

PRİMER OVER YETMEZLİĞİ OLAN HASTALARDA OVER DOKU VİTRİFİKASYONUNU TAKİBEN BAŞARILI FERTİLİTE SAĞLANMASI

Çeviri:Burcu Kısa Karakaya

Yazarlar: Nao Suzuki¹, Nobuhito Yoshioka¹, Seido Takae¹, Yodo Sugishita¹, Midori Tamura¹, Shu Hashimoto², Yoshiharu Morimoto², Kazuhiro Kawamura^{1,*}

Merkez:¹Obstetrik ve Jinekoloji Bölümü, St. Marianna Üniversitesi Tıp Okulu, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa 216-8511, Japonya. ²IVF Namba Kliniği, Osaka, Osaka 550-0015, Japonya.

* Yazışma Adresi, e-mail: kazuhiironanami@gmail.com

Çalışmanın Sorusu:Primer over yetmezliği (POY) olan hastaların infertilite tedavisi için inaktif foliküllerin in vitro aktivasyonunu (IVA) takiben vitrifikasyon kullanılarak over dokusunun dondurularak saklanması (kriyoprezervasyon) potansiyel bir yaklaşım mıdır?

Özet Cevap: IVA tedavisini takiben vitrifikasyon yaklaşımımız rezidü folikül içeren POY hastaları için potansiyel bir infertilite tedavisidir.

Şu ana kadar bilinenler: Akt (protein kinaz B) uyarıcıları [PTEN(10. Kromozomda silinen TEN sin homolojiye sahip fosfataz) inhibitörü ve fosfotidilinositol-3 kinaz(PI3 kinaz)uyarıcısı] in-vitro koşullardaki inaktif primordial folikülleri aktive eder ve ovarian fragmentasyon hippo sinyal yolağını bozarak folikül büyümesine yol açar. Biz POY hastalarını over vitrifikasyonu, fragmentasyonu ve ilaç tedavisinin kombinasyonu, takibinde ototransplantasyonu ile tedavi ettik, başarılı folikül büyümesi ve gebelikler rapor edildi.

Çalışma dizaynı, boyutu,süresi:12 Ağustos 2011 ve 1 Kasım 2013 arasında POY'li 37 infertil kadın üzerinde yapılan prospektif klinik çalışma olarak gerçekleştirilmiştir. Önceki yayından sonra 10 yeni hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

Katılımcılar/Materyal Metod: POY hastaları ilk olarak 1 yıldan fazla süredir adet görmeyen ve FSH serum değerleri >40 mIU/ml (n=31) olan hastalardan seçilmiş olup, daha sonra daha kısa süreli adet görmeyen hastaları da içerecek şekilde ölçütler adet görmeme süresi>4 ay,yaş <40 ve FSH serum değeri>35 mlU/ml (n=6) (ortalama değer 71.8 ± 30.8, aralık 35.3-197.6) olarak değiştirilmiştir. Laparoskopik cerrahi ile ooferektomi yapılarak over korteksleri vitrifikasyon için şeritler halinde çıkarıldı. Bazı parçalar dokusal olarak incelendi. Isıtma sonrası Akt uyarıcılarıyla 2 günlük kültürlenme öncesi 2-3 şerit küçük küplere bölündü. Yıkama sonrası laparoskopik cerrahi ile over küpleri fallopian tüplerin serozası altına nakledildi. Folikül büyümesi

ultrason ve serum östrojen seviyeleri ile izlendi. Olgun foliküllerden oositin geri alımı sonrası IVF gerçekleştirildi.

Ana Sonuçlar ve Şansın Rolü:37 hasta arasından %54 ünde histolojik olarak rezidü folikül vardı. Foliküllere sahip olan hastaların 20 sinin 9 unda otograft folikül büyümesi gözlenmiş ve 6 hastadan 24 folikül geri alınmıştır. IVF ve embriyo transferini takiben 4 hastanın 3 ünde serumda hCG saptanmış olup, biri düşükle ikisi başarılı doğumla sonuçlanmıştır. IVA başarısını öngörmek için; over kortekslerinin rutin histolojik analizlerinin ve POY'nin erken teşhisinden itibaren ooferektomiye kadar olan sürenin kısa tutulmasının geçerli parametre olduğunu bulduk.

Kısıtlılıklar, Sakınma nedenleri: Bulgularımız mevcut vitrifikasyon protokolünün over dokusunun dondurulup korunması için etkili olduğunu önermesine karşın, nakil sonrası folikül büyümesindeki vitrifikasyon potansiyeliyle ve yavaş donmayı karşılaştırmadık. Yüksek vaskülaritesi ve folikül büyümesinin izlenmesinin kolaylığı nedeniyle fallop tüpü serozasını otograft bölgesi olarak seçtik. Over dokuları için en iyi otografting bölge değerlendirilmesi için gelecekte ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. IVA tedavisi sonuçlarını öngörmek için, POY'deki rezidüel foliküllerin varlığını belirtecek biyolojik belirteçlerin tanımlanması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bulguların daha geniş göstergeleri: POY hastalarında over rezervi diğer bir adıyla rezidüel folikül havuzu yaşla birlikte azalmaya başlar. Eğer bir over POY un erken aşamalarında dondurulup korunursa, IVA tedavisi için nihai karar öncesi hastalara ek olarak non invaziv infertilite tedavileri uygulanabilir. Ayrıca, evlenmemiş POY hastalarında over dokularının dondurulup korunması çocuk sahip olmak istedikleri zamana kadar fertilitenin korunmasına izin verir.

Çalışma Fonu/Rekabet İlgisi: *Bu çalışma 'Grant-In-Aid for Scientific Research' tarafından desteklenmiştir.*

Klinik Çalışma Kaydı: UMIN000010828.

Anahtar Kelimeler:Ovarian doku vitrifikasyonu / infertilite tedavisi / primer ovarian yetersizliği / in-vitro aktivasyon /Akt stimülasyon

GİRİŞ: Ototransplantasyonu takiben over dokusunun dondurulup saklanması gonadotoksik tedavi alan kadınlarda fertilitenin korunumu için umut vaat eden bir yöntemdir. Bu prosedür aynı zamanda progresif over disfonksiyonundan muzdarip hastalar için yararlı olabilir. Preovulatuvar folikülden elde edilen olgun oositlerin depolanmasını gerektiren oosit dondurulmasıyla karşılaştırıldığında over dokusunun dondurulup korunması pre-pubertal kızlarda immatur oositlerin korunabilmesi açısından uygundur. Over transplantasyonu ve folikül büyümesini takiben erken foliküller fertilitenin korunumu için olgun oositlerin oluşumuna izin verecek preovulatuvar

foliküllere dönüşebilir. Over dokusunun dondurulup korunması ayrıca erken foliküller içindeki olgun olmayan birçok sayıdaki oositin depolanması avantajını taşımaktadır.

Dondurularak saklanan over dokularının ortotopik transplantasyonunu takiben Hodgins lenfomalı bir hastadan ilk başarılı canlı doğum sonrası, birçok üreme merkezi geçmişinde kanser olan hastalarda canlı doğumla sonuçlanan fertilitenin eski haline getirilmesi başarısını rapor etmişlerdir. Tüm bu vakalarda over dokularının dondurularak saklanmasında yavaş dondurma protokolleri uygulanmıştır.

Doku korunumu için yavaş dondurmanın daha erken kullanımını takiben vitrifikasyon yaklaşımında hızlı ilerlemeler, ekim öncesi embriyoların ve olgun oositlerin başarıyla dondurularak saklanmasına sebep olmuştur (Katayama et al., 2003; Kuwayama et al., 2005; Kuwayama, 2007). Vitrifikasyon yaklaşımının ilk avantajı, hücrelerde fiziksel ve mekanik hasara neden olduğu bilinen buz kristali oluşumunun meydana gelmemesidir. Ek olarak, vitrifikasyon, over dokularının dondurularak korunmasında kolay bir yol olması, çabuk olması ve özel ya da pahalı ekipman gerektirmemesinden dolayı cazip bir prosedürdür. Over dokularının yavaş dondurulması ve vitrifikasyonunu karşılaştıran birçok çalışma yürütülmüştür [reviewed in Amorim et al. (2011)]. Bununla birlikte, farklı ve birbirinden ayrılan vitrifikasyon protokollerinin kullanımı çelişkili sonuçlara neden olmuştur. Bu nedenle over dokularının infertilite tedavileri için dondurularak korunmasına yönelik optimal vitrifikasyon protokollerinin kurulması önem taşımaktadır.

Over işlevleri yaşla birlikte düşer ve bu durum azalan folikül sayısı ve menstrual döngünün kesilmesiyle karakterizedir. Primer over yetersizliği (POY) olan hastalarda, over foliküllerinin erken azalmasında, genetik, immünolojik, iyatrojenik ve diğer nedenler belirgindir. POY, kadınların %1'ini etkiler ve yüksek FSH düzeyleriyle, ve 40 yaşından önce adet kesilmesiyle kendini gösterir (Nelson, 2009). Bu hastalar folikül büyümesi ve ovulasyon olmadığından infertildir ve oosit bağıışı tek tedavi seçeneğidir. Menstrual döngünün durmasına rağmen, bazı hastalar uterus işlevlerini modüle etmeye yetecek miktarda östrojen ve progesteron üretmeyen küçük ovarian foliküllere sahip olabilir (De Vos et al., 2010).

Önceki raporumuz PTEN inhibitörlerinin ve fosfatidyinositol-3-kinaz (PI kinaz) uyarıcılarının inaktif murin ve insan primordial foliküllerinin in vitro koşullarda aktive etme becerisini göstermiştir (Li et al., 2010). Buna ek olarak gösterilmiştir ki over fragmentasyonu Hippo sinyal yolağını bozarak CCN büyüme faktörlerinin artan üretimine yol açmış ve folikül büyümesini sağlamıştır (Kawamura et al., 2013).

Over dokusunun dondurularak saklanmasını (cryopreservation), fragmentasyonunu ve in vitro koşullarda ilaç tedavisi (PTEN inhibitörü ve PI3K aktivatorü) yoluyla aktivasyonunu (IVA) ve takiben oto-naklini POY hastaları için infertilite tedavisi

olarak kombine ederek başarılı folikül büyümesi ve gebelikler rapor ettik (Kawamura et al., 2013).

Burada başarılı biçimde olgun oosit elde edebilmek için ;over dokusunun vitrifikasyon kullanılarak dondurulup saklanma protokollerimize ve POY hastalarımıza dair ayrıntılı bilgi sağlayıp, yöntemin infertilite tedavisinde potansiyel bir yaklaşım olarak ele alıp, genişletilmiş klinik çalışmanın sonucu hakkında bilgi veriyoruz.Buna ek olarak ooferektomi sonrası over kortekslerinin histolojik analizlerinin ve hastanın POY tanısı ile ooferektomi arasında kalan kısa sürenin IVA'nin başarısını tahmin etmede güvenilir parametreler olduğunu gösterdik.

MATERYAL VE METOD:

Hastalar

Mevcut klinik çalışmalar için hastalara bilgi verip izinlerini ve St. Marianna Üniversitesi İnsan Konulu Komitesi ile Japonya Obstetrik & Jinekoloji Topluluğu'nun onayını aldık.

POY hastaları ilk olarak 1 yıldan fazla süredir adet görmeyen ve FSH serum değerleri >40 mIU/ml ($n=31$) olan hastalardan seçilmiş olup, daha sonra daha kısa süreli adet görmeyen hastaları da içerecek şekilde ölçütler adet görmeme süresi >4 ay, yaş <40 ve FSH serum değeri >35 mIU/ml ($n=6$) (ortalama değer 71.8 ± 30.8 , aralık 35.3-197.6) olarak değiştirilmiştir. Anti-Müllerian hormon (AMH) düzeylerinin ölçümü için Aktif MIA/AMH EIA kiti veya AMH Gen II ELISA kiti (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) üretici protokolüne uygun olarak kullanılmıştır. AMH için tahlil Aktif MIA/AMH EIA kitinden AMH Gen II ELISA'ya değiştiği için, Aktif MIA/AMH EIA'dan elde edilen veri AMH Gen II ELISA için 0.14 çarpım faktörü kullanılarak (ng/ml) birimine çevrilmiştir. AMH Gen II ELISA'nın ve Aktif MIA/AMH EIA'nın aktif saptama birimleri sırasıyla 0.16 ng/ml ve 1.0 pmol/l'dir. Endometriozis varlığı ooferektomi için yapılan laparoskopik cerrahi sırasındaki pelvik gözleme dayalı olarak belirlenmiştir (Re-AFS: aşama I-III). Toplam olarak 37 hasta kayıt altına alınmış ve infertilite tedavisi için over dokusunun dondurularak korunmasını takiben IVA için hastalara ooferektomi yapılmıştır (Tamamlayıcı veri, Tablo SI).

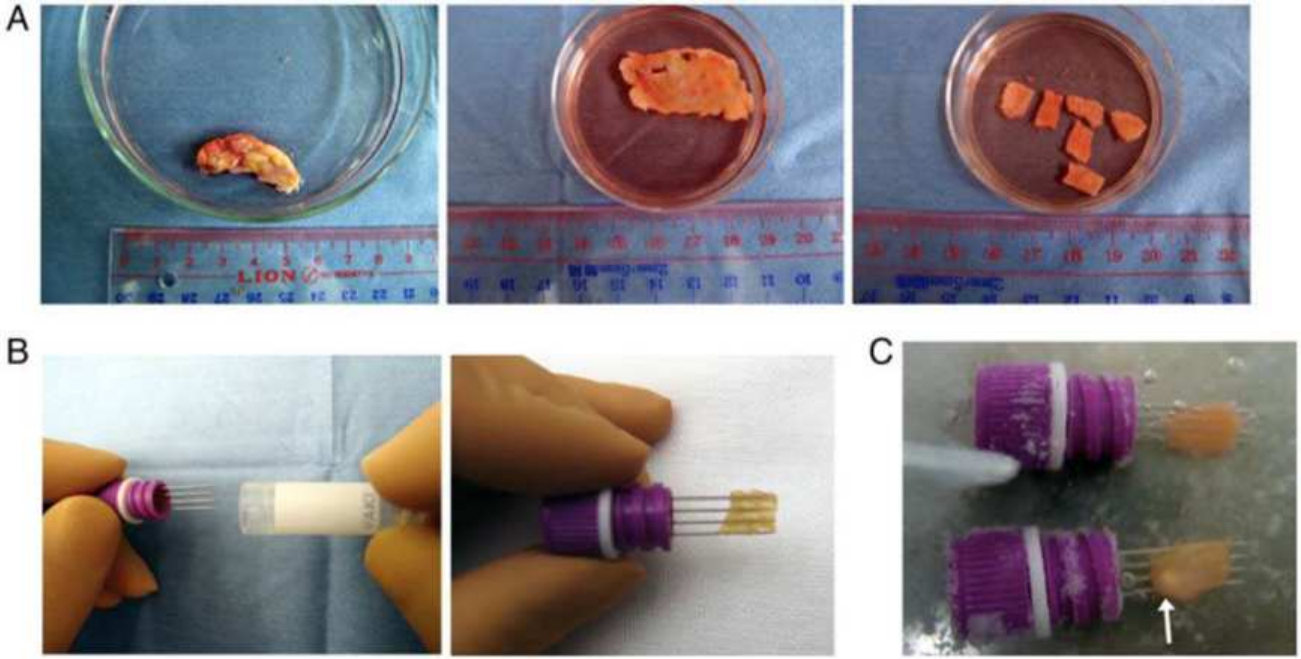
Over Dokusunun Dondurulup Korunması

Laparoskopik cerrahi altında, rezidüel foliküllere zarar vermektan kaçınmak için elektrokoteri hemostaz kullanmaksızın, tek ya da her iki overi çıkarmak için ooferektomi yapılmıştır. Çıkarıldıktan sonra medula açığa çıkacak şekilde overler hemen ortadan ikiye kesilmiştir (Fig. 1A, sol panel). Over, %10 Serum Substitute Tamamlayıcısı ilave edilmiş 37 C'de sıcak bir tabakta bulunan modifiye-HTF ortamına batırılmıştır (SSS; IrvineScientific, Santa Anna, CA, USA). Küçük rezidüel

foliküllerin büyük bölümü POY hastalarında overin korteks yüzeyinin 1-2 mm.lik derinliğinde bulunuyordu (Kagawa et al., 2009).Bu nedenle medulla, over kortekslerinin (1-2 mm kalınlığında) hazırlanmasından önce, küçük makaslarla diseksiyon yoluyla alındı (Fig. 1A, orta panel) ve küçük şeritler halinde (0.5–1 × 0.5–1 cm, 1–2 mm kalınlığında; Fig. 1A, sağ panel) kesildi. Bu adım yüzey kütle oranını maksimize etti ve şeritler Cryosupport'un paslanmaz iğnelere yüklenebilmesi için uygun oldu (Fig. 1B, sol panel). Over dokusunun dondurularak saklanabilmesi için daha önceden modifikasyonlarla tanımlanan vitrifikasyon metodu kullanıldı (Hashimoto et al., 2010; Suzuki et al., 2012).Over şeritler %20'lik (h/h) SSS (WS ortamı) ilave edilen TCM199 ortamında (Life Technologies, Foster City, CA, USA) yıkandı ve sonrasında sırayla oda sıcaklığındaki üç farklı vitrifikasyon çözeltisine konuldu. Şeritlerin önce %10'luk (h/h) ve 5 dakika da %20'lik (h/h) etilen glikol (EG, Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan) içeren TCM199 ortamında, takibende 5 dakika %20'lik (h/h) EG ve%20'lik (v/v) SSS içeren TCM199 ortamında dengeye gelmeleri beklendi. Ardından şeritler %35'lik (h/h) EG, %5'lik (a/h) polivinilpirrolidon (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ve 0.5 mol/l sükroz (Wako Pure Chemical Industries) içeren TCM199 ortamına, vitrifikasyonunu son aşamasından önce dengelenmeleri amacıyla, aktarıldı. Ovarian şeritler 15 dakika içinde, minimum ortam hacmi içeren sıvı nitrojene dikey olarak batırılmaları öncesi, dört ince paslanmaz iğne ve bir kriyojenik vialden oluşan Cryosupport'a (Fig.1) yüklendi. Donmuş şeritlerin birbirinden ayrı olarak kriyojenik viallere konulmasından sonra over dokuları kullanımlarına kadar sıvı azotta depolandı. Başarılı vitrifikasyon sonrası kortikal şeritler şeffaf bir görünüme bürünürken (Fig. 1C, üst plan) başarısız vitrifikasyon beyaz kriyohidratın kristal görünümüyle karakterize oldu (beyaz ok, Fig. 1C, alt plan).

Doku ısıtılması için, Cryosupport'a yüklenen over şeritleri 37°C'de 1 dakikalık ısıtma öncesi %20'lik SSS ve 0.8 mol/l sükroz içeren 5 ml'lik TCM199 ortamına batırıldı. Kriyoprotektanı çıkarmak için over şeritleri 3 dakika boyunca %20'lik SSS ve 0.4 mol/l sükroz içeren TCM199'de, takiben de iki defa 5 dakika boyunca WS ortamında oda sıcaklığında inkübe edildi. Isıtılan şeritler bir sonraki adıma kadar %10'luk SSS ilave edilmiş modifiye-HTF ortamında tutuldu.

Over doku hazırlanması, vitrifikasyonu ve ısıtma adımlarını gösteren videolar 'Supplementary Materials'da belirtilmektedir.



Figür 1: POY hastalarından alınan ovar dokularının vitrifikasyonu. Laparoskopik cerrahiyle ooferektomi sonrası, over korteksleri CryoSupport kullanılarak vitrifikasyon için küçük şeritler halinde parçalara ayrıldı (0.5-1 x 0.5-1 cm). (A) Over korteks dokularının vitrifikasyon için hazırlanması. Temsili görseller POY’li bir hastadan elde edildi. Sol panel: medulanın diseksiyonu öncesi bir over; orta panel: medulanın diseksiyonu sonrası bir over; sağ panel: vitrifikasyona hazır küçük over şeritleri. (B) Vitrifikasyon için kullanılan ‘CryoSupport’ cihazı. Sol panel: CryoSupport kriyojenik vial kapağına yerleştirilmiş dört paslanmaz iğneden oluşmuştur; sağ panel: POY hastasından alınan over kortikal şeritleri CryoSupport’a yerleştirilmiş durumda. İnceliğine bağlı olarak (1-2 mm), kortikal şerit şeffaf görünmekte. (C) POY hastalarının over kortikal şeritlerinin inisiyal vitrifikasyon prosedürü sonrası görünümü. Üst plan: Başarılı vitrifikasyon kortikal şeriti şeffaf görünümüyle karakterize olur; alt plan: başarısız vitrifikasyon beyaz kriyohidratın kristalize görünümüyle karakterize olur (ok).

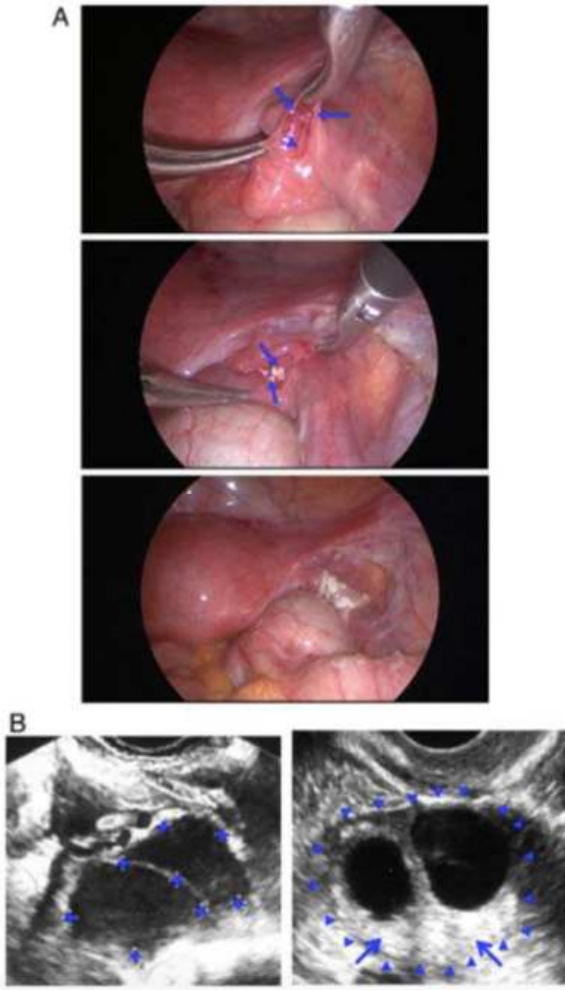
Over Kortekslerindeki Rezidüel Foliküllerin Histolojik Analizleri

POY hastalarının over kortekslerindeki rezidüel folikülleri tanımlamak için kortekslerin %10-20’si histolojik analize tabi tutuldu. Over korteks parçaları Bouin çözeltisinde 2 saat boyunca tutulup, parafine gömüldü, 4 µm kalınlığında bölündü, ve sonrasında da hematoksilin ve eosinle boyandı (H&E). Foliküller ışık mikroskobu altında belirlendi (Olympus, Tokyo, Japan). Bölümlerde folikül saptayabilseydik, kalan bölümleri gözlemeden analizleri sonlandırırđık. Rezidüel foliküllerin yokluğuna tüm bölümlerin incelenmesinden sonra karar verildi.

IVA: Over Fragmentasyonu, Akt Stimülasyonu ve Auto-transplantasyonu

Hastalar ilk ameliyatı atlattıktan sonra iki veya üç parça dondurularak saklanmış (kriyo-prezerve) over şeritleri, ikinci laparoskopik prosedür öncesi 2 gün boyunca ısıtıldı. Over şeritleri ince diseksiyon bıçağı kullanılarak daha küçük küplere (1-2 mm³) ayrıldı. Altı ila dokuz over küpü, hücre kültürü insertine konuldu (Millicell Hücre Kültürü Inserti, 12 mm, polikarbonat, 3.0 mm; Merck Millipore, Darmstadt, Almanya).

24 saat boyunca, 30 µm bpV (hopic), bir PTEN enzim inhibitörü (Merck Millipore), ve 150 µm/ml 740 YP (Tocris, Bristol, Birleşik Krallık), bir PI3 K uyarıcısı verilerek, bunu takiben sadece 740YP ile inkübasyonda, ve 24 saat de %10'luk (h/h) insan serumu albümin (Mitsubishi Tanabe Pharma, Tokyo, Japonya), 0.05 mg/ml askorbik asit, %1'lik (h/h) antibiyotik/antimikotik çözelti (Life Technologies) ve 0.3 IU/ml rekombinant FSH (GONAL-f; Merck Serono, Tokyo, Japonya) içeren Dulbecco'nun Asgari Yaşamsal Ortamı/F12 ortamında, 37°C'de %5'lik CO₂ içeren atmosferde tutuldu (Hashimoto et al., 2010). PTEN inhibitörünün ve PI3K aktive eden peptidin biyoaktiviteleri, önceden tanımlandığı gibi murin modellerde ön teste tabi tutulmuştur (Li et al., 2010). Oto-transplantasyon için over küpleri transplantasyonun hemen öncesinde ısıtılmış (37°C) çözeltide üç defa yıkandı. Fallopi tüplerinin tek ya da ikisinin serozasının altına over küplerinin transplantasyonu laparoskopik ameliyat ile gerçekleştirildi. Fallop tüplerinin serozasının alt yüzü, yüksek vaskülarizasyon, transvajinal ultrason izlemesine uygunluğu, ve preovulator foliküllerden oositin kolay alınabilirliği nedeniyle aşılama bölgesi olarak seçildi. Serozanın kesilmesi ve serozayla fallop tüpü arasında bir kese yapılmasından sonra, 20-100 over küpü yerleştirildi (Fig. 2A, üst ve orta paneller), ve takiben serozaya süturlar kullanılarak kapatıldı (Kawamura et al., 2013). Alternatif olarak yara, aşılama bölgesinden küp kaybı olmaması için, okside rejenerasyon selüloz (Interceed; Johnson & Johnson, Tokyo, Japonya) ile kaplandı (Fig. 2A, alt panel).



Figür 2:Laparoskopik cerrahiyle ovar parçalarının ototransplantasyonu ve aşılama sonrası folikül büyümesinin izlenmesi. (A) POY'li bir hastanın fallop tüpünün serozasının alt kısmına ovar parçalarının ototransplantasyonu. Üst panel: Serozanın kesilerek seroza (oklar) ile fallop tüpü (ok başı) arasında bir cep yapılması; orta panel: çoklu over küpleri (oklar) Fallop tüplerinin serozasının altına aşılama; alt panel: aşılama bölgesinden küp kaybı olmasını önlemek için yara okside rejenerasyon selüloz ile kaplandı. (B) Büyüyen foliküllerin temsili ultrasonik görüntüleri. Sol panel: POY hastasının Fallop tüpünün serozası altına aşılama over parçalarının (artı işaretleri) içinde büyüyen iki folikül. Folikül görüntüsü civardaki medulanın yokluğuyla karakterize olur; sağ panel: IVF için oosit alımı yapılan infertil bir hastanın kontrollü over stimülasyonunu takiben overinin içinde büyüyen iki folikül. Folikül görüntüsü büyüyen foliküle (oklar) bitişik medular dokunun varlığıyla ve overin net konturuyla karakterize olur (ok başları).

Folikül Büyümesinin ve IVF-Embriyo Transferinin İzlenmesi

Over küpleri fallopi tüplerinin serozasının altına oto-transplantasyonu sonrası, aşılama bölgesindeki folikül büyümesi haftalık ve ya iki haftada bir transvajinal ultrason ile birlikte büyüyen antral folikülleri saptamak amacıyla serum östrojen ve gonadotropin düzeyleri izlendi. POY olan hastalarda endojen gonadotropinin baskılanması, folikülogenez ve ovulasyonun başlamasında, muhtemelen rezidüel foliküllerin eksojen gonadotropin stimülasyonuna duyarlılığının eski haline gelmesi ve gonadotropinlere duyarsızlaşmasının hafiflemesi yoluyla oluştuğu ve önem taşıdığı rapor edilmiştir (Menon et al., 1983; Nelson et al., 1994; Ishizuka et al., 1997). Hastalara eksojen gonadotropin stimülasyonu öncesi yükselmiş endojen gonadotropinleri baskılamak için 0.625-1.875 mg östrojen (Premarin; Pfizer Inc.) verildi. Antral foliküller saptandığında, izleme sıklığı her 2-3 günde bir çıkarıldı ve foliküller çapı 16 mm'den büyük olana ve serum estradiol düzeyleri 200 pg/ml'yi aşana kadar, folikül büyümesi günlük 150-300 IU rekombinant FSH (Merck Serono) enjekte edilerek sağlandı. Bazı durumlarda, büyüyen folikül yaklaşık olarak 14 mm çapına ulaştığında prematüre LH dalgalanmasından kaçınmak için 0.25 mg'lık GnRH antagonisti, setroreliks asetat (Cetrotide, Merck Serono), günlük olarak uygulandı. Folikül çapı yaklaşık olarak 16 mm'ye ulaştığında oosit maturasyonu, tek seferlik 10000 IU hCG (Gonatropin; Asuka Pharma) enjeksiyonuyla başlatıldı. Birkaç hasta

kişisel zamanlama nedenlerine bağlı olarak, folikül çapı 13-15 mm'ye ulaştığında hCG aldı. 36 saat sonra oositler, ultrasonografik destekle, 19-20 G iğne kullanılarak transvajinal alım yoluyla, foliküllerden aspire edildi. Oosit alımı sonrası, enjekte edilen oositlerin 16 saat boyunca döllenme ortamında kültürlenmesi öncesi ICSI kullanılarak IVF gerçekleştirildi (Quinn's Advantage Fertilization HTF Universal Medium; CooperSurgical, Trumbull, CT). ICSI döllenme başarısını artırmak amacıyla kullanıldı.

Döllenmiş oositler hücre bölünmesi ortamına aktarıldı (Global, LifeGlobal, Tokyo, Japan) ve bir gün boyunca kültürlendi. Kültürün ikinci günündeki erken preimplantasyon embriyoları Cryotop (Kitazato BioParma; Kuwayama, 2007) kullanarak vitrifikasyon yoluyla dondurularak saklandı ve kullanıma kadar sıvı azotta tutuldu. POY hastalarının embriyo implantasyonunu iyileştirmek için embriyolar dondurularak saklandı ve ardından hastalara östrojen (Premarin and Estrana TAPE; Hisamitsu Pharmaceutical) ve progesteron (Progestone; Fuji Pharmaceutical) hormon desteğini takiben nakledildi. Östrojen ve progesteron uygulamalarının dozajı ve süresi, her hastanın endometrial kalınlık durumuna göre belirlendi. Embriyo transferi sonrası hastalara, erken gebeliği önlemek amacıyla, 6 hafta boyunca günlük 10 mg oral progesteron (Provera; Pfizer Inc.) ve haftalık 125 mg i.m. progesteron enjeksiyonu (Proge depot; Mochida Pharmaceutical) uygulandı. Gebeliğin tespiti ultrason yoluyla ve serum hCG düzeylerinin ölçümüyle yapıldı. Hasta gebe kaldıktan sonra fetüsün gelişimi rutin prenatal kontroller yoluyla izlendi.

İstatistiki Analizler

Gruplar arasında, POY tanısından ooferektomiye kadar geçen zaman farklılıklarını değerlendirmek için parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi ve eşik değeri (0 pg/ml) üzerindeki AMH konsantrasyonlarının frekanslarının farklılıklarını değerlendirmek için Fisher'in kesin testi kullanılarak istatistiki analiz yapıldı. Fisher'in kesin testi endometriyozisli hastaların oranını karşılaştırmak için kullanıldı. Ooferektomi yapılanda yaş için sonuçlar ortalama değer \pm standart sapma olarak sunulurken, tanıdan ooferektomiye kadar geçen süre verisi ise medyan (kartil) olarak ifade edildi.

SONUÇLAR :

POY Hastalarından Alınan Over Dokularının Vitrifikasyonu

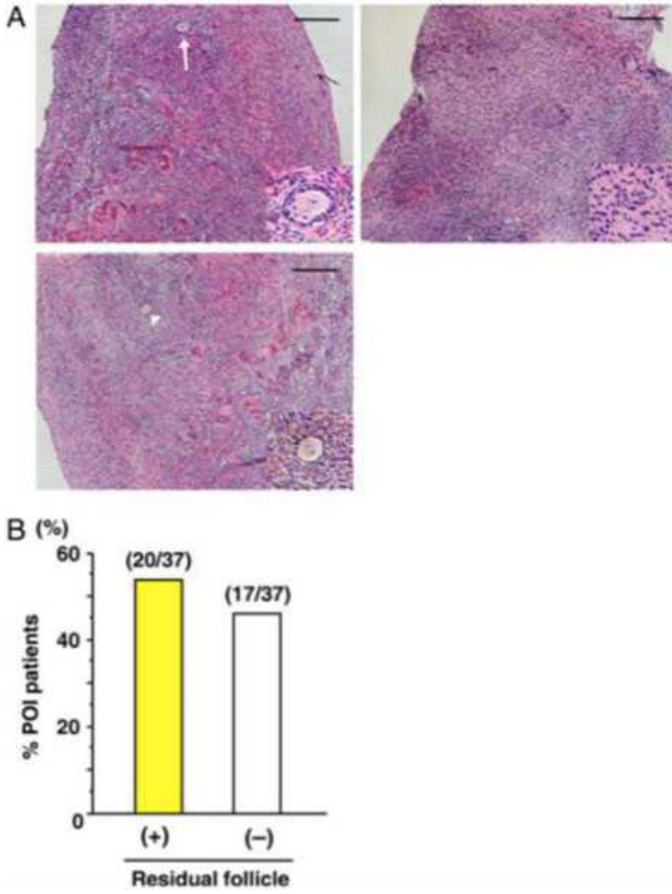
POY hastalarından alınıp hazırlanan over şeritlerinin sayıları fertilitte korunması için kanser hastalarının 'normal' overlerinden alınanlarla karşılaştırıldığında, sınırlı kalıyordu (POY: ortalama değer 7.2 ± 5.4 şerit, aralık: over başına 1.5 – 25, n=37; kanser hastası: ortalama değer: 19.2 ± 5.1 şerit, aralık: over başına 11 – 30, n=18).

Over Küplerinin Ototransplantasyonu ve Folikül Büyümesinin İzlenmesi

Fallop tüplerinin alt bölümündeki graflarda folikül büyümesi olan hastalarda, grafta büyüyen foliküller (Fig. 2B, sol panel, artı işaretleri) yakınlarında ve civarında bulunması gereken medulanın yokluğuyla karakterize olan benzersiz morfolojileriyle saptandı. Bu, kontrollü over stimülasyonunu takiben IVF için oosit alımı yapılan infertil hastaların overlerinde büyüyen foliküllerin rutin saptanmasıyla direk bir tezat içindedir. Over içindeki bu foliküller için (Fig.2B, sağ panel) bitişik medular yapı (oklar) ve overin hatları (ok başları) belirlenebilir.

Over Kortekslerdeki Rezidüel Foliküllerin Vitrifikasyon için Histolojik Değerlendirmesi

Önceki çalışmamızda (Kawamura et al., 2013) POY hastalarında IVA sonrası folikül büyümesi sadece histolojik analizlere dayanarak over kortekslerinde rezidüel folikül olan hastalarda saptandı. 10 hasta daha dâhil edildikten sonra bu yaklaşımın IVA neticesini öngörmede güvenilir bir parametre olup olmadığını yeniden değerlendirdik. Genel olarak rezidüel folikülleri değerlendirmek için her over şeridinin %10-%20'sini kullandık. Hastalar arasında toplam rezidüel folikül sayılarının farklı olmasına rağmen bazı hastalarda birkaç primordial, primer ve sekonder folikül bulabildik (Fig. 3A, sol üst ve alt paneller). Buna karşın hastaların %46'sında kapsamlı histolojik analizlere rağmen rezidüel foliküllerin olmadığı görüldü (Fig. 3A, sadece over korteksindeki bağlayıcı doku hücrelerinin varlığını gösteren sağ panel). Rezidüel foliküllü ve folikülsüz hastaların oranları Fig.3B'de gösterilmiştir. Histolojik analizlere dayanarak rezidüel folikülü olmayan 17 hastaya, talepleri üzerine ototransplantasyon gerçekleştirdik. Fakat bu hastaların hiçbiri yaklaşık 1 yıllık gözlem süresi içinde folikül büyümesi göstermedi. Bu nedenle histolojik analizlerin, IVA başarısının ön görülmesi açısından geçerli parametre olduğu netleşmektedir.



Figür 3: POY hastalarının over kortikal şeritlerindeki rezidüel foliküllerin değerlendirilmesi için yapılan histolojik analizler. (A) POY'li hastaların over kortikal bölümlerinin temsili H&E boyaması görüntüleri. İki sol panel: rezidüel foliküllü bir hasta; Sağ panel: rezidüel folikülleri olmayan bir hasta. Ok: sekonder folikül; ok başı: primordial folikül. İnsertlerde gösterilenler büyütülmüş görüntülerdir. Ölçek çubuğu, 200 μ m. (B) Rezidüel folikülleri olan ve olmayan POY hastalarının oranı. Parantez içindeki sayılar her gruptaki / toplam hasta sayısını temsil etmektedir.

IVA'yı Takiben Ototransplantasyon Sonrası Başarılı Folikül Büyümesi

Önceki makaledeki (Kawamura et al., 2013) 27 hastalık topluluğa 10 yeni hasta ekleyerek bulgularımızı 37 hasta üzerinde ifade ediyoruz. Yapılan histolojik analizler sonucu, 37 hastanın 20'sinin overinin rezidüel folikül içermekteydi. Foliküllü hastaların 20'sinin 9'u 6 hastadan alınan 24 oositle yapılan otograftta folikül büyümesi gösterdi. IVF'yi ve dört hastaya yapılan embriyo transferini takiben üç hastada serum hCG değerlerine dayanarak gebelikler tespit edildi; bu gebeliklerin biri düşük ve ikisi başarılı doğumla sonuçlandı.

IVA tedavisi sonrası doğan sağlıklı ilk erkek bebeğe (Kawamura et al., 2013) ek olarak, bir kız bebek (doğum ağırlığı: 2970 g; and Apgar skoru: 1 dk'da 8 / 5 dk'da 9; umbilikal arterdeki kan pH düzeyi: 7.27) 38 hafta ve 2 günlük gebelik sonrası sezaryen ile doğdu. Bebek normal fiziki özelliklere, plasentaya (443 g) ve umbilikal kordona sahiptir. Over parçalarının transplant edildiği bölgelerin kontrolünde fallop tüplerinin altında anormal büyüme olmadığını gösterdi.

Klinik veriye ve hasta geçmişine bağlı olarak IVA başarısını öngörmek için ek parametreler tanımlamayı denedik. Tablo 1'de gösterildiği gibi vitrifikasyon için oofektomi yapılan hastanın yaşı tüm gruplarda benzer olmasına rağmen, tanısından oofektomiye kadar olan süre IVA tedavisine yanıt veren rezidüel foliküllü hastalar

için kayda değer ölçüde kısa idi. 37 POY hastası arasında, sadece dokuzu saptanabilir serum AMH düzeyine ve olumlu IVA neticeleri olan hastalar da en yüksek serum AMH düzeylerine sahipti (Tablo 1). Rezidüel foliküllere sahip hastalar arasında, IVA tedavisine folikül büyümesi göstererek yanıt verenlerin serum AMH düzeylerinin medyan değeri, IVA tedavisine yanıt vermeyenlerinkinden yaklaşık 2.3 kat yüksekti (Tablo 1). Bununla birlikte, rezidüel foliküllerin histolojik varlığına ve yokluğuna sahip gruplar arasında (%20'ye karşın %29.4) eşik değerinin (0 pg/ml) üzerindeki AMH konsantrasyonlarının frekansında fark olmaması, histolojik analizler kullanarak yapılan taranmayla karşılaştırıldığında IVA başarısını öngörmeye serum AMH değerlerinin ikincil bir parametre olduğu öne sürmektedir. İlginç biçimde, rezidüel foliküllü ve IVA tedavisine folikül büyümesiyle yanıt veren hastalarda sıklıkla endometriozise rastladık (Tablo 1).

TARTIŞMA:

IVA ve otoplastik sonrası başarılı folikül büyümesine dayanan yukarıda tanımlanan vitrifikasyon protokolünü kullanarak işlevsel erken over folikülleri başarıyla dondurarak sakladık. Önceki yayıнымızda (Kawamura et al., 2013) anlatılanlara ek olarak 10 yeni hastayı kaydederek over kortekslerin ve hastaların POY tanısından ooferektomiye kadar olan sürelerinin geçmişinin IVA neticesiyle ilişkili olduğunu gösterdik.

Burada over dokusunun dondurularak saklanması için vitrifikasyona mukabil yavaş dondurmaya karşılaştırmamış olsak da bulgularımız mevcut vitrifikasyon protokolünün over doku korunumu için etkili olduğunu ortaya koyuyor. Over dokularının dondurularak saklanması kanser hastaları için fertilite korunumu bağlamında önem kazanan bir seçenek oluyor. Avantajları arasında prepubertal dönemde uygunluğu ve yüksek sayıda immatur oositin depolanması vardır; ek olarak over dokusunun dondurularak saklanması, olgun oositlerin ya da embriyoların dondurulması için gerekli olan ertelemeyi minimize eder. Over dokusunun vitrifikasyonu hemen zamanlanabilirken, olgun oositleri ve embriyoları elde etme amaçlı over stimülasyonu için çok zaman gereklidir (Loren et al., 2013). Kanser hastaları için over dokusunun dondurularak saklanması, kemo- veya radyo- terapinin zaman kaybetmeden başlatılmasına müsaade eder. POY durumunda, over rezervi, yani rezidüel folikül havuzu yaşla birlikte eksilmeye devam eder (Nelson, 2009). Bu, POY tanısından ooferektomiye kadar olan daha kısa süreli amenorenin IVA tedavisine daha olumlu yanıt vermesiyle ilişkilendirilen bulgularımıza uygundur. Eğer bir over erken yaşta dondurularak saklanırsa IVA tedavisi için nihai karar verilmeden önce hastalar ilave noninvaziv fertilite tedavisi deneyebilirler. Ek olarak, over dokularının dondurularak saklanması, oto-transplantasyon için bir karar verilmeden önce rezidüel foliküllerin varlığı ya da yokluğunu değerlendirecek histolojik analizlerin yapılması için yeterli

süre tanır. Ayrıca ikinci ameliyatın daha elverişli bir şekilde programlanabilmesi seçeneğini sunar.

Mevcut yaklaşım işlevsel olgun oositlerin infertilite tedavisi için başarılı biçimde dondurularak saklanması tasvir eder. Deneyimize dayanarak, dondurularak saklanma dengelemesi aşaması süresince vitrifikasyonda başarısızlıktan kaçınılması önemlidir. Sözü edilen başarısızlık, ince over katmanları hazırlanarak minimize edilebilir (Amorim et al., 2011). POY overlerinin vitrifikasyonunda, doku hazırlamasında özellikle ileri POY vakalarında görülebilen ovarian büzüşmeden kaynaklı pürüzlü over yüzeylerin varlığının sıklığına bağlı olarak özel çaba gösterilmelidir.

Dondurularak saklanmış over dokularının transplantasyonu için, over fossasının peritoneumu ve kalan over, aşılama için orjinal bölge (orthotropic) olarak seçilebilir. Ortotopik bölgenin orijinal nişi foliküller gelişim için kullanma ve doğal yoldan gebe kalma olasılığı avantajları vardır. Günümüzde dondurularak saklanmış over dokusunun ortotopik bölgelere ootransplantasyonu sonrası bir düzine canlı doğum rapor edilmiştir (Donnez et al., 2004). Heterotopik aşılama, minimal invaziv cerrahi girişim ve oosit alımı için kolay erişim sağlaması nedeniyle sıklıkla deri altı bölgesi seçilir (Demeestere et al., 2009). Bununla birlikte heterotopik aşılama başarılı gebelik için daha az etkilidir. Yakın geçmişte, yüksek konsantrasyonda proanjiyojenik büyüme faktörleri içeren ve pıhtı hücrelerinden zengin plazma eklenip neoanjiyogenez başlatılmasını takiben, dondurularak saklanmış over dokularının broad ligamentin arka tarafında yer alan ceplere aşılansından sonra, bir tane canlı doğum rapor edilmiştir (Callejo et al., 2013). Fallop tüplerinin serozasını yüksek vaskülarite ve folikül büyümesinin izlenmesinin kolaylığına bağlı olarak otografting bölgesi olarak seçtik. POY overlerin çıkarılma sırasındaki cerrahi kesimi sonrası minimal kanama gözlemlediğimizden dolayı, kalan overin transplant edilen dokuların revaskülarizasyonu için optimal olmadığını farz ediyoruz. Over dokuları için en iyi otografting bölgelerinin değerlendirilmesi için ileri çalışmalar gereklidir.

Tablo 1 : IVA tedavisi sonrası başarılı folikül büyümesini değerlendirmek için olası parametreler

Histolojideki rezidüel foliküller ve transplantasyon sonrası büyümesi (n)	Oofektomi yapılan yaş (y)	POY tanısından oofektomiye kadar olan zaman (y)	Oofektomi öncesi AMH'li hastaların sayısı (pg/ml)*	Endometriyozisli hastaların %'si (n)
Yok (17)	37 + 4.7 (28 – 43)	7.5 (2.5 – 12.1) ^a	5 (196)	6 (1) ^b

Mevcut ama büyüme yok (11)	37 + 4.9 (31 – 48)	5.0 (3.0 – 5.5)	1 (170)	0 (0)
Mevcut ve büyüme var (9)	39 + 4.4 (29 – 42)	1.0 (0.5 – 4.7) ^a	3 (390)	44 (9) ^b

Ooferektomi yapılan yaş verisi ortalama değer \pm standart sapma (aralık) iken POY tanısından ooferektomiye kadar olan süre medyandır (kartiller). Anti-Mullerian hormonu (AMH) için, saptanabilir AMH değerleri olan hastaların sayısı ve bunların serum AMH düzeylerinin medyan değeri gösterilmiştir.

*Veri (pM) Aktif MIA/AMH EIA'dan elde edilmiş olup AMH GEN II ELISA için kullanılan ng/ml birimine 0.14'lük çarpım faktörü kullanılarak çevrilmiş, ancak anlaşılabilirlik amacıyla pg/ml olarak gösterilmiştir. Gruplar arasında, POY tanısından overiektomiye kadar geçen zaman farklılıklarını değerlendirmek için parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi ve eşik değeri (0 pg/ml) üzerindeki AMH konsantrasyonlarının frekanslarının farklılıklarını değerlendirmek için Fisher'in kesin testi kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı. Fisher'in kesin testi endometriyozisli hastaların oranını karşılaştırmak için kullanıldı. ^{a,b}Aynı sütundaki farklı üst takılı değerler kayda değer derecede farklıdır.

Önceden belirtildiği gibi (Kawamura et al., 2013) IVA tedavisi için bilateral ooferektomiyle başlanmasını ama sonradan, IVA prosedürü için sadece az sayıda vitrifiye over şeritleri gerektiğinden ve çoğu hastanın tek overini tutma taraftarı olmasından dolayı, tek overin çıkarılmasını önerdik. Over şeritlerinin küplere kesilmesini (Hipo sinyal bozulması) ve IVA ilaçları kullanarak Akt stimülasyonunu takiben rezidüel folikül taşıyan POY hastalarının %45'inde çoklu antral folikül tespit edildi. Altı hastadan yirmi dört oosit alındı ve altı hastadan 15 embriyo elde edildi. Bunlar arasında dört hastaya embriyo transferi gerçekleştirilirken kalan hastalar için daha fazla oosit ve embriyo üretme çabaları sürdürülmektedir. Üç hasta yükselen serum hCG düzeylerine bağlı olarak gebe kaldı. Bunlar arasında biri düşük yaparken, ikisi doğum yaptı. İki sağlıklı çocuk doğmasına ve ilk çocuğun doğum sonrası 22 ay boyunca normal gelişim göstermesine rağmen, IVA prosedürünün güvenilirliğini kesinleştirmek için daha fazla sayıda takip çalışması gereklidir.

Oositlerin kalitesinin yaşla birlikte düştüğü iyi bilinmektedir (Broekmans et al., 2009) ve güncel IVA tedavisinin ağırlıklı olarak folikül büyümesini desteklediği ve yumurta kalitesinde yaşa bağlı olan azalmaya yönelik bir düzeltme yapmasının muhtemel olmadığını vurgulamak önemlidir. IVA tedavisine aday olan POY hastalarında oositlerde genetik hataların yaşa bağlı artışının minimize edilmesi için over dokularının genç yaşta dondurulup saklanması şiddetle önerilir.

Yarı nicel histolojik analizler IVA neticesiyle bağlantılı en yüksek ilişkiyi gösterir. Rezidüel foliküllerin varlığının öngörülebilmesine yönelik non-invaziv yaklaşımlar için verimiz yüksek serum AMH düzeylerinin daha iyi bir IVA neticesiyle ilişkili olduğunu ortaya koydu. Ancak tespit edilemeyen AMH düzeyleri olan bazı hastalar

yine de IVA tedavisine yanıt verebildi. İnsan overinde, AMH ekspresyonu primordial foliküllerde ihmal edilebilirdir, primer foliküllerin granuloza hücrelerinde düşüktür fakat sekonderin granuloza hücrelerinde, pre-antral ve çapı 4 mm'den küçük eşit antral foliküllerde yüksektir. Daha büyük antral foliküllerde AMH ekspresyonu aşamalı olarak yok olmuştur (Weenen et al., 2004). IVA tedavisi primordial, primer ve sekonder foliküllerin gelişimini teşvik ettiği için rezidüel primordial ve primer foliküllere sahip hastalar da IVA tedavisine yanıt verebilirler. Bu nedenle, bulgularımız serum AMH değerinin tedavinin neticelerine ilişkin en iyi prediktör olmadığına işaret eder.

POY tanısından ooferektomiye kadar olan sürenin kısalığı folikül büyümesi ihtimaliyle ilişkilendirilir. Östrojen yetmezliği semptomlarının tedavisi için POY hastaların çoğunlukla dönüştürülen östrojen ve progesteron replasmanı almış ve bu durum suni adete neden olmuştur. Sonuç olarak POY tanısından sonra adet görmeme süresinin tam olarak ne kadar süreceğini bilmek güçtür. Buradan hareketle, bu çalışmada, POY'nin tanısından ooferektomiye kadar olan süreyi parametrelerden biri olarak kullandık.

IVA tedavisine yanıt veren hastalarda ayrıca yaygın olarak endometriozise rastladık. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) endometrioziste anjiyojenezi destekleyecek en önde gelen proanjiyojenik faktördür (Taylor et al., 2002). İlgili olarak, aşılama öncesi peritoneal yaralar açarak (Donnez et al., 2004) ve pıhtıca zengin proanjiyojenik büyüme faktörleri içeren plazma kullanılarak (Callejo et al., 2013) over transplantasyon bölgelerinde neovaskülarizasyonun teşvik edilmesinin over aşılama başarısını artırdığı tespit edilmiştir. Endometriozisten alınan VEBF'nin daha iyi bir IVA sonucuna katkı sağlayacağı öne sürülebilir. Ancak burada inceleme altına alınan hastaların sayısı çok düşüktür ve anjiyojenik faktörlerin yararlı olup olmadığının değerlendirilmesi için IVA tedavilerinin gelecekteki yayılımları gereklidir. Ayrıca, POY'de rezidüel foliküllerin varlığının tespit edilmesi için ek belirteçlerin tanımlanması ve non-invaziv yaklaşımlar kullanılarak IVA tedavisinin sonucunu ön görmek için ileri vadeli çalışmalar gereklidir. Farklı oosit-türevli faktörler, GDF-9 dahil, BMP1 5 ve R-spondin2 (McGrath et al., 1995) pre-antral folikülleri çevreleyen somatik hücrelerin düşük sayısıyla karşılaştırıldığında daha büyük ebatlara sahip oositler olarak potansiyel adaylardır. Sistemik sirkülasyona salgılanan faktörlerin düşük 'sızıntısını' saptamak için ultra-duyarlı tahlillerin geliştirilmesi gereklidir.

Tamamlayıcı Veriler

Tamamlayıcı verilere <http://humrep.oxfordjournals.org> 'dan ulaşılabilir.

Teşekkür

Eleştirel okumaları yaptığı ve metni düzenlediği için Aaron J.W. Hsueh'e (Stanford Üniversitesi Tıp Okulu, Stanford, CA, USA), folikül büyümesini izlediği için Bunpei

Ishizuka'ya, ve teknik asistanlıklarından dolayı M. Hoshina'ya, K. Tarumi'ye, N. Takahashi'ye, Y. Sato'ya and R. Kawagoe'ye teşekkür ederiz.

Yazarların Roller

K.K. çalışmayı tasarlamış ve metni yazmıştır. N.S., N.Y., S.T., Y.S., M.T., S. H., Y.M. ve K.K. çalışmaları yürütmüştür. N.S. eleştirel tartışmalara ve metin düzenlenmesine katılmıştır.

Mali Kaynak

Bu çalışma 'Grant-In-Aid for Scientific Research' (Research B: 24390376, Challenging Exploratory Research: 24659722, and Innovative Areas, Mechanisms regulating gamete formation in animals: 26114510), 'The Smoking Research Foundation', ve 'The Takeda Science Foundation' tarafından desteklenmiştir. Yazarların hiçbiri arasında çıkar çatışması yoktur.

Çıkar Çatışması

Yazarların hiçbiri arasında çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

- Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011;23:160–186.
- Andersen CY, Kristensen SG, Greve T, Schmidt KT. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in young female oncological patients. *Future Oncol* 2012;8:595–608.
- Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev* 2009;30:465 – 493.
- Callejo J, Salvador C, Gonzalez-Nunez S, Almeida L, Rodriguez L, Marques L, Valls A, Laila JM. Live birth in a woman without ovaries after autograft of frozen – thawed ovarian tissue combined with growth factors. *J Ovarian Res* 2013;6:33.
- De Vos M, Devroey P, Fauser BC. Primary ovarian insufficiency. *Lancet* 2010; 376:911 – 921.
- Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update* 2009; 15:649 – 665.
- Donnez J, Dolmans MM. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue. *ClinObstetGynecol* 2010;53: 787–796.

- Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martínez-Madrid B, van Langendonck A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364: 1405 – 1410.
- Gamzatova Z, Komlichenko E, Kostareva A, Galagudza M, Ulrikh E, Zubareva T, Sheveleva T, Nezhentseva E, Kalinina E. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue—effective method of fertility preservation in cancer patients. *GynecolEndocrinol* 2014;30(Suppl 1):43–47.
- Grynberg M, Poulain M, Sebag-Peyrelevade S, le Parco S, Fanchin R, Frydman N. Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. *Fertil Steril* 2012;97:1260–1268
- Hashimoto S, Suzuki N, Yamanaka M, Hosoi Y, Ishizuka B, Morimoto Y. Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues. *Reprod Biomed Online* 2010; 21:501 – 509.
- Ishizuka B, Kudo Y, Amemiya A, Ogata T. Ovulation induction in a woman with premature ovarian failure resulting from a partial deletion of the X chromosome long arm, 46,X,del(X)(q22). *FertilSteril* 1997;68:931 – 934.
- Jeong K, Aslan E, Ozkaya E, Sonmezer M, Oktay K. Ovarian cryopreservation. *Minerva Med* 2012;103:37–46.
- Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2009;18:568–577.
- Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *FertilSteril* 2003; 80:223 – 224.
- Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *ProcNatlAcadSci USA* 2013;110:17474–17479.
- Kolp LA, Hubayter Z. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue: a procedure with promise, risks, and a need for a registry. *FertilSteril* 2011; 95:1879–1886.
- Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67:73 – 80.

- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11:300 – 308.
- Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan EK, Hsueh AJ. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:10280–10284.
- Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, Quinn G, Wallace WH, Oktay K. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013; 31:2500–2510.
- McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 131-136.
- Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005; 353:318 – 321.
- Menon V, Edwards RL, Lynch SS, Butt WR. Luteinizing hormone releasing hormone analogue in treatment of hypergonadotrophic amenorrhoea. *Br J Obstet Gynaecol* 1983; 90:539 – 542.
- Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 2009; 360:606 – 614.
- Nelson LM, Anasti JN, Kimzey LM, Defensor RA, Lipetz KJ, White BJ, Shawker TH, Merino MJ. Development of luteinized Graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1470–1475.
- Suzuki N, Hashimoto S, Igarashi S, Takae S, Yamanaka M, Yamochi T, Takenoshita M, Hosoi Y, Morimoto Y, Ishizuka B. Assessment of long-term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. *Hum Reprod* 2012; 27:2420 – 2429.
- Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955:89 – 100; discussion 118, 396 – 406.
- von Wolff M, Donnez J, Hovatta O, Keros V, Maltaris T, Montag M, Salle B, Sonmezer M, Andersen CY. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy—a technique in its infancy but already

successful in fertility preservation. *Eur J Cancer* 2009; 45:1547 – 1553.

- Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:77–83.