Gynecol Endocrinol.* 2013; 29:993-6
8. Nayak SR, Wakim AN. Random start gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist-treated cycles with GnRH agonist trigger for fertility preservation. *Fertil Steril.* 2011; 96:51-4
9. Cardozo ER, Thomson AP, Karmon AE, Dickinson KA, Wright DL, Sabatini ME. Ovarian stimulation and in-vitro fertilization outcomes of cancer patients undergoing fertility preservation compared to age matched controls: a 17-year experience. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(4):587-96
10. Linkeviciute A, Boniolo G, Chiavari L, Peccatori FA. Fertility preservation in cancer patients: the global framework. *Cancer Treat Rev.* 2014;40:1019-27
11. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet.* 2004; 364:1405-10
12. Rosendahl M, Andersen MT, Ralfkiaer E, Kjeldsen L, Andersen MK, Andersen CY. Evidence of residual disease in cryopreserved ovarian cortex from female patients with leukemia. *Fertil Steril.* 2010;94:2186-90
13. Kyono K, Doshida M, Toya M, Sota Y, Akahira J, Sasano H. Potential indications for ovarian autotransplantation based on the analysis of 5571 autopsy findings of females under age of 40 in Japan. *Fertil Steril.* 2010;93:2429-30

14. Dursun P, Dogan NU, Ayhan A. Oncofertility for gynecologic and non-gynecologic cancers: fertility sparing in young women in reproductive age. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014; 92:258-67
15. Blumenfeld Z. Debate: How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist in addition to cryopreservation of embryos, oocytes and ovaries. *Oncologist*. 2007;12:1044-54
16. Glode LM, Robinson J, Gould SF. Protection from cyclophosphamide-induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone. *Lancet*. 1981;1:1132-34
17. Ataya K, Rao LV, Lawrence E i sur. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide- induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biol Reprod*. 1995;52:365-72
18. Lobo RA. Potential options for preservation of fertility in women. *N Eng J Med*. 2005;353:64-73
19. Ortin TT, Shostak CA, Donaldson SS. Gonadal status and reproductive function following treatment for Hodgkin's disease in childhood: The Stanford experience. *Int J Radiol Oncol Bio Phys*. 1990;19:873-880
20. Patsoula E, Loutradis D, Drakkis P, Michalas L, Bletsas R, Michalas S. Messenger RNA expression for the follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor in human oocytes and preimplantation stage embryos. *Fertil Steril*. 2003;79:1187-93
21. Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of the follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:3748-51
22. Knight PG, Glister C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006;132:191-206
23. Saitta A, Altavilla D, Cucinotta D, Morabito N, Frisina N, Corrado F i sur. Randomized, double-blind placebo-controlled study on effect of raloxifene and hormone replacement therapy on plasma NO concentrations, endothelin-1 levels and endothelium-dependent vasodilatation in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1512-19
24. Kitajima Y, Endo T, Nagasawa K, Manase K, Honnma H, Baba T i sur. Hyperstimulation and gonadotropin -releasing hormone agonist modulate ovarian vascular permeability by altering expression of the tight junction protein claudin-5. *Endocrinology*. 2006;147:694-699
25. Harrison GS, Wierman ME, Nett TM, Glode LM. Gonadotropine- releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocr Relat Cancer*. 2004;147:694-699
26. Grundker C, Emons G. Role of gonadotropine-releasing hormone (GnRH) in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:65-71
27. Leung PC, Cheng CK, Zhu XM. Multi- factorial role of GnRH-1 and GnRH-2 receptors in the human ovary. *Moll Cell Endocrinol*. 2003;202:145-153

28. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuse B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S i sur. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*. 1996;381:800-803
29. Spiegel S, Cuivillier O, Edsal LC, Kohama T, Menzeleev R, Olivera A. Sphingosine-1-phosphate in cell growth and death. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;845:11-18
30. Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranada SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A i sur. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med*. 2000;6:1109-1114
31. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004;428:145-150
32. Behringer K, Thielen I, Mueller H, Goergen H, Eibl AD, Rosenbrock J i sur. Fertility and gonadal function in female survivors after treatment of early unfavorable Hodgkin lymphoma (HL) within the German hodgkin study Group HD14 trial. *Ann Oncol*. 2012;23:1818-25
33. Waxman JH, Ahmed R, Smith D, Wrigley PF, Gregory W, Shalet S i sur. Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1987;19:159-162
34. Nitzschke M, Raddatz J, Bohlmann MK et al. GnRH analogs do not protect ovaries from chemotherapy-induced ultrastructural injury in Hodgkin's lymphoma patients. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;282: 83-88
35. Braverman AS, Sawhney H, Tendler A, Patel N, Rao S, El- Tamer M i sur. Pre-menopausal serum estradiol (E2) levels may persist after chemotherapy (CT-) induced amenorrhea in breast cancer (BC). *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2006;3:69-612
36. Themmen APN. Anti- Mullerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as ovarian reserve marker. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2005;34:18-21
37. Behringer K, Wildt L, Mueller H, Mattle V, Ganitis P, van den Honard B i sur. German Hodgkin Study Group. No protection of the ovarian follicle pool with the use of GnRH-analogues or oral contraceptives in young women treated with escalated BEACOPP for advance-stage Hodgkin lymphoma. Final results of a phase II trial from the German Hodgkin Study Group. *Ann Oncol*. 2010;21:2052-2060
38. Behringer K, Breuer K, Reineke T, May M, Nogova L, Klimm B i sur. Secondary amenorrhea after Hodgkin's lymphoma is influenced by age of treatment, stage of disease, chemotherapy regimen, and the use of oral contraceptives, during therapy: a report from the German Hodgkin' Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 2005;23:7555-7564
39. Blumenfeld Z, Katz G, Evron A. 'An ounce of prevention is worth a pound of cure':the case for and against GnRH-agonist for fertility preservation. *Ann Oncol*. 2014;25(9):1719-2810.
40. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K i sur. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006;18:2917-31

41. Blumenfeld Z, Patel B, Leiba R, Zuckerman T. Gonadotropin-releasing hormone agonist may minimize premature ovarian failure in young women undergoing autologous stem cell transplantation. *Fertil Steril*. 2012;98:1266-70
42. Partridge A, Gelber S, Gelber RD, Castiglione Gertsch M, Goldhirsch A, Winer E. Age of menopause among women who remain premenopausal following treatment for early breast cancer: long-term results from International Breast Cancer Study Group Trials V and VI. *Eur J Cancer*. 2007;43:1646-1653
43. Meirow D, Assad G, Dor J, Rabinovici J. The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice. *Hum Reprod*. 2004;19:1294-9
44. Danforth DR, Arbogast LK, Friedman CI. Acute depletion of murine primordial follicle reserve by gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertil Steril*. 2005;3:1333-1338
45. Attaman J, Arbogast LK, Friedman CI, Danforth DR. Effect of gonadotropin-releasing hormone antagonist on primordial follicle survival in the primate ovary. *J Reprod Med*. 2014;59:103-9
46. Loren AW, Mangu PB, Nohr Beck L, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2013;31:2500-2510
47. Castelo-Branco C, Nomdedeu B, Camus A, Mercadal S, Martinez de Osaba MJ, Balash J. Use of gonadotropin-releasing hormone agonists in patients with Hodgkin's disease for preservation of ovarian function and reduction of gonadotoxicity related to chemotherapy. *Fertil Steril*. 2007;87:703-6

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28. Lipnja 1991. u Kutini.

U Kutini sam 2006. godine završila osnovnoškolsko obrazovanje u OŠ Mate Lovraka, te također srednjoškolsko, 2010. godine u Srednjoj školi Tina Ujevića, smjer prirodoslovno matematička gimnazija.

Medicinski fakultet u Zagrebu, koji trenutno pohađam, upisala sam 2010. godine. U razdoblju od 2011- 2013 bila sam aktivni demonstrator pri Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta, a akad. god. 2014/15 demonstraturu sam obavljala u sklopu predmeta Klinička propedeutika.

Aktivno se koristim engleskim jezikom , te osnovama francuskog jezika.