Onkofertilitetni postupci

Pongrac, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:105:404893

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Pongrac

Onkofertilitetni postupci

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Pongrac

Onkofertilitetni postupci

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb pod vodstvom prof.dr.sc. Marine Šprem Goldštajn i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

POPIS SKRAĆENICA

AMH – anti-Müllerov hormon

CAF – ciklofosfamid, doksorubicin i fluorouracil

CAG - citarabin, aklarubicin hidroklorid i faktor stimulacije rasta granulocita

CEF - ciklofosfamid, epirubicin i 5-fluorouracil

CMF - ciklofosfamid, metotreksat i 5-fluorouracil

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

FSH – folikulostimulirajući hormon

GnRH – gonadotropin-releasing hormone, gonadotropin-oslobođajući hormon

hCG – eng. human chorionic gonadotropin, humani korionski gonadotropin

IVF – *in vitro* fertilizacija

IVM – *in vitro* maturacija

LH – luteinizirajući hormon

PCR – eng. polymerase chain reaction, lančana reakcija polimeraze

RNK – ribonukleinska kiselina

SADRŽAJ

POPIS SKRAĆENICA ii
SAŽETAK iv
SUMMARY v
1. Uvod 1
2. Gonadotoksičnost 3
2.1. Radioterapija 3
2.2. Kemoterapija 4
3. Proces krioprezervacije 6
4. Onkofertilitetni postupci 7
4.1. Krioprezervacija embrija i oocita 7
4.1.1. Kontrolirana stimulacija jajnika 7
4.1.2. Krioprezervacija embrija 12
4.1.3. Krioprezervacija oocita 13
4.2. Krioprezervacija tkiva jajnika 14
4.2.1. Indikacije 15
4.2.2. Postupak za krioprezervaciju tkiva jajnika 15
4.2.3. Ortotopična autotransplantacija 15
4.2.4. Heterotopična autotransplantacija 16
4.2.5. Transplantacija cijelog jajnika 17
4.2.6. Razlozi propadanja folikula 18
4.2.7. Prednosti 19
4.2.8. Nedostaci 20
4.2.9. Arteficijalni jajnik 22
4.2.10. Kriteriji za krioprezervaciju tkiva jajnika 22
4.3. GnRH Agonisti 23
4.4. Transpozicija jajnika 25
4.5. Krioprezervacija sjemena 27
5. Zaključak 28
6. Zahvale 29
7. Literatura 30
8. Životopis 40

SAŽETAK

Naslov rada: Onkofertilitetni postupci

Autor: Ana Pongrac

Maligne bolesti su drugi po učestalosti uzrok smrti u razvijenim zemljama. Zahvaljujući napretku medicine, preživljenje pacijenata je poraslo u usporedbi s prijašnjim godinama te se javila potreba za poboljšanjem dugoročne skrbi ovih pacijenata. Iz tog razloga razvija se nova disciplina medicine, onkofertilitetna medicina koja omogućuje očuvanje fertiliteta pacijentima oboljelim od malignih bolesti. Kemoterapija i/ili radioterapija dovode do smanjenja ovarijske rezerve u žena te u muškaraca smanjuju kvalitetu sjemena.

Postoji nekoliko načina očuvanja fertiliteta u žena. To su krioprezervacija embrija i oocita, krioprezervacija tkiva jajnika, primjena agonista gonadotropin-oslobađajućeg hormona i transpozicija jajnika. Pri odabiru metode očuvanja fertiliteta veoma je bitan individualni pristup. Koja će se metoda odabrati ovisi o dobi žene, o protokolu terapije i vremenu preostalom do početka terapije maligne bolesti te o postojanju partnera u vrijeme provođenja postupka očuvanja fertiliteta. Krioprezervacija embrija i oocita standarne su metode kojima je zajednički korak provođenje procesa stimulacije jajnika. Razvijeni su različiti protokoli stimulacije s ciljem povećanja sigurnosti njihovog provođenja. Krioprezervacija tkiva jajnika je eksperimentalna metoda koja je jedina opcija za očuvanje fertiliteta u djevojčica prije puberteta. Kontinuirana primjena agonista gonadotropin-oslobađajućeg hormona preporučuje se kod premenopauzalnih žena s tumorom dojke. Za zaštitu fertiliteta kod primjene radioterapije koristi se transpozicija jajnika.

Standardna metoda očuvanja fertiliteta kod dječaka nakon puberteta i odraslih muškaraca je krioprezervacija sjemena. Primjena hormonske terapije, odnosno agonista gonadotropin-oslobađajućeg hormona nije efikasna metoda. Prepubertetalnim dječacima može biti preporučena krioprezervacija tkiva tetisa, ali je važno napomenuti da je to još uvijek eksperimentalna metoda.

Ključne riječi: onkofertilitetni postupci, gonadotoksičnost, kemoterapija, radioterapija, krioprezervacija, transpozicija jajnika, fertilitet.

SUMMARY

Title: Oncofertility procedures

Author: Ana Pongrac

Malignant diseases are the second most common cause of death in developed countries. Thanks to the advancement of medicine, patient survival has increased over the years and subsequently the need to improve the long-term care of these patients has emerged. As a result, a new area of medicine, named oncofertility, has started to develop. It enables the preservation of fertility in patients with malignant diseases. Chemotherapy and / or radiotherapy lead to decreased ovarian reserve in women and reduced quality of semen in men.

There are several ways to preserve fertility in women. Currently used are cryopreservation of embryos and oocytes, cryopreservation of ovarian tissue, application of gonadotrophin-releasing hormone agonists and ovarian transposition. When choosing fertility methods, it is very important to have an individual approach. The chosen method depends on the age of the woman, therapy protocol and time remaining until the start of therapy and the existence of a partner at the time of the fertility preservation process. Cryopreservation of embryos and oocytes are standard methods and have a common step of ovarian stimulation. Various stimulation protocols have been developed to increase the safety of their implementation. The cryopreservation of ovarian tissue is an experimental method that is the only option to preserve fertility in girls before puberty. Continuous administration of gonadotrophin-releasing hormone agonists is recommended in premenopausal women with breast cancer. Ovarian transposition is used to protect fertility when using radiotherapy.

The standard method of preserving fertility in boys after puberty and in adult men is cryopreservation of semen. The use of hormone therapy or gonadotropin-releasing hormone agonists is not an effective method. Testicular tissue cryopreservation may be recommended to prepubescent boys, but it is important to note that this is still an experimental method.

Keywords: oncofertility procedures, gonadotoxicity, chemotherapy, radiotherapy, cryopreservation, ovarian transposition, fertility.

1. Uvod

Onkofertilitetna medicina je nova grana medicine, kojoj je zadaća razvijanje sigurnih i učinkovitih metoda očuvanja fertiliteta u žena oboljelih od malignih bolesti, a kod kojih terapija ima gonadotoksični učinak. Sam naziv prvi put je upotrijebila Teresa K. Woodruff i od tada se onkofertilitet razvija kao nova disciplina u okviru ginekologije i porodništva. Potreba za ulaganjem u ovu granu medicine uvidjela se nakon sve veće incidencije malignih bolesti u djece i mladih odraslih. Zahvaljujući sve boljim mogućnostima liječenja malignih bolesti povećava se i preživljenje pacijenata. Ipak, ta agresivna terapija dovodi do smanjenja reprodukcijske sposobnosti mladih. (1)

Maligne bolesti čine veliki javnozdravstveni problem u svijetu te su drugi po učestalosti uzrok smrti u razvijenim zemljama. (2)

Prema procjenama GLOBOCAN-a u svijetu je 2012. dijagnosticirano oko 14.1 miljuna novih slučajeva raka. Procijenjeno je da je u pitanju 6.6 milijuna žena. Godišnja stopa incidencije raka u svijetu u djece je između 50 do 200 na milijun, a kod adolescenata 90 do 300 na milijun. (3) Najčešće maligne bolesti u djece su leukemija, tumori središnjeg živčanog sustava, Wilmsov tumor i non-Hodgkinov limfom. U žena reproduktivne dobi najveća je incidencija tumora dojke. Uz njega dolazi do povećanog obolijevanja od raka vrata maternice, melanoma, leukemije, non-Hodgkinovog limfoma, štitnjače te jajnika. Najčešća sijela tumora razlikuju se ovisno o dobi pacijentice (Tablica 1). (4)

Tablica 1. Najčešća sijela malignih bolesti u žena ovisno o dobi (modificirano iz ref. 4)

Dob	Najčešća sijela
0-14	Mozak, bubreg, leukemija, non-Hodgkinov limfom
15-39	Mozak, dojka, vrat maternice, leukemija, melanom, non-Hodgkinov limfom, jajnici, štitnjača
40-44	Dojka, vrat maternice
45-49	Dojka, tijelo maternice, vrat maternice, kolorektum
50-54	Dojka, tijelo maternice, vrat maternice, kolorektum
55-59	Dojka, vrat maternice, kolorektum, pluća
60-64	Dojka, kolorektum, pluća, tijelo i vrat maternice
65-69	Dojka, kolorektum, pluća
70-74	Dojka, kolorektum, pluća, želudac
75+	Dojka, kolorektum, pluća

U Hrvatskoj u 2014. godini dijagnosticirano je 21 414 novih slučajeva karcinoma, a od toga je 10 045 bilo u žena. Stopa incidencije je iznosila 452.8/100 000 za žene. U 2013. ta je stopa iznosila 440.3/100 000, a u 2012. 425.7/100 000. (5-7)

U oko 10% žena maligna bolest dijagnosticira se u reproduktivnom razdoblju. Zahvaljujući sve boljim dijagnostičkim metodama i poboljšanim terapijskim postupcima, 80-90% žena preživljava malignu bolest. (8)

Još jedan trend koji ukazuje na važnost onkofertilitetnih postupaka je rađanje u kasnijoj životnoj dobi. U Hrvatskoj nalazimo trend smanjenja rađanja među mlađim dobnim skupinama i porasta rađanja iznad 35 godine, što je u skladu s trendovima u drugim razvijenim zemljama. U 2015. Godini zabilježeno je 41.3 poroda na 1000 žena u dobi od 35-39 godina, što je porast u odnosu na 2014. godinu kad je taj broj bio 40.9 poroda na 1000 žena. Kod žena u dobi od 20-24 godine došlo je do pada broja poroda sa 46.8/1000 u 2014. na 43.3/1000 u 2015. (9)

Uzimajući u obzir da se incidencija malignih bolesti povećava starenjem, sve kasnije roditeljstvo dovodi do povećanog rizika obolijevanja prije trudnoće. (10)

Ovaj rad prikazuje postojeće onkofertilitetne postupke u djevojčica i žena te kratki osvrt na krioprezervaciju sjemena.

2. Gonadotoksičnost

Pokazalo se da kemoterapija i radioterapija imaju negativne učinke na spolne organe žena što uz neplodnost može dovesti i do potpune disfunkcije jajnika, koja se definira kao nemogućnost početka ili završetka puberteta, ili nastup menopauze prije 40. godine. (11)

2.1. Radioterapija

Ionizirajuće zračenje svojim djelovanjem u folikulima jajnika dovodi do izravnog oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (DNK). To dovodi do atrofije folikula i smanjenja folikularne rezerve jajnika. (12) U trenutku rođenja, jajnici sadrže konačan broj folikula, koji iznosi oko 2 milijuna. Starenjem se taj broj smanjuje sve do menopauze. Različiti stadiji razvoja folikula imaju različitu otpornost na zračenje, ali se generalno smatra da su zreliji folikuli manje otporni od primordijalnih. (13) Ljudska oocita se smatra izrazito osjetljivom na radioterapiju. (12) Ovarijska rezerva ovisi o dobi pa stoga starije žene imaju veći rizik gubitka funkcije jajnika nakon radioterapije. (14) Kod djevojčica od 12 godina doza od 18,3 Gy uzrokuje prerani gubitak funkcije jajnika, dok je kod žena od 28 godina 14 Gy dovoljna doza za isti učinak. (15) Osim dobi, drugi precipitirajući čimbenici su doza, ozračeno područje i shema radioterapijskog frakcioniranja. (16) Procijenjeno je da je doza od 2 Gy dovoljna za uništenje 50% ovarijske rezerve. (11) Zračenje abdomena dovodi do disfunkcije jajnika u čak 97% slučajeva. (17) Kod zračenja cijelog tijela, kod 90% pacijentica došlo je do zatajenja funkcije jajnika. (18)

Kod zračenja glave može doći do poremećaja izlučivanja hormona iz hipotalamusa i hipofize. (19). S obzirom na važnost hipotalamusa i hipofize, dolazi do poremećaja funkcije jajnika tijekom razdoblja nakon radioterapije. (20) Žene u dobi od 15 do 44 godine kojima je ozračeno područje hipotalamusa i hipofize s dozom od 30 Gy i više tijekom djetinjstva ili adolescencije, imaju manju šansu za trudnoću. (21) Samo oštećenje ne mora biti očito odmah, već može napredovati kroz neko vrijeme. (20) U istraživanju Paija i sur., u 61% pacijentica javila se endokrinopatija uzrokovana radioterapijom. Incidencija endokrinopatije se povećavala u razdoblju između 5. i 10. godine nakon terapije, pa su tako incidencije hiperprolaktinemije bile 72% nakon 5 godina i 87% nakon 10 godina.(22)

Prema Critchleyu i sur. oštećenja maternice kod žena koje su primile zračenje u djetinjstvu mogu se svesti na skraćenje maternice, odsutan odgovor endometrija na stimulaciju hormonima i oštećenja uterine arterije. (23) Nastanak fibroze maternice i gubitak elastičnog tkiva maternice nakon radioterapije abdomena, povezuje se s povećanom incidencijom spontanih pobačaja u drugom trimestru trudnoće. Posljedice ovih promjena su i češći prijevremeni porodi i rođenja djece niske porođajne težine. (17)

2.2. Kemoterapija

Kemoterapija oštećuje jajnike na tri načina. Možemo razlikovati direktno oštećenje jajnika, oštećenje jajnika kao posljedicu oštećenja krvnih žila i oštećenja na razini stanica (oksidativni stres). (24)

Direktno oštećenje jajnika uključuje apoptozu primordijalnih folikula, ali i sazrelih folikula što dovodi do brzog i privremenog gubitka menstruacije. Kemoterapija dovodi i do smanjenja broja oocita. Nedavno je Meirow predložio teoriju po kojoj se zbog uništenja rastućih folikula gube parakrini faktori rasta, poput anti-Müllerovog hormona (AMH), koji služe inhibiciji novačenja primordijalnih folikula. Rezultat toga je povećano novačanje neaktivnih folikula koji potom pojačano propadaju dovodeći do smanjenja rezerve jajnika u žena. Ovaj fenomen se naziva „burnout“ fenomen. (24)

Ben-Aharon i sur. su pratili 20 žena tijekom i nakon kemoterapije s naglaskom na vaskularna oštećenja. Primijetili su da kod žena starijih od 35 godina, nakon inicijalnog akutnog infarkta, dolazi do ubrzanog starenja žila jajnika. To upućuje da je i oštećenje krvnih žila jedan od bitnih mehanizama oštećenja jajnika kod kemoterapije (25, 26)

Endogeni slobodni kisikovi radikali su se pokazali kao bitni čimbenici u apoptozi antralnih folikula kao reakcija na toksine i ionizirajuće zračenje. To znači da su i oni bitan čimbenik u smanjenju plodnosti kod žena koje su primale kemoterapiju. (27)

Gubitak funkcije jajnika se može javiti i nekoliko godina nakon završetka terapije maligne bolesti. (28) Normalizacija menstrualnog ciklusa nakon terapije ne osigurava normalnu reproduktivnu sposobnost. Bitno je imati da umu da pacijentice nakon gonadotoksične terapije imaju skraćeno vrijeme do nastupa menopauze. (29)

Kao i kod radioterapije, ostatna funkcija jajnika ovisi o dobi pacijentice koja prima kemoterapiju. Kod žena od 20 godina trebalo je oko 20400 mg ciklofosfamida za pojavu amenoreje, kod žena od 30 godina 9300 mg, a kod žena od 40 godina tek 5200 mg ciklofosfamida. (30)

Skupine kemoterapeutika se međusobno razlikuju po načinu djelovanja, a posljedično tome i štetnim učincima na jajnike (Tablica 2). (31)

Oštećenje funkcije spolnih žlijezda ponajprije uzrokuje alkilirajući spojevi, među koje spada i ciklofosfamid. (2)

Tablica 2. Gonadotoksičnost kemoterapeutika (modificirano iz ref. 31)

Rizik za gonadotoksičnost	Kemoterapeutici
Visok	Ciklofosfamidi, ifosfamid, busulfan, porkarbazin, klorambucil, melfalan
Srednji	Niske kumulativne doze cisplatina, karboplatina i adriamicina
Nizak	Bleomicin, aktinomicin, vinkristin, metotreksat, 5-FU
Nesiguran	Taksani i monokolonalna protutijela

Ciklofosfamid se veže za gvanin u DNK stanica i sprječava pravilnu replikaciju stanica. Kako se stanice raka dijele brže nego uobičajene stanice, češće podliježu oštećenju. No zbog njihove nespecifičnosti, alkilirajući agenti zahvaćaju i normalne stanice koje se češće dijele što uključuje i stanice jajnika. Smatra se da ciklofosfamid može utjecati i na oocite i primordijalne folikule. (32) Ciklofosfamid se često daje u sklopu protokola koji uključuje kombinaciju ciklofosfamida, metotreksata i 5-fluorouracila (CMF) te u kombinaciji ciklofosfamida, epirubicina i 5-fluorouracila (CEF). CMF i CEF protokola. Kod CMF protokola amenoreja se javlja u 21-71% žena mlađih od 44 godina, te u 100% žena starijih od 40 godina. (33) Kod CEF protokola brojevi su bili veoma slični. (34) Alkilirajuće tvari se često koriste u liječenju djece oboljele od sarkoma, leukemija i limfoma. (1)

Druga važna skupina kemoterapetuika su antraciklini i njihov najvažniji predstavnik doksorubicin. Ova skupina lijekova djeluje na više načina – inhibira topoizomerazu II, potiče oksidativni stres, inhibira sintezu DNK i ribonukleinske kiseline (RNK), i sprječava sustave za popravak DNK. Doksorubicin djeluje i na jezgru i na mitohondrije. Neke studije su pokazale i da smanjuje ovarijsku opskrbu krvi već nekoliko minuta nakon primjene. (35)

Važno je razlikovati različite protokole koji se koriste u liječenju malignih bolesti. Ovisno o njihovom učinku na razvoj neplodnosti, koja se procjenjuje amenorejom, dijele se na protokole niskog, srednjeg i visokog rizika. Protokoli visokog rizika u više od 80% žena uzrokuju amenoreju nakon terapije. Amenoreja se javlja u 30-70% žena nakon primjene protokola srednjeg rizika, te u manje od 20% kod primjene protokola niskog rizika. Neki primjeri protokola visokog rizika su ciklofosfamid 5g/m^2 u žena starijih od 40 godina, primjena CMF, CEF, ili kombinacija ciklofosfamida, doksorubicina i fluorouracila (CAF) u 6 ciklusa kod žena starijih od 40 godina, te protokoli koji sadrže prokarbazin. Primjer protokola srednjeg rizika je primjena CMF, CEF, ili kombinacija citarabina, aklarubicin hidroklorida i faktora stimulacije rasta granulocita (CAG) u 6 ciklusa kod žena u dobi od 30-39 godina. Ukoliko je žena mlađa od 30 godina, a prima neke od gore navedenih protokola, spada u skupinu niskog rizika. (28)

3. Proces krioprezervacije

Krioprezervacija je proces zamrzavanja spolnih stanica, embrija i tkiva čime se omogućuje održavanje njihove vitalnosti tijekom duljeg vremenskog razdoblja. Prvi korak je hlađenje od temperature 37°C do vrlo niskih temperatura od -196°C. Nakon nekog vremenskog razdoblja slijedi odmrzavanje ponovno na temperaturu od 37°C. Najveća prepreka ovog postupka je uspješno odstranjivanje vode iz stanica bez uzrokovanja njezine smrti. Voda smrzavanjem povećava svoj volumen te može dovesti do prsnuća stanične membrane te oštećenja organela unutar stanice. Zbog toga je prije smrzavanja stanica potrebno vodu zamijeniti krioprotektorom. Postoje permeabilni i nepermeabilni krioprotektori. Permeabilni krioprotektor ulazi u stanice te štiti stanične organele od destrukcije pri zamrzavanju. Za razliku od njega, nepermeabilni ostaje izvan stanice te istisne vodu iz nje procesom osmoze. Time se sprječava formacija kristala leda.

Dvije su metode pomoću kojih se izvodi krioprezervacija. To su „slow freezing“ i vitrifikacija. „Slow freezing“ je starija metoda kod koje se temperatura spušta polagano, za 0,3°C po minuti do željene temperature od -32°C. Nakon toga, uzorak se premješta u tekući dušik na temperaturu od -196°C. Kod vitrifikacije se temperatura spušta naglo, a najbitnija razlika prema metodi polaganog zamrzavanja je u izbjegavanju stvaranja kristala leda. Za vitrifikaciju se koriste permeabilni krioprotektori većih koncentracija koji mogu biti potencijalno toksični za stanice. Za prevenciju stvaranja kristala leda bitno je brzo zamrzavanje. (1)

4. Onkofertilitetni postupci

4.1. Krioprezervacija embrija i oocita

4.1.1. Kontrolirana stimulacija jajnika

Krioprezervacija embrija i oocita su metode očuvanja fertiliteta koje se smatraju standardnim opcijama za pacijentice nakon puberteta, a kojima prijeti gubitak funkcije jajnika zbog gonadotoksične terapije. (36) Zajednički korak u obje metode je potreba za kontroliranom stimulacijom jajnika.

Prije samog početka kontrolirane stimulacije jajnika veoma je važno napraviti detaljan pregled pacijentica. Uz utvrđivanje tipa tumora te njegovog stadija, od velike je značajnosti znati vrijeme koje je preostalo do početka terapije maligne bolesti. Također, da bi se za pacijenticu moglo utvrditi da je dobar kandidat za ovu metodu procjenjuje se njezina ovarijska rezerva. Ona se najčešće utvrđuje brojem antralnih folikula, razinom AMH i folikulostimulirajućeg hormona (FSH). (37) Smatra se da su razine AMH i broj antralnih folikula markeri koji mogu najtočnije predvidjeti uspjeh *in vitro* fertilizacije (IVF). Daje se prednost AMH-u jer se njegove razine ne mijenjaju tijekom ciklusa pa može poslužiti kao marker u bilo koje vrijeme. (38)

Kontrolirana stimulacija jajnika je metoda u kojoj se primjenom egzogenih hormona želi postići sinkronizirani rast i razvoj većeg broja folikula. Time se omogućuje i veći broj oslobođenih zrelih oocita po jednom ciklusu. (39)

U procesu kontrolirane stimulacije jajnika koriste se gonadotropini, agonisti i antagonisti gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH, prema eng. *gonadotropin releasing hormone*). Za konačnu indukciju ovulacije najčešće se koristi humani korionski gonadotropin (hCG, prema eng. *human chorionic gonadotropin*). Endogeni gonadotropini nastaju u stanicama hipofize, a njihova osnovna funkcija je poticanje razvoja folikula. Također, potrebni su za sintezu hormona u jajnicima. (39) Egzogeno primijenjenim gonadotropinima pokušava se oponašati normalan menstrualni ciklus i potaknuti folikule na rast i razvoj. Tijekom njihove primjene povećan je rizik za pojavom preranog pika luteinizirajućeg hormona (LH) koji bi inducirao ovulaciju. Zbog toga je važna primjena agonista ili antagonista GnRH. Djelovanjem egzogeno primijenjenih agonista u kontinuiranoj dozi dolazi do inhibicije djelovanja endogenih GnRH zbog smanjenja broja njihovih receptora. Antagonisti GnRH imaju nekoliko prednosti pred agonistima. Oni imaju direktan antagonistički učinak na receptore hipofize te dovode do bržeg pada koncetracije gonadotropina. Zato je vrijeme njihove primjene kraće. Također, manja je pojava sindroma hiperstimulacije, opasne ijatrogene komplikacije procesa stimulacije jajnika. Na kraju ovog postupka, kada se dosegne željena zrelost folikula, intramuskularno se injicira hCG. On je odgovoran za završetak maturacije folikula te ovulaciju. (40)

Kod neplodnosti se najčešće primjenjuje standardni protokol stimulacije jajnika. On podrazumijeva primjenu egzogenog FSH u ranoj folikularnoj fazi, nakon spontane menstruacije. Egzogeni gonadotropini počinju se primjenjivati 2. ili 3. dan ciklusa te se kontinuirano koriste kroz 9-14 dana. Kao što je već spomenuto, prerano oslobađanje oocite sprječava se prethodnom primjenom GnRH agonista u lutealnoj fazi prethodnog ciklusa u trajanju od 2 tjedna, a koja dovodi do supresije jajnika. Osim GnRH agonista, u prevenciji prerane ovulacije koriste se i GnRH antagonisti koji se ne moraju koristiti prije primjene gonadotropina jer se njihovom primjenom odmah smanjuje oslobađanje FSH i LH iz hipofize. GnRH antagonisti se daju kad je promjer vodećeg folikula 12-14 mm što se najčešće događa šestog dana stimulacije. Korištenjem GnRH antagonista skraćuje se vrijeme procesa stimulacije jajnika na 14 dana što je velika prednost prema GnRH agonistima. (41) Nakon što vodeći folikul dosegne promjer 17-18 mm primjenjuje se hCG. Aspiracija oocita radi se 34 do 36 sati od vremena primjene hCG-a. (42)

Osim standardnog protokola postoji i random-start protokol. On je pogodniji za pacijentice koje nisu u ranoj folikularnoj fazi ciklusa. Za razliku od standardnog ovaj se protokol započinje u kasnoj folikularnoj ili lutealnoj fazi ciklusa. Time se omogućuje početak terapije maligne bolesti u razmaku od 2 ili 3 tjedna od početka stimulacije što je prednost u odnosu na standardni protokol. (43) Mnogostruki valovi razvoja folikula tijekom menstrualnog ciklusa čine temelj ovog protokola. (41) Baerwald i sur. pratili su jajnike 50 žena transvaginalnim ultrazvukom tijekom jednog interovulatornog stadija. Prilikom toga tražili su promjene u promjeru folikula te broju folikula koji su jednaki ili veći od 5 mm. Došli su do zaključka da se tijekom menstrualnog ciklusa pojavljuju veliki i mali valovi folikularnog razvoja. Dominantni folikul izabire se iz velikog vala. (44) Žene tijekom menstrualnog ciklusa imaju dva ili tri vala folikulogeneze. Dakle, jedan menstrualni ciklus ne rezultira samo razvojem jedne kohorte antralnih folikula kao što su bila prijašnja mišljenja. (45)

Postoje dvije mogućnosti početka kontrolirane stimulacije jajnika gonadotropinima kod pacijentica u kasnoj folikularnoj ili lutelnoj fazi. Prva mogućnost je početak stimulacije nakon spontanog LH pika. Druga mogućnost je nakon ovulacije potaknute primjenom GnRH agonista ili hCG-a. Kod random-start protokola GnRH antagonisti, slično kao i u standardnom protokolu, počinju se koristiti u kasnijoj fazi ciklusa, odnosno nakon što je promjer kohorte folikula veći od 12 mm. Zadaća GnRH antagonista je prevencija sekundarnog LH pika, a njihova primjena se nastavlja do indukcije ovulacije GnRH agonistima ili hCG-om. Jedina iznimka je njegova primjena u kasnoj folikularnoj fazi ukoliko promjer kohorte folikula dosegne 12 mm prije spontanog LH pika. U tom slučaju, primjena GnRH antagonista kreće odmah te se nastavlja do indukcije ovulacije. (43)

Von Wolff i sur. radili su prospektivnu studiju u koju su uključili 40 pacijentica s malignim bolestima. Bile su podijeljene u dvije skupine. Prvu skupinu činile su pacijentice koje su primile stimulaciju gonadotropinima u ranoj folikularnoj fazi, a u drugoj skupini stimulacija je počela u lutealnoj fazi. Važnost ovog istraživanja je u dokazivanju da se broj oocita dobivenih random-start protokolom ne razlikuje statistički značajno od standardnog protokola. Također, početak stimulacije nije utjecao na kvalitetu oocita. Ovaj protokol omogućuje dobivanje dovoljnog broja kvalitetnih oocita, a za razliku od standardnog protokola aspiracija oocita moguća je unutar 2 tjedna od početka stimulacije. (46) Normalan razvoj folikula, dovoljan broj i dobra kvaliteta aspiriranih oocita te uspješna *in vitro* fertilizacija moguća je primjenom random-start protokola. To ukazuje da razine progesterona u lutealnoj fazi te prisustvo žutog tijela nemaju negativnih učinaka na razvoj oocita tijekom ove metode stimulacije. (43)

Još jedna opcija stimulacije jajnika prije terapije maligne bolesti je uzastopna stimulacija. Žene s tumorom dojke obično imaju 6 do 8 tjedana između kirurškog zahvata i kemoterapije. Veoma je važno upoznati žene s mogućnostima očuvanja fertiliteta da bi se što prije krenulo u taj postupak. Ukoliko vrijeme to dozvoljava može se učiniti uzastopna stimulacija jajnika. Ovom metodom broj aspiriranih oocita te broj smrznutih embrija je statistički značajno povećan, nego li u protokolu s jednim ciklusom stimulacije. (47) Uz to je važno naglasiti da ne dolazi do značajnog pomaka početka terapije maligne bolesti te nije povećana incidencija sindroma hiperstimulacije jajnika. (48)

U onkologiji se kao posebna skupina tumora navode tumori osjetljivi na djelovanje hormona. Najčešći tumor te skupine koji se javlja u žena je tumor dojke. Postotak tumora dojke koji su osjetljivi na hormone je do 60%. Određivanje estrogenskih i progesteronskih receptora čini obavezni dio postupka obrade tih pacijentica. Vezanje hormona na te receptore pospješuje proliferaciju stanica tumora. (2)

Stimulacijom jajnika dolazi do rasta i razvoja većeg broja folikula. To dovodi do povećane proliferacije granuloza-stanica te njihove sve veće brojnosti. (1) Granuloza-stanice sadrže enzim aromatazu, a na svojoj membrani receptore za FSH. Vezanjem FSH aktivira se enzim aromataza te se time androstendion pretvara u estradiol. (39) U normalnom menstrualnom ciklusu vršna koncentracija estradiola je 300 pg/ml dok u stimuliranom ciklusu ta vrijednost doseže i 3000 pg/ml. (1) Stoga, postoji zabrinutost da bi stimulacijom ovulacije došlo do poticanja daljnjeg rast tumora te povećanja smrtnosti. (1) Opcije očuvanja fertiliteta u ovih pacijentica su IVF nakon prirodnog ciklusa, primjena tamoksifena te primjena inhibitora aromataze. Prednost treba dati kontoliranoj stimulaciji jajnika. IVF nakon prirodnog ciklusa producira samo jednu oocitu i embrio, a uz to veoma često dolazi do potpunog neuspjeha

metode. (49) Razvojem novih protokola koji smanjuju koncentraciju estradiola omogućuje se stimulacija jajnika te mogućnost očuvanja fertiliteta i u ovoj skupini pacijentica.

Aromataza je enzim, citokrom P450, koji sudjeluje u pretvorbi testosterona i androstendiona u estron i estradiol. Kodira ga gen CYP19 koji je jako zastupljen u granuloza-stanicama. Njegova aktivnost ovisi o promjenama u koncentraciji gonadotropina. Osim u tkivu jajnika, pretvorba androgena u estogene događa se i u masnom tkivu i u tkivu dojke gdje se aromataza, također, nalazi u povišenim koncentracijama. (49) Inhibitori aromataze se vežu kompetativno za vezno mjesto androstediona na aromatazi. (2) Posljedično, primjenom inhibitora aromataze dolazi do pada koncentracije estrogena. Prekida se inhibitorno djelovanje estrogena na hipotalamus i hipofizu te razine gonadotropina počnu rasti. (49)

Inhibitori aromataze mogu se koristiti za proces stimulacije jajnika. Povećavaju broj uspješnih ovulacija jer potiču rast folikula i induciraju ovulacije u žena s anovulatornim ciklusima sa sindromom policističnih jajnika. (50)

Važnost dodatka letrozola, kao inhibitora aromataze, u ovoj skupini pacijentica je u nižim razinama koncentracije estradiola prema standardnom protokolu. Također, nema naglog porasta njegove koncentracije prije ovulacije. Pri tome, ne dolazi do smanjenja broja oslobođenih oocita i uspješnih stopa njihove fertilizacije. (51) Oprez kod primjene letrozola ipak je potreban kod mlađih pacijentica sa sindromom policističnih jajnika jer postoji veća opasnost viših koncentracija estradiola. (42) Oktay i sur. svojim su istraživanjem ukazali da se za isti broj oocita smanjila primijenjena doza gonadotropina za 44%. (51) Međutim, ovi rezultati nisu potvrđeni istraživanjem Johnsona i sur. koji su koristili veće doze gonadotropina u pacijentica koje su primale letrozol. To se može objasniti oslabljenim odgovorom jajnika na stimulaciju kod pacijentica s tumorima osjetljivim na estrogen. (52) Postojanje BRCA-1 mutacije, također, se može povezati sa smanjenim odgovorom jajnika na stimulaciju kod ove skupine pacijentica. Smatra se da te pacijentice i prije kemoterapije i/ili radioterapije imaju okultni gubitak funkcije jajnika. (53)

Za indukciju ovulacije, kao i u ostalim protokolima, koriste se GnRH agonisti i hCG. Oktay i sur. u svom su istraživanju uspoređivali učinke GnRH agonista i hCG-a kao okidača ovulacije u pacijentica koje primaju i aromatazni inhibitor. Njihovi rezultati pokazuju smanjeni porast koncentracije estradiola u skupini pacijentica koje su primile GnRH agoniste što dovodi do manje opasnosti za stimulacijom estrogenskih receptora tumora. Osim te prednosti, broj zrelih oocita te uspjeh njihove fertilizacije bio je bolji primjenom GnRH agonista. (54) Dakle, indukcija ovulacije agonistima GnRH receptora, usporediva je s uspjehom hCG-a. Iako je ukupni broj aspiriranih oocita neovisan o izboru okidača ovulacije, primjenom GnRH agonista pospješuje

se razvoj oocita te je rezultat toga povećani broj zrelih oocita te veći broj krioprezerviranih embrija u pacijentica s tumorom dojke. (55)

Zabrinutost zbog povećanog rizika za relapsom bolesti zbog kontrolirane stimulacije jajnika, protokolom koji uključuje FSH i letrozol, vjerojatno nije opravdana. Istraživanjem kratkoročnih učinaka, unutar dvije godine, nije došlo do povećanja broja ponovno oboljelih prema pacijenticama koje nisu bile uključene u postupak stimulacije jajnika. (56) Također, i nakon dužeg vremenskog razdoblja od pet i pol godina nije došlo do povećane incidencije relapsa bolesti. Smatra se da je primjena letrozola u protokolima stimulacije jajnika sigurna za primjenu kod pacijentica s tumorima dojke te im omogućuje očuvanje fertiliteta. (57)

Tamoksifen je lijek koji se također može uvesti u protokol stimulacije jajnika kod žena s estrogen-pozitivnim tumorima. Prvi je otkriveni selektivni modulator estrogenskih receptora, a djeluje kao njihov kompetitivni parcijalni agonist. (40) Prvi puta je upotrjebljen kod stimulacije ovulacije u žena s anovulatornim ciklusima uz slične rezultate kao klomifen. (49) Natječe se za vezno mjesto na estrogenskim receptorima zajedno s estradiolom. Svojim vezanjem onemogućuje vezanje estradiola, a on sam nema učinak. Osim svog antagonističkog djelovanja, tamoksifen ima i agonističko djelovanje na neke organe kao što su kosti i maternica. (2)

Kod pacijentica s tumorom dojke, za stimulaciju ovulacije može se koristiti tamoksifen tijekom prirodnog ciklusa za IVF. Stimulacija tamoksifenom dovodi do boljih rezultata što podrazumijeva veći broj zrelih oocita i embrija naprema ciklusima bez primjene tamoksifena. (58) Još su bolji rezultati primijećeni kod kombinacije tamoksifena s FSH u kontroliranoj stimulaciji jajnika. Uspoređujući učinke letrozola i tamoksifena, veća koncetracija estradiola je kod metode stimulacije s tamoksifenom što ukazuje na moguću veću sigurnost primjene letrozola. (42) Ipak, primjena tamoksifena smatra se sigurnom u pacijentica s tumorima osjetljivim na estrogen unatoč višim koncentracijama estradiola. Ta sigurnost proizlazi iz činjenice antagonističkog djelovanja tamoksifena na receptore prisutne na stanicama tkiva dojke te time inhibicije učinka estradiola na rast tumora. (49)

Rezultati više istraživanja doveli su do različitih zaključaka uspješnosti kontrolirane stimulacije jajnika u pacijentica s malignim bolestima. Robertson i sur. u svom su istraživanju u obje grupe pacijentica, s i bez maligne bolesti, koristili iste doze gonadotropina bez razlika u odgovoru jajnika na stimulaciju. Broj aspiriranih oocita te embrija bio je podjednak u obje skupine. (59) Razliku u dozi gonadotropina, broju dana potrebnih za stimulaciju i broju aspiriranih oocita nisu pronašli ni Almong i sur. u svom istraživanju. Zaključak i ovog istraživanja bio je da prisutnost maligne bolesti ne utječe na odgovor jajnika na kontroliranu stimulaciju. (60) Uspjeh krioprezervacije embrija s kasnijim transferom usporediv je s ženama koje nemaju malignu

bolest. Također, uspjeh trudnoća te broj živorođene djece ne bi se trebao razlikovati u ove dvije skupine pacijentica. (61) Međutim, istraživanje Dominga i sur. pokazalo je drugačije rezultate. Broj oocita kod pacijentica s malignom bolešću bio je manji što je posljedica slabije aktivacije jajnika na stimulaciju. Postoji mogućnost da maligna bolest i prije kemoterapije i/ili radioterapije dovodi do smanjenja ovarijske rezerve. (62) Uz to, u pacijentica s malignom bolešću broj nezrelih oocita dobivenih aspiracijom je veći. To može biti rezultat pokušaja liječnika da aspiriraju što više oocita, uključujući i malene folikule. (52)

Tijekom procesa stimulacije ovulacije gonadotropinima može doći do sindroma hiperstimulacije jajnika. Sindrom hiperstimulacije dijeli se na blagi, srednje teški te teški, ovisno o veličini jajnika izmjerenoj transvaginalnim ultrazvukom te težini simptoma. Pod blagim sindromom podrazumijeva se veličina jajnika do 5x5 cm uz blagu do srednju nelagodu abdomena. Veličina jajnika 12x12 cm uz srednju do jaku nelagodu abdomena spada u srednje teški sindrom hiperstimulacije. Najteži stupanj ove komplikacije se opisuje povećanjem jajnika više od 12x12 cm uz pojavu ascitesa. Kod nekih pacijentica dolazi i do hidrotoraksa, poremećaja elektrolita te hemokoncentracije. (54) Svaka komplikacija vezana uz očuvanje fertiliteta dovodi do odgode terapije maligne bolesti. Također, može rezultirati neuspjehom ciklusa stimulacije bez aspiriranih oocita. Pošto pacijentice prije početka kemoterapije i/ili radioterapije najčešće nemaju više prilika za protokole stimulacije, treba smanjiti rizik pojave ove komplikacije. Smanjena incidencija ovog opasnog sindroma uočila se prilikom primjene GnRH agonista kao okidača ovulacije u usporedbi s hCG-om. (55) Moguće objašnjenje zaštitne funkcije GnRH agonista je uzrokovanje LH pika koji ima kraći poluživot što rezultira bržim uništenjem žutog tijela. Zbog toga, dolazi do oslobađanja nižih razina vazoaktivnih peptida koji čine značajan dio patofiziološkog lanca nastanka sindroma hiperstimulacije. (63) Ipak, primjena GnRH agonista može rezultirati neuspjelom indukcijom ovulacije. (43) Očekivani rizik je između 1.4 i 3,5%. (64) To se može spriječiti većim dozama GnRH agonista ili se njima može dodati hCG. (43)

4.1.2. Krioprezervacija embrija

Krioprezervacija embrija je najduže korištena metoda očuvanja fertiliteta. Prva trudnoća nakon transfera embrija, koji je bio krioprezerviran, datira u 1983. godinu. Ipak, trudnoća nije bila uspješna te je nakon 24 tjedna završila mrtvorođenčem. (65) Prva uspješna trudnoća je rezultirala rođenjem blizanaca nakon krioprezervacije embrija godinu dana kasnije, 1984. godine. (66) Kod krioprezervacije embrija stopa živorođene djece na jedan transfer je 30-40% u SAD-u. To je nešto niža stopa nego nakon krioprezervacije oocita. (67) Iako se smatra standardnom metodom, ima svojih ograničenja. To je potreba za muškim partnerom ili

donorom sperme za IVF, te vrijeme potrebno za njezino provođenje što u nekih pacijentica nije moguće zbog potreba terapije maligne bolesti. (68)

Metode krioprezervacije embrija su „slow freezing“ i vitrifikacija koja u posljednje vrijeme pokazuje bolje rezultate od sporog smrzavanja. Nakon otapanja embrija, oni smrznuti vitrifikacijom imaju bolje preživljenje nego li oni metodom sporog smrzavanja. Također, vitrifikacija ima pozitivan učinak na uspješnost implantacije, odnosno postotak trudnoća po transferu embrija viši je nakon vitrifikacije. (69)

Tijekom razdoblja praćenja (od 15 godina) kod 5 pacijentica nakon izlječenja bolesti embriji su preneseni u maternicu. Transferi su rezultirali s dvije uspješne trudnoće, odnosno stopa živorođene djece bila je 22%. (70) Usporedbom pacijentica kod kojih je napravljen transfer prethodno smrznutih embrija i kontrola kojima je transfer napravljen odmah nakon IVF-a nema razlike u stopama trudnoće po transferu. Tako je stopa trudnoće po transferu u skupini pacijentica s smrznutim embrijima 37% naprema 43% kod kontrolne skupine. Također, postoci živorođene djece po transferu su bez velikih odstupanja, kod metode krioprezervacije to je 30%, a kod kontrolne skupine 32%. (61) Uspjeh krioprezervacije embrija možemo vidjeti i kroz istraživanje Dolmansa i sur. Kod devet žena obavljen je transfer embrija pri čemu je došlo do 6 uspješnih implantacija, ali su dvije završile spontanim pobačajem. Prema tome, postotak živorođene djece po pacijentici je bio 44% što se ne razlikuje značajno prema općoj populaciji. Ovi rezultati pokazuju da dugoročna krioprezervacija nema negativnih učinaka na kasnije rezultate te je sigurna metoda za očuvanje fertiliteta. (71)

4.1.3. Krioprezervacija oocita

Američko društvo za reproduktivnu medicinu, 2012. godine, donijelo je odluku da se krioprezervacija oocita smatra standardnom metodom očuvanja fertiliteta, odnosno da se više ne smatra eksperimentalnom. (72) Do 2012. godine pomoću krioprezervacije oocita rođeno je preko 1000 djece. Ova se metoda svojim konstantnim napretkom i uspješnim rezultatima čini pogodnim izborom kao metoda očuvanja fertiliteta. (73)

Kod početka postupka krioprezervacije oocita nije potreban muški partner, odnosno donor sperme što je velika prednost u odnosu na krioprezervaciju embrija. Time se osigurava veća autonomija žene te se mogu izbjeći problemi vezani uz etička, moralna i zakonska pitanja, kao što učiniti u slučaju rastave partnera s oplođenim smrznutim embrijima. (68)

Oocite se mogu zamrznuti metodom vitrifikacije ili 'slow freezing'. Rezultati pokazuju da se primjenom vitrifikacije povećava šansa preživljenja oocita te da su bolji rezultati fertilizacije. (74) Mnoge klinike širom svijeta uvele su vitrifikaciju kao metodu izbora za smrzavanje oocita. (75) Još jedna pozitivna strana ove metode je što ne dovodi do povećanog rizika za razvojem

aneuploidija u embrija. (76) Zbog dobrih kliničkih ishoda, vitrifikacija se danas smatra metodom izbora kod krioprezervacije oocita. (75)

Kod metode krioprezervacije oocita poseban je problem njihova osjetljivost na postupak smrzavanja što se pripisuje njihovoj velikoj veličini. Osim toga, oocita je stanica bogata vodom. Smanjeno preživljenje oocite tijekom smrzavanja objašnjava se unutarstaničnom kristalizacijom, promjenama u zoni pellucidi te u mejotičkom diobenom vretenu. (1) Unatoč mogućim oštećenjima, prema istraživanju Rienzi i sur. uspjeh fertilizacije i razvoja embrija bio je bez značajnih razlika između skupine pacijentica sa smrznutim oocitama i skupine pacijentica kod kojih je fertilizacija oocita bila odmah nakon aspiracije. (77) Nisu primijećene velike razlike ni u broju uspješnih trudnoća koje su rezultirale rođenjem živog djeteta. Po jednom transferu embrija bilo je 45,8% živorođenih. (78) Pozitivni rezultati primijećeni su i kod pacijentica koje su odabrale metodu krioprezervacije oocita za očuvanje fertiliteta prije gonadotoksične terapije. Martinez i sur. prikazom serije slučajeva prikazuju uspjeh ove metode. Nakon učinjena 11 embrio transfera došlo je do 4 uspješne trudnoće koje su rezultirale živom djecom u terminu i s težinom normalnom za gestacijsku dob. Također, tijekom trudnoće kod ove četiri pacijentice nije došlo do nikakvih komplikacija. (79)

Smatra se da se promjene u mejotičkom diobenom vretenu vjerojatno ispoljavaju samo kod stanica koje se dijele. Tada djelovanjem fenomena 'sve ili ništa' dolazi do propadanja nenormalnih stanica. Zbog toga nema razvoja embrija koji nisu kvalitetni, odnosno onih koji imaju moguću aneuploidiju, do stadija blastociste čime se može objasniti manji broj blastocista kod ove metode. Unatoč tome, broj uspješnih implantacija i broj živorođene djece usporediv je s rezultatima blastocista koje su dobivene nakon fertilizacije svježih oocita. Ne dolazi do povećanog rizika za pojavom anomalija nakon dugoročne krioprezervacije oocita (srednja duljina razdoblja krioprezervacije je bila 3,5godina). (80) Dakle, u djece rođene nakon smrzavanja i otapanja oocita nema povećanja abnormalnosti kromosoma ili poremećaja razvoja u usporedbi s djecom rođenom nakon fertilizacije svježih oocita. (67) Primijećeno je da 1,3% djece rođene nakon oocitne krioprezervacije ima kongenitalne anomalije od ukupno 936 žive djece rođene ovom metodom. To je u skladu s postocima anomalija nakon spontanih trudnoća u populaciji što potvrđuje sigurnost metode smrzavanja oocita. (81)

4.2. Krioprezervacija tkiva jajnika

Krioprezervacija i transplantacija tkiva jajnika eksperimentalna je metoda očuvanja fertiliteta koja se može izvoditi samo u posebnim centrima sa stručnjacima iz tog područja. (36) Važna značajka ove metode je očuvanje i endokrine funkcije jajnika nakon krioprezervacije i

transplantacije. Stoga, uspješno izvođenje ove metode dovodi do velikog poboljšanja kvalitete života u pacijentica. (82)

4.2.1. Indikacije

Postoji nekoliko indikacija za primjenu krioprezervacije tkiva jajnika. Preporučuje se kod pacijentica koje moraju hitno započeti s gonadotoksičnom terapijom svoje maligne bolesti te stoga nisu pogodne za stimulaciju jajnika. (83) Kako kod ove metode nije potrebna stimulacija jajnika, te pacijentice ne moraju biti spolno zrele, ova metoda očuvanja fertiliteta se može koristiti kod djevojčica kod kojih još nije započeo pubertetalni razvoj. To je vjerojatno jedina opcija u ženske djece za očuvanje fertiliteta. (36) Pacijenticama s tumorima osjetljivim na estrogen, zbog mogućih opasnosti stimulacije jajnika, također se može preporučiti ova metoda očuvanja fertiliteta. (84) Osim kod malignih bolesti, može se koristiti i kod pacijentica s benignim hematološkim bolestima, a kojima je potrebna autologna transplantacija koštane srži. (85) Koristi se i u benignim stanjima s velikim rizikom za pojavom prijevremenog gubitka funkcije jajnika kao što su benigna cista jajnika, endometrioza, Turnerov sindrom, pozitivna anamneza pojave rane menopauze. (86) Ova metoda koristila se čak i u pacijentice s recidivirajućim torzijama jajnika što ukazuje da se indikacije za ovu metodu očuvanja fertiliteta proširuju kroz vrijeme. (87)

4.2.2. Postupak za krioprezervaciju tkiva jajnika

Jajnik se sastoji od kore i srži. U kori jajnika smješteni su folikuli s oocitama, dok se u srži jajnika nalazi gusta mreža krvnih žila. (88)

Primordijalni folikulu rezistentniji su na ozljede nastale postupkom krioprezervacije u odnosu na zrele oocite. Karakterizirani su malom veličinom, sporim metabolizmom te ne postojanjem zone pellucide što ih vjerojatno čini izdržljivijima. (89)

Prije započinjanja terapije maligne bolesti potrebno je kirurški odstraniti tkivo jajnika, što se najčešće čini laparoskopski, ali moguće je učiniti i mini-laparotomiju. Tkivo jajnika može se uzeti usporedno s postupkom transpozicije jajnika ukoliko je transpozicija indicirana. Uzimaju se rezovi debljine 0,3-2 mm koji se potom zamrzavaju. (84) Za zamrzavanje tkiva jajnika na raspolaganju su „slow freezing“ i vitrifikacija kao i kod dvije prethodno opisane metode očuvanja fertiliteta. (90)

4.2.3. Ortotopična autotransplantacija

Dvije su mogućnosti autotransplantacije tkiva jajnika nakon izliječenja bolesti, ortotopična i heterotopična.

Kod ortotopične autotransplantacije tkivo jajnika smješta se u područje peritonealne šupljine. Pri tome se tkivo jajnika može transplantirati na srž jajnika, ovarijsku fosu ili široki ligament maternice. (91) Ukoliko se komadići tkiva jajnika odluče transplantirati na postojeći jajnik, prvo se mora odstraniti korteks kako bi se omogućio pristup srži jajnika. Ona sadrži krvne žile potrebne za reimplantaciju i normalan razvoj autotransplantiranih komadića tkiva jajnika. (92) Perfuzija unutar jajnika može biti adekvatna za preživljenje tkiva jajnika i u slučajevima kada je postojeći jajnik atrofičan kao rezultat terapije maligne bolesti. (93) Vraćanjem tkiva jajnika u njegov prirodan položaj i okolinu povećava se šansa za povratkom njegove normalne endokrinološke i reproduktivne funkcije te normalnog razvoja primordijalnih folikula u korteksu. (84) Ukoliko nakon ortotopične autotransplantacije primordijalni folikuli nastave svoj razvoj, postoji mogućnost trudnoće prirodnim putem, odnosno bez korištenja IVF-a. Preduvjet za spontanu trudnoću su neoštećeni jajovodi. Potrebno je pričekati između 4,5 i 5 mjeseci nakon autotransplantacije do prvog vidljivog folikula. (94) Duljina ovog razdoblja objašnjava se normalnim razvojem primordijalnih folikula do stadija antralnih folikula čiji razvoj na kraju rezultira ovulacijom. (95)

Pacijentica, kojoj je učinjena obostrana salpingo-ooforektomija, bila je prvi primjer uspješne ortotopične autotransplantacije nakon krioprezervacije tkiva jajnika 2000. godine. Primjenom egzogenog gonadotropina potaknula se folikulogeneza te ovulacija, ali nije uslijedila trudnoća. (96) Prvi primjer uspješne trudnoće nakon ortotopične autotransplantacije bio je 2004. godine kod pacijentice izliječene od Hodgkinovog limfoma stadija 4. 11 mjeseci nakon autotransplantacije potvrđena je trudnoća koja je rezultirala rođenjem živog djeteta. (97)

Ova je metoda rezultirala rođenjem 42 djece bez povećane incidencije spontanih pobačaja ili kongenitalnih malformacija prema općoj populaciji. (90) Ipak, tek 2015. godine Demeestere i sur. prikazuju klinički slučaj rođenja živog djeteta nakon krioprezervacije tkiva jajnika u djetinjstvu, kod djevojčice prije nastupa menarhe. (98)

4.2.4. Heterotopična autotransplantacija

Heterotopična autotransplantacija podrazumijeva reimplantaciju tkiva jajnika u područja izvan zdjelične šupljine. Tkivo jajnika može se transplantirati u potkožno tkivo podlaktice te trbušni zid. (73) Kirurški je manje zahtjevna metoda te se indicira ukoliko ortotopična autotransplantacije nije moguća. Nakon radioterapije zdjelične šupljine postoji mogućnost nastanka postoperativnih priraslica te se u tom slučaju preporučuje autotransplantacija tkiva jajnika na heterotopično mjesto. (99) Olakšan je i postupak uklanjanja ili zamjene tkiva presatka ukoliko je to kasnije potrebno. (100) Stoga, kada se očekuje brzi gubitak funkcije presatka, a time se javi i potreba za ponavljajućim presađivanjem tkiva, bolja opcija je transpantacija na heterotopično mjesto. (101) Nedostatak heterotopične autotransplantacije je

nemogućnost spontane trudnoće te je za nju potreban IVF. (102) Smještaj presatka bliže površini tijela omogućuje lakše praćenje razvoja folikula ultrazvukom. Tijekom procesa razvoja folikula dolazi do povećanja volumena presatka što se ponekad može vidjeti na samoj površini tijela. Postupak aspiracije oocita prije IVF-a time je olakšan. (100)

Prepreka kod ove metode je pitanje primjerenog mjesta za transplantaciju presatka. Veoma je važno da to mjesto bude dobro vaskularizirano čime se skraćuje interval hipoperfuzije tkiva koja dovodi do njegovog propadanja. Osim vaskularizacije, za preživljenje presatka bitan je i okoliš u koji je premješten. Razlike u temperaturi, tlaku, citokinima, faktorima angiogeneze, hormonalnom okruženju u odnosu na njegov prirodni položaj u tijelu mogu dovesti do prekida njegovog razvoja. (101)

Stern i sur. prikazom kliničkog slučaja potvrđuju mogućnost trudnoće nakon heterotopične autotransplantacije. To je prva takva dokumentirana trudnoća. Pacijentici je tkivo jajnika transplantirano na područje prednjeg trbušnog zida. Blizanačka trudnoća, metodom IVF-a, bila je uspješna nakon drugog postupka autotransplantacije tkiva jajnika. Ovaj slučaj potvrđuje korisnost ove metode u očuvanju fertiliteta te daje mogućnost povratka funkcije jajnika ukoliko ortotopična autotransplantacija nije moguća za izvođenje. (103)

Do povratka endokrine funkcije tkiva jajnika dolazi i nakon heterotopične autotransplantacije. U svojem istraživanju Kim je pratio razvoj endokrine funkcije u pet žena nakon heterotopične autotransplantacije. Prije same transplantacije razine hormona bile su postmenopauzalnih razina te su se pacijentice žalile na simptome menopauze, ponajviše na valove vrućine. Vraćanje endokrine funkcije primijećeno je nakon 12-20 mjeseci nakon transplantacije praćenjem razine estradiola i FSH-a, a održala se sljedećih 3-6 mjeseci. Nakon druge transplantacije došlo je do bržeg vraćanja endokrine funkcije, a uz to je produženo i njezino trajanje. Istraživanje ukazuje na uspješnost heterotopične transplantacije u očuvanju i vraćanju endokrine funkcije jajnika. Trajanje endokrine funkcije bilo je različito kod pacijentica u ovisnosti o broju folikula koji su se nalazili u presađenom tkivu jajnika. (104)

4.2.5. Transplantacija cijelog jajnika

Zbog osjetljivosti tkiva jajnika na ishemiju pokušali su se pronaći i drugi načini transplantacije čime bi se omogućila brza reperfuzija presatka. Kao jedno od rješenja ponudila se metoda autotransplantacije cijelog jajnika. (105) Uz to, ova metoda se preporučuje pacijenticama s velikim rizikom potpunog gubitka funkcije nakon agresivne terapije maligne bolesti. (84)

Početak ovog postupka sastoji se u odstranjenju jajnika zajedno s njegovom vaskularnom peteljkom laparotomijom ili laparoskopski. Preporučena veličina te vaskularne peteljke je više

od 5 cm infudibulopelvičnog ligamenta. (106) Nakon kirurškog postupka radi se krioperfuzija tkiva te se tkivo zamrzne metodom „slow freezing-a“ ili vitrifikacijom. (107)

Kod transplantacije cijelog jajnika, za razliku od transplantacije komadića tkiva jajnika, odmah dolazi do revaskularizacije presatka. Time se sprječava pojačani gubitak folikula uzrokovan produženom ishemijom. (105) Poboljšanom revaskularizacijom očekuju se pozitivni rezultati dugotrajnog preživljenja presatka te time dugotrajnije održavanje njegove funkcije. (108) Martinez i sur. su u svojem istraživanju pratili moguće efekte zamrzavanja i odmrzavanja jajnika na njegovo preživljenje. Nije primijećeno pojačano propadanje primordijalnih i primarnih folikula te nije došlo do oštećenja stanica strome i krvnih žila. (109)

Ipak, ova metoda ima i neke negativne strane. Moguć je nastanak ishemijsko-reperfuzijske ozljede te je jedna od komplikacija ove metode nastanak tromboze na području anastomoze koja uzrokuje akutnu ishemiju. (108) Problem se javlja i kod postupka zamrzavanja jer je teško postići adekvatnu koncentraciju krioprotektanta u svim stanicama jajnika. (105) Prema autotransplantaciji komadića tkiva jajnika, ova metoda ima povećan rizik ponovnog prijenosa malignih stanica koje su zaostale na području srži jajnika, posebice u pacijentica oboljelih od limfoma. (108)

Uspjesi autotransplantacije cijelog jajnika, kao metode očuvanja fertiliteta, su ograničeni iz nekoliko razloga. Neadekvatan postupak krioprezervacije, mala arterija *ovarica* te prekratka vaskularna peteljka mogu biti uzrokom oštećenja jajnika. Također, može doći do dehiscencije anastomoze. Ukoliko se ugrozi preživljenje jajnika, ova metoda ne pruža mogućnost za ponovnu autotransplantaciju. (110)

Za sada nema uspješne trudnoće nakon krioprezervacije i transplantacije cijelog jajnika. (90) Ipak, postoji slučaj uspješne trudnoće nakon presađivanja cijelog svježeg jajnika nakon transplantacije učinjene između jednojajčanih blizanki. (111)

Zbog nedostatka primjerenih načina očuvanja funkcije cijelog jajnika nakon postupka krioprezervacije i transplantacije, autotransplantacija tkiva jajnika ima prednost kao metoda očuvanja fertiliteta. Osim već navedenih negativnih strana, još se može dodati puno kompleksniji kirurški zahvat kod transplantacije cijelog jajnika, a i duže vrijeme potrebno za oporavak ovih pacijentica. (112)

4.2.6. Razlozi propadanja folikula

Unaprjeđenje krioprezervacije tkiva jajnika kao metode očuvanja fertiliteta ovisi i o uspješnosti vaskularizacije presatka nakon transplantacije. Tokom razdoblja neovaskularizacije može doći do apoptoze i više od 50% primordijalnih folikula. Razlog za to se može naći, osim u nedovoljnoj opskrbi tkiva krvlju i time u hipoksiji, u prevelikom broju primordijalnih folikula koji

počinju svoj razvoj istovremeno nakon transplantacije. (113, 114) To nije normalna fiziološka pojava te je primijećena razlika u stupnju razvoja granuloza-stanica i oocita što dovodi do pojačane apoptoze folikula. (115) Već je spomenuta prednost transplantacije cijelog jajnika. Kod krioprezervacije cijelog jajnika odmah nakon transplantacije i anastomoze vaskularne peteljke s krvnim žilama dolazi do perfuzije. Time se smanjuje rizik propadanja primordijalnih folikula. (105) Preživljenje folikula pokušalo se poboljšati i primjenom faktora angiogeneze, kao i antiapoptotičnim faktorima. (116) Tijekom istraživanja učinkovitosti sfingozin-1-fosfata, kao faktora angiogeneze, Soleimani i sur. koristili su ksenotransplantaciju tkiva jajnika u miša. Zaključili su da sfingozin-1-fosfat pospješuje neovaskularizaciju tkiva jajnika te smanjuje odumiranje tkiva. (117) Također, mezenhimalne matične stanice potiču neovaskularizaciju tkiva jajnika te pospješuju prokrvavljenost presatka u istraživanju provedenom nakon ksenotransplantacije tkiva jajnika u miša. To je još jedan način koji bi u budućnosti mogao dovesti do boljeg uspjeha transplantacije jajnika kao metode očuvanja fertiliteta. (118)

4.2.7. Prednosti

Iako se krioprezervacija tkiva jajnika još uvijek smatra ekperimentalnom, važno je napomenuti da je rezultirala s 60 živorođene djece. (119) Kao što je ranije prikazano, postoji nekoliko prednosti krioprezervacije tkiva jajnika prema ostalim metodama očuvanja fertiliteta. Za razliku od metoda krioprezervacije embrija i oocita nije potrebno odgađati početak terapije maligne bolesti pošto nije potrebna stimulacija jajnika. Krioprezervacija tkiva jajnika jedina je metoda koja se može koristiti kod djevojčica prije puberteta. (90) Značajna prednost prema ostalim metodama je i ponovna funkcija jajnika kao endokrinološkog organa u gotovo svih žena, a koja potraje otprilike 5 godina. (92) Ovom metodom odgađa se početak menopauze u ovoj skupini pacijentica. (120) Razdoblje tijekom kojeg transplantirano tkivo održi svoju funkciju ovisi o broju folikula koji su preživjeli proces krioprezervacije i autotransplantacije. (101) Osim već spomenute ishemije koja dovodi do propadanja folikula, važan čimbenik je i dob pacijentice koja utječe na broj folikula na samom početku postupka. (101) Smatra se da postoji veća šansa za uspjeh krioprezervacije tkiva jajnika u ženske djece zbog veće startne brojnosti primordijalnih folikula u korteksu njihovih jajnika. (121)

Anderson i sur. prikazom slučaja pokazuju sposobnost povratka folikularnog razvoja, nakon transplantacije manjeg broja smrznutih i otopljenih komadića tkiva jajnika, koji rezultira ovulacijom. Pacijentica je rodila troje djece, od čega je samo kod prve trudnoće korištena blaga stimulacija jajnika, a druge dvije trudnoće su bile spontane. Važno je naglasiti da je rođenje trećeg djeteta bilo gotovo 6 godina nakon transplantacije. To potvrđuje mogućnost dugoročnog očuvanja funkcije jajnika te ponovni razvoj folikula koji mogu rezultirati spontanom trudnoćom.

(120) Ostavljanjem dijela tkiva jajnika još uvijek zamrznutim, omogućuju se ponovne transplantacije čime se mogu ponovno otkloniti znakovi i simptomi menopauze. (86)

Uspješna stimulacija puberteta još je jedna značajka ove metode. Ernsta i sur. prikazali su tu mogućnost kod djevojčice čiji su jajnici izgubili funkciju zbog agresivne kemoterapije i radioterapije Ewingovog sarkoma. Četiri i pol godine nakon terapije sarkoma djevojčica, u dobi od 13.5 godina, bila je bez znakova povratka bolesti. Zbog nedostatka pubertetalnog razvoja, odlučeno je transplantirati dva komadića tkiva jajnika na područje preostalog. Godinu dana poslije djevojčica je dobila menarhu. Pomoću transabdominalnog ultrazvuka prikazan je i razvoj folikula do antralnog stadija. Također, počela je razvijati sekundarne spolne karakteristike do stadija Tanner B4 i P3. Ovo je prvi klinički prikaz koji dokazuje uspješnost indukcije puberteta pomoću autotransplantacije tkiva jajnika. Razvoj folikula i proizvodnja spolnih hormona dokazuje povratak endokrine i reproduktivne sposobnosti jajnika. (122)

4.2.8. Nedostaci

S druge strane, postoji nekoliko negativnih strana krioprezervacije te potom autotransplantacije tkiva jajnika. Jedan od nedostataka je potreba za invazivnim kirurškim zahvatima. (107) Drugi problem je što transplatirano tkivo jajnika samo tijekom određenog razdoblja zadržava svoju endokrinološku i reproduktivnu funkciju. (120) Najveća opasnost ove metode očuvanja fertiliteta je prisustvo malignih stanica u jajniku te mogućnost ponovne pojave bolesti nakon reimplantacije. (123) U žena reproduktivne dobi većina tumora ne metastazira u jajnik. Povećani rizik ponovnog presađivanja malignih stanica s tkivom jajnika postoji kod pacijentica s leukemijom, Burkittovim limfomom te kasnim stadijima karcinoma dojke i kolona. (100) Najveći rizik prijenosa malignih stanica s transplantiranim tkivom jajnika postoji kod leukemije u odnosu na ostale maligne bolesti. Ipak, taj rizik se smatra malim kada se krioprezevacija tkiva jajnika radi u razdoblju remisije bolesti. Postojanje šanse za prijenosom malignih bolesti smatra se kontraindikacijom za provođenjem ove metode očuvanja fertiliteta, posebice u pacijentica oboljelih od leukemije. (123) Autopsijom je potvrđeno prisustvo malignih stanica u 8-55% žena mlađih od 40 godina, a koje su oboljele od različitih vrsta malignih tumora (leukemija, limfom, karcinom želuca, tumor dojke, tumor maternice, karcinom pluća i kolona). (124)

Opasnost prijenosa malignih stanica naglašava važnost detaljne analize i njihove detekcije u izvađenom tkivu jajnika prije i poslije krioprezervacije. To uključuje detaljnu histološku analizu te biomolekularne i imunohistološke metode. (125) Svojim istraživanjem Rosendahl je ukazao na važnost primjene lančane reakcije polimeraze (PCR, prema eng. *polymerase chain reaction)* za detekciju malignih stanica unutar jajnika prije transplantacije. Imunohistološke metode kod pacijentica s leukemijom nisu detektirale maligne stanice, za razliku od PCR-a.

Iako se PCR smatra senzitivnom metodom, uspjeh detekcije malignih stanica veoma ovisi o kvaliteti uzorka. (126) Još jedan nedostatak ove metode je nespecifičnost rezultata, odnosno pozitivan rezultat PCR-a potvrđuje prisustvo malignih stanica, ali ne govori o njihovom stvarnom potencijalu da uzrokuju ponovnu pojavu bolesti. U posljednje vrijeme, zbog nedostataka ovih metoda, počela se razvijati tehnika ksenotransplatacije. Dijelići tkiva jajnika transplantirani su u imunodeficijentne životinje te se nakon vremena potrebnog za razvoj bolesti evaluiraju s ciljem pronalaska malignih stanica. (127)

Prema Dolmansu maligne bolesti podijeljene su u tri razreda ovisno o riziku postojanja malignih stanica u tkivu jajnika (Tablica 3).(123)

Krioprezervacija i transplantacija tkiva jajnika ne bi smjela biti metoda izbora za očuvanje fertiliteta u skupini pacijentica koje su oboljele od malignih bolesti sa srednje visokim i visokim rizikom postojanja metastaza u jajniku.

Istraživači pokušavaju naći način da se i ovim pacijenticama ispuni želja za majčinstvom u budućnosti. (128)

Tablica 3. Rizik postojanja metastaza u jajniku ovisno o vrsti maligne bolesti (modificirano prema ref. 124)

Rizik prisutnosti malignih stanica u ovisnosti o vrsti maligne bolesti		
Visok rizik	Srednji rizik	Nizak rizik
Leukemija Neuroblastom Burkittov limfom	Tumor dojke(4.stadij) Karcinom kolona Adenokarcinom vrata maternice Non-Hodgkinov limfom Ewingov sarkom	Tumor dojke(1.-2.stadij) Karcinom vrata maternice skvamoznih stanica Hodgkinov limfom Nongenital rabdomiosarkom Wilmsov tumor

Moguća opcija očuvanja fertiliteta kod pacijentica oboljelih od leukemije je *in vitro* maturacija (IVM) nezrelih oocita. (123) Ta metoda prevladava problem prijenosa malignih stanica u ovoj skupini pacijentica. Kod ove metode folikuli rastu u *in vitro* uvjetima, a rezultiraju sa zrelim oocitama koje se naknadno mogu oploditi. Za razliku od krioprezervacije tkiva jajnika, ne radi

se reimplantacija tkiva pa nema bojazni za prijenosom stanica tumora. (129) Također, IVM nezrelih oocita je primjerena i za pacijentice s tumorom jajnika. Pacijentici, kod koje je stimulacija jajnika i krioprezervacija tkiva jajnika bila kontraindicirana, nakon ooforektomije je rađena aspiracije svih vidljivih folikula. Nakon sazrijevanja oocita one su oplođene te je potom izvedena krioprezervacija embrija. Nakon izlječenja pacijentičini embriji su odmrznuti te su preneseni u maternicu. To je rezultiralo uspješnom trudnoćom i rođenjem živog djeteta. Ovo je ujedno i prva dokumentirana trudnoća nakon IVM-a nezrelih oocita. (130) Kada dođe do trudnoće, u ovih pacijentica potrebna je primjena egzogenih hormona za njezino održavanje jer kod ove metode ne postoji mogućnost vraćanja endokrine funkcije. Osim tijekom trudnoće, potporna terapija potrebna je kroz cijeli život. (129)

4.2.9. Arteficijalni jajnik

Primjena arteficijalnog jajnika još je jedna mogućnost kod pacijentica kojima je krioprezervacija tkiva jajnika kontraindicirana metoda očuvanja fertiliteta. (128) Dovodi do povratka reproduktivne funkcije jajnika bez rizika za prijenosom malignih stanica. (90) Kod ovog postupka, slično kao i kod smrzavanja tkiva jajnika, uzima se biopsija tkiva jajnika prije početka liječenja. Zatim se iz tog bioptata, prije ili nakon krioprezervacije, izoliraju preantralni folikuli. (131) Kod izdvajanja preantralnih folikula, bitno je uvijek provjeriti nepostojanje malignih stanica. (132) Nakon što se u pacijentice postigne remisija potrebno je još jednom napraviti biopsiju jajnika kako bi se izolirale potrebne stanice jajnika. Ovo je potrebno kako bi izbjegli vraćanje stanica koje su potencijalno maligne, a i zato jer su krioprezervirane stanice lošije kvalitete od stanica koje se potencijalno mogu dobiti nakon kemoterapije. (128, 133) Zatim bi se izolirane stanice trebale autotransplantacijom vratiti u tijelo žene, ali u umjetno izrađen jajnik. Za materijal tih jajnika koristile su se brojne tvari – kolagen, fibrin, alginat i druge. (128) Do sada nije zabilježena ni jedna uspješna trudnoća u žena koristeći ovu metodu. (90)

4.2.10. Kriteriji za krioprezervaciju tkiva jajnika

Postojanje negativnih strana kod krioprezervacije tkiva jajnika diktira potrebu za stvaranjem kriterija po kojima se pacijentice mogu uključiti u proces krioprezervacije. Prema Edinburškim kriterijima krioprezervacija tkiva jajnika moguća je u prepubertetalnih djevojčica, djevojkama u doba adolescencije i u mladih žena do 35 godine života. Preporučuje se prije gonadotoksične terapije za koju se smatra da povećava rizik gubitka funkcije jajnika za više od 50%. Važno je da postoji velika šansa za petogodišnjim preživljenjem kod ovih pacijentica te nizak rizik postojanja malignih stanica u tkivu jajnika. Ukoliko je pacijentica starija od 15 godina, ne smije prije ove metode primati kemoterapiju i/ili radioterapiju, a mlađima od 15 godina dozvoljena je kemoterapija umjerene gonadotoksičnosti. Serološkim testovima važno je isključiti postojanje infekcija koje se prenose krvlju (HIV, sifilis i hepatitis B). Kontraindikacija za ovu metodu je i

trudnoća te rođenje djece prije pojave maligne bolesti. Sve pacijentice moraju potpisati informirani pristanak, a u slučaju maloljetnih pacijentica to mora učiniti roditelj ili pravni skrbnik. (134)

Wallace i sur. su, kako bi potvrdili valjanost Edinburških kriterija, iz skupine od 410 pacijentica izabrali 34 koje su odgovarale kriterijima. Nakon praćenja pacijentica iz obje skupine, rezultati su pokazali da je u skupini koja je spadala pod kriterije za krioprezervaciju tkiva jajnika šansa za razvoj prijevremenog zatajivanja jajnika iznosila 35%, dok je kod ostalih pacijentica bila tek 1%. Njegova analiza je stoga pokazala da Edinburški kriteriji točno identificiraju djevojke i mlade žene koje imaju veći rizik za prijevremeni gubitak funkcije jajnika. (135)

4.3. GnRH Agonisti

Sljedeća metoda očuvanja fertiliteta je primjena GnRH agonista.

Gonadotropin oslobađajući hormon je peptidni hormon koji izlučuju neuroni u hipotalamusu. O njegovom pulsativnom oslobađanju ovisi razvoj folikula te normalan menstrualni ciklus. Također, pulsativnim oslobađanjem on sam povećava broj svojih receptora na stanicama hipofize. Svojim vezanjem na receptore hipofize dovodi do stvaranja i oslobađanja FSH i LH. (39)

GnRH agonisti su sintetski peptidi koji se, kao i endogeno izlučeni GnRH, vežu na receptore hipofize. (136) Za razliku od njegovog endogenog pulsativnog lučenja, kontinuirana primjena agonista GnRH receptora rezultira njihovim inhibicijskim učinkom te smanjenjem broja receptora. Konačni rezultat primjene GnRH agonista je pad koncentracije gonadotropina oslobođenih iz hipofize te niže koncentracije hormona oslobođenih iz gonada. (40) Može se koristiti kao terapija u bolestima koje su ovisne o steroidnim hormonima kao što su miomi, endometrioze ili hormon ovisni tumori. (39) Agonisti hormona koji oslobađaju luteinizirajući hormon koriste se u u premenopauzalnih žena kao dodatna terapija tumora dojke ovisnog o hormonima. Njihova prednost je reverzibilnost njihovog učinka. Nakon prekida liječenja dolazi do ponovne normalizacije razine hormona što povećava šansu za vraćanjem reproduktivne sposobnosti. (2) Međutim, kao metoda očuvanja fertiliteta upitne je efikasnosti. Postoji nekoliko teorija o zaštitinom djelovanju GnRH agonista u pacijentica s malignim bolestima. Procesom starenja sve više folikula podliježe apoptozi te su razine FSH u krvi lagano povišene zbog nedostatka negativne povratne sprege estrogena na os hipotalamus-hipofiza. Smatra se da povišeni FSH potiče daljnu apoptozu folikula te se time cijeli proces i dalje pospješuje. Nastaje takozvani fenomen '*circulus vitiosus*'. Kemoterapija zbog svog gonadotoksičnog djelovanja uzrokuje uništavanje folikula. To dovodi do smanjene koncentracije spolnih hormona te se

prekida negativna povratna sprega na os hipotalamus-hipofiza. Primjenom GnRH agonista sprječava se porast koncentracije FSH koji se očekuje te nema poticanja rasta nove kohorte folikula koja bi bila uništena kemoterapijom. (137) GnRh agonisti dovode do smanjenog broja folikula u razvoju pa je smanjena i koncentracija estrogena. (138) Estrogeni uzrokuju vazodilataciju posrednim djelovanjem dušikova oksida. (139) Hipoestrogeno stanje dovodi do smanjenje prokrvavljenosti jajnika te su oni u smanjenom kontaktu s gonadotoksičnim lijekovima. Sfingozin-1-fosfat je molekula čija je funkcija sprječavanje apoptoze. Moguće je da GnRH agonisti uzrokuju njegovo pojačano djelovanje te se time smanjuje uništavanje folikula. Također, GnRH agonisti onemogućuju uništavanje zametnih matičnih stanica jajnika. Kasnije se iz njih mogu ponovno razviti primordijalni folikuli. (138)

Brojna su istraživanja provedena sa svrhom utvrđivanja uspješnosti očuvanja fertiliteta primjenom GnRH agonista. Behringer i sur. u svojem istraživanju na pacijentima s Hodgkingovim limfomom nisu primjetili poboljšanje ovarijske funkcije uz primjenu GnRH agonista. Kao pokazatelj rezerve jajnika koristili su AMH čija je koncentracija ostala niža i godinu dana nakon prestanka terapije. GnRH agonisti nisu se pokazali kao siguran izbor za očuvanje fertiliteta u mladih žena. (140) Postotak amenoreje uzrokovane kemoterapijom gotovo je podjednak u skupini pacijentica koje su primila GnRH agonist i onih koje nisu. Amenoreja se koristila kao indirektni pokazatelj fertiliteta. Dakle, zaključak i ovog istraživanja je da primjena GnRH agonista nema pozitivan učinak na očuvanje funkcije jajnika te da GnRH agonisti nisu siguran izbor za očuvanje fertiliteta u mladih žena. (141) Prema istraživanju Demeesterea i sur. i u skupini koja je primala agoniste GnRH došlo je do preranog gubitka funkcije jajnika. Nakon godine dana praćenja, otprilike 20% pacijentica u obje skupine je doživjelo je gubitak funkcije jajnika. (142) Ipak, postoje istraživanja koja pokazuju suprotne rezultate. Rana menopauza u pacijentica s tumorom dojke javila se u 25,9% pacijentica koje su primale samo kemoterapiju i u 8,9% pacijentica koje su uz kemoterapiju primale i GnRH agoniste. Ovo istraživanje pokazalo je da se GnRH agonisti mogu koristiti kao profilaksa sprječavanja oštećenja funkcije jajnika. (143) Slične rezultate pokazuje i istraživanje koje je nedavno provedeno kod pacijentica s tumorom dojke. Gubitak funkcije jajnika kroz dvije godine, koji se evaluirao odsustvom menstruacije te koncentracijama FSH, u skupini pacijentica bez primjene GnRH agonista bilo je 22%, a u skupini pacijentica koje su ih primale 8%. Pozitivan učinak GnRH agonista vidio se i na stopama trudnoće, koje su bile više kod pacijentica koje su primale agoniste tijekom svoje kemoterapije. Važno je spomenuti i povećanje stopa preživljenja kod ove skupine pacijentica. (144)

Zbog veoma različitih rezultata, dosadašnjim istraživanjima nije u potpunosti potvrđena korist GnRH agonista u očuvanju fertiliteta u pacijentica koje primaju gonadotoksičnu terapiju. Ipak, njihova primjena ima dokazanu pozitivnu stranu. Agonisti dovode do manje incidencije jačeg

vaginalnog krvarenja koje je uzrokovano toksičnim djelovanjem kemoterapije na trombocite. (142)

Unatoč nekim ohrabrujućim rezultatima, odlukom Američkog društva za reproduktivnu medicinu iz 2013. godine, zbog svoje dvojbene koristi GnRH agonisti se ne bi trebali preporučiti pacijenticama kao opcija očuvanja fertiliteta. (36) Međutim izvješćem iz 2015. godine, zbog dodatnih pozitivnih rezultata istraživanja, Američko društvo za reproduktivnu medicinu pridaje određenu važnost GnRH agonistima kao mogućoj opciji očuvanja funkcije jajnika u premenopauzalnih žena s tumorima dojke. (145) Također, preporučuje se primjena GnRH agonista kao dodatna terapija uz krioprezervaciju embrija, oocita ili tkiva jajnika čime se povećaju šanse za pozitivnim ishodom metoda očuvanja fertiliteta. (146)

4.4. Transpozicija jajnika

Zaštitna funkcija transpozicije jajnika s ciljem očuvanja fertiliteta uočena je još 1970-tih godina. Jajnici su se laparotomijom premještali izvan područja djelovanja radioterapije. (147) Transpozicija jajnika prvi put je izvedena 1968. godine. Cilj je bio zaštita funkcije jajnika u ženskih pacijentica oboljelih od Hodgkinovog limfoma. U oko 60% pacijentica uspješno je očuvana funkcija jajnika te mogućnost kasnijeg začeća. (148)

Danas se prednost daje laparoskopskom postupku transpozicije jajnika jer je vrijeme oporavka nakon takve operacije kraće. Omogućava se i početak radioterapije bez odgađanja. (147)

Doza radioterapije koja djeluje na jajnike smanjuje se za čak 95% primjerenom transpozicijom jajnika. (149)

Presijecanjem utero-ovarijskih ligamenata jajnici postanu pokretni te se kod kraniospinalne radijacije pomiču što više prema lateralno. Kod radioterapije zdjeličnog područja cilj je jajnike premjestiti što više iznad ruba pelvisa. Smjestiti se mogu ili na područje prednjeg zida abdomena ili u parakolični prostor. Ova metoda se ne preporučuje pacijenticama koje uz radioterapiju trebaju primiti i kemoterapiju pošto ova metoda ne štiti od gonadotoksičnosti kemoterapije. (150)

Transpozicija jajnika povezuje se uz nekoliko mogućih negativnih posljedica. Nakon operativnog zahvata veći je rizik stvaranja ciste jajnika te nastanak postoperativnih priraslica. Može se javiti kronična bol na području zdjelice, a može doći i do preranog gubitka funkcije jajnika. U manjem postotku pacijenata (1%) u tkivu jajnika mogu biti prisutne maligne stanice. (151) Kod karcinoma vrata maternice transpozicija jajnika se preporučuje raditi u pacijentica koje su mlađe od 40 godina i kod kojih je karcinom u ranom stadiju (manji od 3 cm). Time se

smanjuje rizik postojanja metastaza u jajnicima, a koje bi kasnije dovele do relapsa bolesti i ugrozile život pacijentica. (152) Jajnici se mogu spontano seliti s mjesta transpozicije pa su preporuke da se transpozicija jajnika obavi što bliže datumu početka radioterapije. (153)

Nedostatak ove metode je i nemogućnost spontanog začeća. Nastanak postoperativnih priraslica sprječava mogućnost vraćanja jajnika u zdjeličnu šupljinu. (154) Osim toga, radioterapija oštećuje krvne žile te se smanjuje prokrvljenost maternice, a koja je bitna za uspješnu implantaciju i trudnoću. (155) Jajovodi su često oštećeni tijekom postupka transpozicije, što je još jedan faktor koji dovodi do smanjenja šanse za spontanom trudnoćom. (154) Smanjen broj skupljenih oocita za IVF nakon transpozicije jajnika može biti rezultat transabdominalnog praćenja razvoja folikula i aspiracije oocita. (156) Osim potrebe za IVF-om, često se javlja se potreba i za surogat majkom što nailazi na etičke i zakonodavstvene probleme. (157)

Većina pacijentica nakon radioterapije ima očuvanu endokrinu funkciju jajnika, dok neka istraživanja ukazuju da samo kod 15% pacijentica dolazi do oporavka reproduktivne funkcije ovarija. (158) Nedavna analiza prikazala je očuvanje funkcije jajnika u 69,2% pacijentica zbog transpozicije jajnika prije radioterapije, a funkcija jajnika evaluirala se prisutnošću simptoma i razinama FSH-a. (159) Istraživanje Saliha i sur. potvrđuje hipotezu da transpozicija jajnika omogućuje očuvanje endokrine funkcije jajnika jer je došlo do normalizacije razina hormona. Pacijentice su povratile i normalan menstrualni ciklus. Iako to govori u prilog oporavka endokrine funkcije, ne može se na temelju uspostave menstrualnog ciklusa zaključiti da je i reproduktivna funkcija jajnika očuvana. Efikasnost transpozicije jajnika, kao metode očuvanja fertiliteta, teško je utvrditi zbog malog broja pacijentica koje se javljaju za postupak IVF-a u želji za majčinstvom. (154) Čini se da je najveća prednost ove metode očuvanje endokrine funkcije, a ne mogućnost uspješne reprodukcije nakon transpozicije. (160)

Postoje slučajevi uspješne indukcije ovulacije i IVF-a nakon transpozicije jajnika. Primjer je uspješna stimulacija jajnika u pacijentice oboljele od karcinoma vrata maternice. Zbog histerektomije i radioterapije, za trudnoću joj je bila potrebna surogat majka. (161) Nedavni slučaj prikazuje pacijenticu koja je sama iznijela trudnoću, bez potrebe za surogat majkom. To je pacijentica oboljela od karcinoma anusa za čije liječenje je bila potrebna radioterapija zdjeličnog područja. Unatoč tome, nakon stimulacije jajnika i IVF-a došlo je do uspješne implantacije embrija nakon transfera. (162)

Prema dosadašnjim rezultatima istraživanja nesigurno je govoriti o kvaliteti reproduktivne funkcije jajnika nakon transpozicije. Ipak, istraživanja dokazuju njezin uspjeh u očuvanju endokrinološke funkcije jajnika koja dovodi do redovitog menstrualnog ciklusa, a time i do veće kvalitete života pacijentica. (154)

4.5. Krioprezervacija sjemena

Krioprezervacija sjemena je standardna metoda očuvanja fertiliteta u dječaka nakon puberteta i u odraslih muškaraca. Hormonalna terapija GnRH agonistima se ne preporučuje jer se nije pokazala efikasnom. Krioprezervacija tkiva testisa, koja je eksperimentalna metoda, može se preporučiti dječacima prije početka puberteta jer za nju nije potrebna spolna zrelost. (36)

Najčešće maligne bolesti od kojih obolijevaju dječaci nakon puberteta i odrasli muškarci su karcinom testisa i non-Hodgkinov limfom. (4) Veoma je važno pacijentima napomenuti visok rizik gubitka reproduktivne sposobnosti uzrokovane terapijom malignih bolesti. (163)

Muški spolni sustav izrazito je osjetljiv na djelovanje kemoterapije i/ili radioterapije. Terapija ima direktan gonadotoksičan učinak na testise. Uz to djelovanjem na Leydigove stanice oštećuje se njihova endokrina funkcija. (37) Leydigove stanice izlučuju androgene hormone, odnosno zadužene su za proizvodnju testosterona. (88) Posljedica terapije je i oštećenje DNA, smanjen broj i pokretljivost spermija. Snižen broj spermija može biti rezultat i same maligne bolesti posebice u pacijenata oboljelih od Hodgkinovog limfoma i karcinoma testisa. Poremećaj ejakulacije, zbog disfunkcije živaca, nastaje često kod operacija na području zdjelice. (10)

Važan korak kod ove metode je provjera kvalitete sjemena prije njegovog pohranjivanja. (164) Nalaz spermiogram može biti loš i prije samog početka terapije. Intracitoplazmatska injekcija spermija omogućuje očuvanje fertiliteta i kod ovakvih slučajeva. (36) Dovoljno je samo nekoliko spermija da dođe do oplodnje oocite te trudnoće. Stoga, i u pacijenata koji imaju loš rezultat spermiograma, treba poticati odluku za krioprezervacijom sjemena. (165)

Krioprezervacija sjemena mora biti omogućena svim muškarcima s reproduktivnim potencijalom te što prije početka terapije maligne bolesti. (36)

5. Zaključak

Zahvaljujući uspješnijim protokolima liječenja pacijenata oboljelih od malignih bolesti poboljšalo se njihovo preživljenje. To uvjetuje da se sve više pažnje pridaje dugoročnoj kvaliteti života pacijenata. Karakteristika kvalitetnog života je i mogućnost uspješne reprodukcije. Zbog toga je veoma važan razvoj onkofertilitetne medicine koja omogućuje očuvanje fertiliteta kod ove skupine pacijenata. Najpouzdanije metode koje se koriste uključuju krioprezervaciju embrija i oocita te primjenu GnRH agonista kod ženskih osoba, a krioprezervaciju sjemena kod muških osoba. Od velike je značajnosti i daljnje ulaganje u ovu granu medicine s ciljem poboljšanja sigurnosti i rezultata postojećih metoda te otkivanje novih. Poseban naglasak bi trebao biti na očuvanju fertilnosti kod djece prije puberteta jer se metode za očuvanje fertiliteta kod ove skupine još uvijek smatraju eksperimentalnim. Ipak, pregled rezultata istraživanja krioprezervacije tkiva jajnika pokazuje da je to obećavajuća metoda očuvanja fertiliteta. Potrebno je liječnike što više upoznati s mogućnostima onkofertilitetne medicine. Njihovo pravodobno djelovanje važno je da bi se uspjele provesti odabrane metode očuvanja fertiliteta prije terapije maligne bolesti. Dakle, da bi onkofertilitetna medicina došla do što boljih rezultata potrebno je educirati sve liječnike koji su uključeni u skrb pacijenta.

6. Zahvale

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof.dr.sc Marini Šprem Goldštajn, na usmjeravanju, pomoći i potpori u pisanju ovog rada.

Zahvaljujem se članovima povjerenstva na evaluaciji diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i Svenu na potpori tijekom cijelog školovanja.

7. Literatura

1. Woodruff TK, Snyder KA. Oncofertility : fertility preservation for cancer survivors. New York, N.Y.: Springer; 2007. Str. 3; 11; 20-23; 59.
2. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska Naklada; 2013. Str. 20; 73; 78-80.
3. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2014. Stewart BW, Wild CP, ur. [Internet] Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014 [pristupljeno 25.05.2017.]. Dostupno na: http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014
4. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Forman D, Bray F, Dikshit R i sur., ur. [Internet] Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2013. [pristupljeno 25.05.2017.]. Dostupno na: http://globocan.iarc.fr/old/age-specific_table_r.asp?selection=224900&title=World&sex=2&type=0&stat=0&window=1&sort=0&submit=%C2%A0Execute.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj: 2014. Šekerija M, ur. [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2016. [pristupljeno 25.05.2017.]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2014_final.pdf
6. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj: 2013. Šekerija M, ur. [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2015. [pristupljeno 25.05.2017.]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2013_final.pdf
7. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj: 2012. Šekerija M, ur. [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2014. [pristupljeno 25.05.2017.]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2012_final.pdf
8. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA: a cancer journal for clinicians. 2014;64(1):9-29.
9. Rodin U. Porodi u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj 2015. godine [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2016. [pristupljeno 24.05.2017.]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2016/10/Porodi_2015.pdf
10. Johnson RH. Innovative fertility preservation strategies and programs for young adults with cancer. Clinical Oncology in Adolescents and Young Adults. 2016;2016(6):1-9.
11. Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte. Human reproduction. 2003;18(1):117-21.
12. Wo JY, Viswanathan AN. Impact of radiotherapy on fertility, pregnancy, and neonatal outcomes in female cancer patients. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2009;73(5):1304-12.
13. Ogilvy-Stuart AL, Shalet SM. Effect of radiation on the human reproductive system. Environmental health perspectives. 1993;101 Suppl 2:109-16.
14. Chung K, Donnez J, Ginsburg E, Meirow D. Emergency IVF versus ovarian tissue cryopreservation: decision making in fertility preservation for female cancer patients. Fertility and sterility. 2013;99(6):1534-42.
15. Anderson RA, Mitchell RT, Kelsey TW, Spears N, Telfer EE, Wallace WH. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. The lancet Diabetes & endocrinology. 2015;3(7):556-67.
16. Wallace WH, Thomson AB, Saran F, Kelsey TW. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2005;62(3):738-44.
17. Wallace WH, Shalet SM, Crowne EC, Morris-Jones PH, Gattamaneni HR. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: natural history and prognosis. Clinical oncology. 1989;1(2):75-9.
18. Sanders JE, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, i sur. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. Blood. 1996;87(7):3045-52.

19. Appelman-Dijkstra NM, Kokshoorn NE, Dekkers OM, Neelis KJ, Biermasz NR, Romijn JA, i sur. Pituitary dysfunction in adult patients after cranial radiotherapy: systematic review and meta-analysis. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2011;96(8):2330-40.
20. Bath LE, Anderson RA, Critchley HO, Kelnar CJ, Wallace WH. Hypothalamic-pituitary-ovarian dysfunction after prepubertal chemotherapy and cranial irradiation for acute leukaemia. Human reproduction. 2001;16(9):1838-44.
21. Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC, i sur. Fertility of female survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009;27(16):2677-85.
22. Pai HH, Thornton A, Katznelson L, Finkelstein DM, Adams JA, Fullerton BC, i sur. Hypothalamic/pituitary function following high-dose conformal radiotherapy to the base of skull: demonstration of a dose-effect relationship using dose-volume histogram analysis. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2001;49(4):1079-92.
23. Critchley HO, Wallace WH, Shalet SM, Mamtora H, Higginson J, Anderson DC. Abdominal irradiation in childhood; the potential for pregnancy. British journal of obstetrics and gynaecology. 1992;99(5):392-4.
24. Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. Clinical obstetrics and gynecology. 2010;53(4):727-39.
25. Ben-Aharon I, Meizner I, Granot T, Uri S, Hasky N, Rizel S, i sur. Chemotherapy-induced ovarian failure as a prototype for acute vascular toxicity. The oncologist. 2012;17(11):1386-93.
26. Ben-Aharon I, Granot T, Meizner I, Hasky N, Tobar A, Rizel S, i sur. Long-Term Follow-Up of Chemotherapy-Induced Ovarian Failure in Young Breast Cancer Patients: The Role of Vascular Toxicity. The oncologist. 2015;20(9):985-91.
27. Devine PJ, Perreault SD, Luderer U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. Biology of reproduction. 2012;86(2):27.
28. Levine J, Canada A, Stern CJ. Fertility preservation in adolescents and young adults with cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010;28(32):4831-41.
29. Green DM, Sklar CA, Boice JD, Jr., Mulvihill JJ, Whitton JA, Stovall M, i sur. Ovarian failure and reproductive outcomes after childhood cancer treatment: results from the Childhood Cancer Survivor Study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009;27(14):2374-81.
30. Bines J, Oleske DM, Cobleigh MA. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1996;14(5):1718-29.
31. Ross L, Chung K, Macdonald H. Fertility preservation in the female cancer patient. Journal of surgical oncology. 2014;110(8):907-11.
32. Ben-Aharon I, Shalgi R. What lies behind chemotherapy-induced ovarian toxicity? Reproduction. 2012;144(2):153-63.
33. Gadducci A, Cosio S, Genazzani AR. Ovarian function and childbearing issues in breast cancer survivors. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2007;23(11):625-31.
34. Parulekar WR, Day AG, Ottaway JA, Shepherd LE, Trudeau ME, Bramwell V, i sur. Incidence and prognostic impact of amenorrhea during adjuvant therapy in high-risk premenopausal breast cancer: analysis of a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study--NCIC CTG MA.5. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005;23(25):6002-8.
35. Bar-Joseph H, Ben-Aharon I, Tzabari M, Tsarfaty G, Stemmer SM, Shalgi R. In vivo bioimaging as a novel strategy to detect doxorubicin-induced damage to gonadal blood vessels. PloS one. 2011;6(9):e23492.
36. Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, i sur. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical

practice guideline update. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2013;31(19):2500-10.
37. Gracia C, Woodruff TK. Oncofertility medical practice : clinical issues and implementation. New York: Springer; 2012. Str. 18; 52.
38. Broer SL, Mol BW, Hendriks D, Broekmans FJ. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. Fertility and sterility. 2009;91(3):705-14.
39. Šimunić V, Ciglar S, ur., Suchanek E, ur. Ginekologija. Zagreb: Naklada Ljevak; 2001. Str. 36-37; 42; 361.
40. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, Trkulja V, ur., Klarica M, ur., Šalković-Petrišić M, ur. Temeljna i Klinička Farmakologija. 11 izd. Zagreb: Medicinska Naklada; 2011. Str. 651-655; 716.
41. Benard J, Duros S, El Hachem H, Sonigo C, Sifer C, Grynberg M. Freezing oocytes or embryos after controlled ovarian hyperstimulation in cancer patients: the state of the art. Future oncology. 2016;12(14):1731-41.
42. Oktay K, Buyuk E, Libertella N, Akar M, Rosenwaks Z. Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005;23(19):4347-53.
43. Cakmak H, Rosen MP. Ovarian stimulation in cancer patients. Fertility and sterility. 2013;99(6):1476-84.
44. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. Biology of reproduction. 2003;69(3):1023-31.
45. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. Fertility and sterility. 2003;80(1):116-22.
46. von Wolff M, Thaler CJ, Frambach T, Zeeb C, Lawrenz B, Popovici RM, i sur. Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase. Fertility and sterility. 2009;92(4):1360-5.
47. Turan V, Bedoschi G, Moy F, Oktay K. Safety and feasibility of performing two consecutive ovarian stimulation cycles with the use of letrozole-gonadotropin protocol for fertility preservation in breast cancer patients. Fertility and sterility. 2013;100(6):1681-5 e1.
48. Tsampras N, Gould D, Fitzgerald CT. Double ovarian stimulation (DuoStim) protocol for fertility preservation in female oncology patients. Human fertility. 2017:1-6.
49. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Fertility preservation in women with breast cancer. Clinical obstetrics and gynecology. 2010;53(4):753-62.
50. Mitwally MF, Casper RF. Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. Fertility and sterility. 2001;75(2):305-9.
51. Oktay K, Hourvitz A, Sahin G, Oktem O, Safro B, Cil A, i sur. Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2006;91(10):3885-90.
52. Johnson LN, Dillon KE, Sammel MD, Efymow BL, Mainigi MA, Dokras A, i sur. Response to ovarian stimulation in patients facing gonadotoxic therapy. Reproductive biomedicine online. 2013;26(4):337-44.
53. Oktay K, Kim JY, Barad D, Babayev SN. Association of BRCA1 mutations with occult primary ovarian insufficiency: a possible explanation for the link between infertility and breast/ovarian cancer risks. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010;28(2):240-4.
54. Oktay K, Turkcuoglu I, Rodriguez-Wallberg KA. GnRH agonist trigger for women with breast cancer undergoing fertility preservation by aromatase inhibitor/FSH stimulation. Reproductive biomedicine online. 2010;20(6):783-8.
55. Reddy J, Turan V, Bedoschi G, Moy F, Oktay K. Triggering final oocyte maturation with gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) versus human chorionic

gonadotropin (hCG) in breast cancer patients undergoing fertility preservation: an extended experience. Journal of assisted reproduction and genetics. 2014;31(7):927-32.
56. Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K. Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2008;26(16):2630-5.
57. Kim J, Turan V, Oktay K. Long-Term Safety of Letrozole and Gonadotropin Stimulation for Fertility Preservation in Women With Breast Cancer. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2016;101(4):1364-71.
58. 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. Human reproduction. 2003;18(1):90-5.
59. Robertson AD, Missmer SA, Ginsburg ES. Embryo yield after in vitro fertilization in women undergoing embryo banking for fertility preservation before chemotherapy. Fertility and sterility. 2011;95(2):588-91.
60. Almog B, Azem F, Gordon D, Pauzner D, Amit A, Barkan G, i sur. Effects of cancer on ovarian response in controlled ovarian stimulation for fertility preservation. Fertility and sterility. 2012;98(4):957-60.
61. 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. Journal of assisted reproduction and genetics. 2015;32(4):587-96.
62. Domingo J, Guillen V, Ayllon Y, Martinez M, Munoz E, Pellicer A, i sur. Ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in cancer patients is diminished even before oncological treatment. Fertility and sterility. 2012;97(4):930-4.
63. Engmann L, DiLuigi A, Schmidt D, Nulsen J, Maier D, Benadiva C. The use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist to induce oocyte maturation after cotreatment with GnRH antagonist in high-risk patients undergoing in vitro fertilization prevents the risk of ovarian hyperstimulation syndrome: a prospective randomized controlled study. Fertility and sterility. 2008;89(1):84-91.
64. Engmann L, Benadiva C, Humaidan P. GnRH agonist trigger for the induction of oocyte maturation in GnRH antagonist IVF cycles: a SWOT analysis. Reproductive biomedicine online. 2016;32(3):274-85.
65. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature. 1983;305(5936):707-9.
66. Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertility and sterility. 1984;42(2):293-6.
67. Practice Committee of American Society for Reproductive M. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. Fertility and sterility. 2013;100(5):1214-23.
68. Rienzi L, Ubaldi FM. Oocyte versus embryo cryopreservation for fertility preservation in cancer patients: guaranteeing a women's autonomy. Journal of assisted reproduction and genetics. 2015;32(8):1195-6.
69. Levron J, Leibovitz O, Brengauz M, Gitman H, Yerushalmi GM, Katorza E, i sur. Cryopreservation of day 2-3 embryos by vitrification yields better outcome than slow freezing. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2014;30(3):202-4.
70. Barcroft J, Dayoub N, Thong KJ. Fifteen year follow-up of embryos cryopreserved in cancer patients for fertility preservation. Journal of assisted reproduction and genetics. 2013;30(11):1407-13.
71. Dolmans MM, Hollanders de Ouderaen S, Demylle D, Pirard C. Utilization rates and results of long-term embryo cryopreservation before gonadotoxic treatment. Journal of assisted reproduction and genetics. 2015;32(8):1233-7.

72. Practice Committees of American Society for Reproductive M, Society for Assisted Reproductive T. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. Fertility and sterility. 2013;99(1):37-43.
73. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology. 2012;26(3):391-405.
74. Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Fertility and sterility. 2011;96(2):277-85.
75. Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. Human reproduction update. 2012;18(5):536-54.
76. Forman EJ, Li X, Ferry KM, Scott K, Treff NR, Scott RT, Jr. Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. Fertility and sterility. 2012;98(3):644-9.
77. Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, i sur. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. Human reproduction. 2010;25(1):66-73.
78. Goldman KN, Noyes NL, Knopman JM, McCaffrey C, Grifo JA. Oocyte efficiency: does live birth rate differ when analyzing cryopreserved and fresh oocytes on a per-oocyte basis? Fertility and sterility. 2013;100(3):712-7.
79. Martinez M, Rabadan S, Domingo J, Cobo A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Obstetric outcome after oocyte vitrification and warming for fertility preservation in women with cancer. Reproductive biomedicine online. 2014;29(6):722-8.
80. Goldman KN, Kramer Y, Hodes-Wertz B, Noyes N, McCaffrey C, Grifo JA. Long-term cryopreservation of human oocytes does not increase embryonic aneuploidy. Fertility and sterility. 2015;103(3):662-8.
81. Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. Reproductive biomedicine online. 2009;18(6):769-76.
82. Zeltzer LK. Cancer in adolescents and young adults psychosocial aspects. Long-term survivors. Cancer. 1993;71(10 Suppl):3463-8.
83. Donnez J, Bassil S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. Human reproduction update. 1998;4(3):248-59.
84. Practice Committee of American Society for Reproductive M. Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion. Fertility and sterility. 2014;101(5):1237-43.
85. Ott J, Nouri K, Stogbauer L, Fischer EM, Lipovac M, Promberger R, i sur. Ovarian tissue cryopreservation for non-malignant indications. Archives of gynecology and obstetrics. 2010;281(4):735-9.
86. Dolmans MM, Jadoul P, Gilliaux S, Amorim CA, Luyckx V, Squifflet J, i sur. A review of 15 years of ovarian tissue bank activities. Journal of assisted reproduction and genetics. 2013;30(3):305-14.
87. Hickman LC, Uy-Kroh MJ, Chiesa-Vottero A, Desai N, Flyckt R. Ovarian Tissue Cryopreservation for Benign Gynecologic Disease: A Case of Ovarian Torsion and Review of the Literature. Journal of minimally invasive gynecology. 2016;23(3):446-9.
88. Junqueira LC, Carneiro J, Bradamante Ž, ur., Kostović-Knežević LJ, ur. Osnove histologije. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005. Str. 441-449.
89. Seli E, Tangir J. Fertility preservation options for female patients with malignancies. Current opinion in obstetrics & gynecology. 2005;17(3):299-308.
90. Salama M, Woodruff TK. New advances in ovarian autotransplantation to restore fertility in cancer patients. Cancer metastasis reviews. 2015;34(4):807-22.
91. Harada M, Osuga Y. Where are oncofertility and fertility preservation treatments heading in 2016? Future oncology. 2016;12(20):2313-21.
92. Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT, i sur. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved

ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. Fertility and sterility. 2013;99(6):1503-13.
93. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, i sur. Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report. Human reproduction. 2006;21(1):183-8.
94. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonckt A, Demylle D, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. Human reproduction update. 2006;12(5):519-35.
95. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocrine reviews. 1996;17(2):121-55.
96. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. The New England journal of medicine. 2000;342(25):1919.
97. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, i sur. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet. 2004;364(9443):1405-10.
98. Demeestere I, Simon P, Dedeken L, Moffa F, Tsepelidis S, Brachet C, i sur. Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood. Human reproduction. 2015;30(9):2107-9.
99. Oktay K, Economos K, Kan M, Rucinski J, Veeck L, Rosenwaks Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. Jama. 2001;286(12):1490-3.
100. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. Human reproduction update. 2004;10(3):251-66.
101. Kim SS, Lee WS, Chung MK, Lee HC, Lee HH, Hill D. Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients. Fertility and sterility. 2009;91(6):2349-54.
102. Bedaiwy MA, Shahin AY, Falcone T. Reproductive organ transplantation: advances and controversies. Fertility and sterility. 2008;90(6):2031-55.
103. Stern CJ, Gook D, Hale LG, Agresta F, Oldham J, Rozen G, i sur. First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy. Human reproduction. 2013;28(11):2996-9.
104. Kim SS. Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study. Journal of assisted reproduction and genetics. 2012;29(6):489-93.
105. Bedaiwy MA, Hussein MR, Biscotti C, Falcone T. Cryopreservation of intact human ovary with its vascular pedicle. Human reproduction. 2006;21(12):3258-69.
106. Jadoul P, Donnez J, Dolmans MM, Squifflet J, Lengele B, Martinez-Madrid B. Laparoscopic ovariectomy for whole human ovary cryopreservation: technical aspects. Fertility and sterility. 2007;87(4):971-5.
107. Salama M, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P. Updates in preserving reproductive potential of prepubertal girls with cancer: Systematic review. Critical reviews in oncology/hematology. 2016;103:10-21.
108. Kim SS. Time to re-think: ovarian tissue transplantation versus whole ovary transplantation. Reproductive biomedicine online. 2010;20(2):171-4.
109. Martinez-Madrid B, Camboni A, Dolmans MM, Nottola S, Van Langendonckt A, Donnez J. Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. Fertility and sterility. 2007;87(5):1153-65.
110. Courbiere B, Caquant L, Mazoyer C, Franck M, Lornage J, Salle B. Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. Fertility and sterility. 2009;91(6):2697-706.
111. Silber SJ, Grudzinskas G, Gosden RG. Successful pregnancy after microsurgical transplantation of an intact ovary. The New England journal of medicine. 2008;359(24):2617-8.

112. Minton SE, Munster PN. Chemotherapy-induced amenorrhea and fertility in women undergoing adjuvant treatment for breast cancer. Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center. 2002;9(6):466-72.
113. Van Eyck AS, Jordan BF, Gallez B, Heilier JF, Van Langendonckt A, Donnez J. Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. Fertility and sterility. 2009;92(1):374-81.
114. Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Gadisseux E, Guiot Y, Yuan WY, Torre A, i sur. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. Reproduction. 2007;134(2):253-62.
115. Nottola SA, Camboni A, Van Langendonckt A, Demylle D, Macchiarelli G, Dolmans MM, i sur. Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. Fertility and sterility. 2008;90(1):23-32.
116. David A, Dolmans MM, Van Langendonckt A, Donnez J, Amorim CA. Immunohistochemical localization of growth factors after cryopreservation and 3 weeks' xenotransplantation of human ovarian tissue. Fertility and sterility. 2011;95(4):1241-6.
117. Soleimani R, Heytens E, Oktay K. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. PloS one. 2011;6(4):e19475.
118. Xia X, Yin T, Yan J, Yan L, Jin C, Lu C, i sur. Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis and Follicle Survival in Human Cryopreserved Ovarian Cortex Transplantation. Cell transplantation. 2015;24(10):1999-2010.
119. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. Journal of assisted reproduction and genetics. 2015;32(8):1167-70.
120. Andersen CY, Silber SJ, Bergholdt SH, Jorgensen JS, Ernst E. Long-term duration of function of ovarian tissue transplants: case reports. Reproductive biomedicine online. 2012;25(2):128-32.
121. Chambon F, Brugnon F, Greze V, Gremeau AS, Pereira B, Dechelotte P, i sur. Cryopreservation of ovarian tissue in pediatric patients undergoing sterilizing chemotherapy. Human fertility. 2016;19(1):23-31.
122. Ernst E, Kjaersgaard M, Birkebaek NH, Clausen N, Andersen CY. Case report: stimulation of puberty in a girl with chemo- and radiation therapy induced ovarian failure by transplantation of a small part of her frozen/thawed ovarian tissue. European journal of cancer. 2013;49(4):911-4.
123. Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. Fertility and sterility. 2013;99(6):1514-22.
124. Kyono K, Doshida M, Toya M, Sato Y, Akahira J, Sasano H. Potential indications for ovarian autotransplantation based on the analysis of 5,571 autopsy findings of females under the age of 40 in Japan. Fertility and sterility. 2010;93(7):2429-30.
125. Oktay KH, Yih M. Preliminary experience with orthotopic and heterotopic transplantation of ovarian cortical strips. Seminars in reproductive medicine. 2002;20(1):63-74.
126. 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. Fertility and sterility. 2010;94(6):2186-90.
127. Rosendahl M, Greve T, Andersen CY. The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: a review of the literature. Journal of assisted reproduction and genetics. 2013;30(1):11-24.
128. Amorim CA, Shikanov A. The artificial ovary: current status and future perspectives. Future oncology. 2016;12(20):2323-32.
129. De Vos M, Smitz J, Woodruff TK. Fertility preservation in women with cancer. Lancet. 2014;384(9950):1302-10.
130. Prasath EB, Chan ML, Wong WH, Lim CJ, Tharmalingam MD, Hendricks M, i sur. First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro

matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. Human reproduction. 2014;29(2):276-8.
131. Vanacker J, Luyckx V, Amorim C, Dolmans MM, Van Langendonckt A, Donnez J, i sur. Should we isolate human preantral follicles before or after cryopreservation of ovarian tissue? Fertility and sterility. 2013;99(5):1363-8 e2.
132. Soares M, Sahrari K, Amorim CA, Saussoy P, Donnez J, Dolmans MM. Evaluation of a human ovarian follicle isolation technique to obtain disease-free follicle suspensions before safely grafting to cancer patients. Fertility and sterility. 2015;104(3):672-80 e2.
133. Soares M, Sahrari K, Chiti MC, Amorim CA, Ambroise J, Donnez J, i sur. The best source of isolated stromal cells for the artificial ovary: medulla or cortex, cryopreserved or fresh? Human reproduction. 2015;30(7):1589-98.
134. Anderson RAe, Spears Ne. Cancer treatment and the ovary : clinical and laboratory analysis of ovarian toxicity. London: Elsevier; 2015.
135. Wallace WH, Smith AG, Kelsey TW, Edgar AE, Anderson RA. Fertility preservation for girls and young women with cancer: population-based validation of criteria for ovarian tissue cryopreservation. The Lancet Oncology. 2014;15(10):1129-36.
136. Chen H, Li J, Cui T, Hu L. Adjuvant gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy induced premature ovarian failure in premenopausal women. The Cochrane database of systematic reviews. 2011(11):CD008018.
137. Lobo RA. Potential options for preservation of fertility in women. The New England journal of medicine. 2005;353(1):64-73.
138. Blumenfeld Z. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embrya, oocytes, or ovaries. The oncologist. 2007;12(9):1044-54.
139. Saitta A, Altavilla D, Cucinotta D, Morabito N, Frisina N, Corrado F, i sur. Randomized, double-blind, placebo-controlled study on effects of raloxifene and hormone replacement therapy on plasma no concentrations, endothelin-1 levels, and endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2001;21(9):1512-9.
140. Behringer K, Wildt L, Mueller H, Mattle V, Ganitis P, van den Hoonaard B, i sur. No protection of the ovarian follicle pool with the use of GnRH-analogues or oral contraceptives in young women treated with escalated BEACOPP for advanced-stage Hodgkin lymphoma. Final results of a phase II trial from the German Hodgkin Study Group. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2010;21(10):2052-60.
141. Munster PN, Moore AP, Ismail-Khan R, Cox CE, Lacevic M, Gross-King M, i sur. Randomized trial using gonadotropin-releasing hormone agonist triptorelin for the preservation of ovarian function during (neo)adjuvant chemotherapy for breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2012;30(5):533-8.
142. Demeestere I, Brice P, Peccatori FA, Kentos A, Gaillard I, Zachee P, 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. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2013;31(7):903-9.
143. Del Mastro L, Boni L, Michelotti A, Gamucci T, Olmeo N, Gori S, i sur. Effect of the gonadotropin-releasing hormone analogue triptorelin on the occurrence of chemotherapy-induced early menopause in premenopausal women with breast cancer: a randomized trial. Jama. 2011;306(3):269-76.
144. Moore HC, Unger JM, Phillips KA, Boyle F, Hitre E, Porter D, i sur. Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy. The New England journal of medicine. 2015;372(10):923-32.
145. Masters GA, Krilov L, Bailey HH, Brose MS, Burstein H, Diller LR, i sur. Clinical cancer advances 2015: Annual report on progress against cancer from the American Society of Clinical Oncology. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2015;33(7):786-809.

146. 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. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2014;25(9):1719-28.
147. Martinez A, Poilblanc M, Ferron G, De Cuypere M, Jouve E, Querleu D. Fertility-preserving surgical procedures, techniques. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology. 2012;26(3):407-24.
148. Le Floch O, Donaldson SS, Kaplan HS. Pregnancy following oophoropexy and total nodal irradiation in women with Hodgkin's disease. Cancer. 1976;38(6):2263-8.
149. Brezina PR, Kutteh WH, Bailey AP, Ding J, Ke RW, Klosky JL. Fertility preservation in the age of assisted reproductive technologies. Obstetrics and gynecology clinics of North America. 2015;42(1):39-54.
150. Mahajan N. Fertility preservation in female cancer patients: An overview. Journal of human reproductive sciences. 2015;8(1):3-13.
151. Ronn R, Holzer HE. Oncofertility in Canada: gonadal protection and fertility-sparing strategies. Current oncology. 2013;20(6):e602-7.
152. Morice P, Haie-Meder C, Pautier P, Lhomme C, Castaigne D. Ovarian metastasis on transposed ovary in patients treated for squamous cell carcinoma of the uterine cervix: report of two cases and surgical implications. Gynecologic oncology. 2001;83(3):605-7.
153. 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. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2006;24(18):2917-31.
154. Salih SM, Albayrak S, Seo S, Stewart SL, Bradley K, Kushner DM. Diminished Utilization of in Vitro Fertilization Following Ovarian Transposition in Cervical Cancer Patients. The Journal of reproductive medicine. 2015;60(7-8):345-53.
155. Bath LE, Critchley HO, Chambers SE, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WH. Ovarian and uterine characteristics after total body irradiation in childhood and adolescence: response to sex steroid replacement. British journal of obstetrics and gynaecology. 1999;106(12):1265-72.
156. Noyes N, Knopman JM, Long K, Coletta JM, Abu-Rustum NR. Fertility considerations in the management of gynecologic malignancies. Gynecologic oncology. 2011;120(3):326-33.
157. Brezina PR, Zhao Y. The ethical, legal, and social issues impacted by modern assisted reproductive technologies. Obstetrics and gynecology international. 2012;2012:686253.
158. Pfeifer SM, Coutifaris C. Reproductive technologies 1998: options available for the cancer patient. Medical and pediatric oncology. 1999;33(1):34-40.
159. Shou H, Chen Y, Chen Z, Zhu T, Ni J. Laparoscopic ovarian transposition in young women with cervical squamous cell carcinoma treated by primary pelvic irradiation. European journal of gynaecological oncology. 2015;36(1):25-9.
160. Willows K, Lennox G, Covens A. Fertility-sparing management in cervical cancer: balancing oncologic outcomes with reproductive success. Gynecologic oncology research and practice. 2016;3:9.
161. Agorastos T, Zafrakas M, Mastrominas M. Long-term follow-up after cervical cancer treatment and subsequent successful surrogate pregnancy. Reproductive biomedicine online. 2009;19(2):250-1.
162. Kohler C, Marnitz S, Biel P, Cordes T. Successful Delivery in a 39-Year-Old Patient with Anal Cancer after Fertility-Preserving Surgery Followed by Primary Chemoradiation and Low Anti-Mullerian Hormone Level. Oncology. 2016;91(5):295-8.
163. Achille MA, Rosberger Z, Robitaille R, Lebel S, Gouin JP, Bultz BD, i sur. Facilitators and obstacles to sperm banking in young men receiving gonadotoxic chemotherapy for cancer: the perspective of survivors and health care professionals. Human reproduction. 2006;21(12):3206-16.

164. van Casteren NJ, van der Linden GH, Hakvoort-Cammel FG, Hahlen K, Dohle GR, van den Heuvel-Eibrink MM. Effect of childhood cancer treatment on fertility markers in adult male long-term survivors. Pediatric blood & cancer. 2009;52(1):108-12.
165. Hourvitz A, Goldschlag DE, Davis OK, Gosden LV, Palermo GD, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using cryopreserved sperm from men with malignant neoplasm yields high pregnancy rates. Fertility and sterility. 2008;90(3):557-63.

8. Životopis

Rođena sam 24. srpnja 1992. godine u Čakovcu. Od 1999. do 2007. godine pohađala sam Osnovnu školu Kotoriba. Po završetku osnovne škole, upisala sam Gimnaziju Josipa Slavenskog Čakovec koju sam pohađala do 2011. godine. 2011. godine upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu. Tijekom studiranja bila sam demonstrator na anatomiji, kliničkoj propedeutici i pedijatriji. Položila sam tečaj kardiopulmonalne reanimacije uz potporu automatskog vanjskog defibrilatora te tečaj neposrednih mjera održavanja života u organizaciji Hrvatskog društva za reanimatologiju. 2012. godine bila sam dobitnica Dekanove nagrade za najbolju studenticu druge godine. Aktivno govorim engleski jezik te razumijem njemački jezik.