

BAŞLIK: LUTEAL VEYA FOLİKÜLER FAZDA ELDE EDİLEN OOSİTLERİN BENZER İN VİTRO MATÜRASYON HIZLARI, MEME KANSERİ HASTALARINDA ACİL FERTİLİTE KORUNMASI İÇİN ESNEK OLASILIKLAR SUNAR

ORJİNAL BAŞLIK: SIMILAR IN VITRO MATURATION RATES OF OOCYTES RETRIEVED DURING THE FOLLICULAR OR LUTEAL PHASE OFFER FLEXIBLE OPTIONS FOR URGENT FERTILITY PRESERVATION IN BREAST CANCER PATIENTS

YAZARLAR: M.Grynberg^{1,2,3}, M.Poulain^{4,5}, S. Le Parco⁶, C. Sifer⁷, R. Fanchin^{3,5,6}, N. Frydman^{4,5}

ENSTİTÜ

-¹Department of Reproductive Medicine, AP-HP, Hopital Jean Verdier, Avenue du 14 Juillet, 93140 Bondy, France

-²University Paris XIII, 93000 Bobigny, France

-³Unit Inserm U1133, Universite Paris-Diderot, 75013 Paris, France

-⁴Unit of Reproductive Biology, AP-HP, Hopital Antoine Beclere, Clamart F-92141, France

-⁵Univ Paris-Sud, Clamart F-92141, France

-⁶Department of Obstetrics-Gynecology and Reproductive Medicine, Hopital Antoine Beclere, Clamart F-92140, France

-⁷Department of Cytogenetic and Reproductive Biology, AP-HP, Hopital Jean Verdier, Avenue du 14 Juillet, 93140 Bondy, France

GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir ve üreme çağında görülen kanserlerin yaklaşık üçte birini oluşturur. Genç meme kanserli kadınların önemli bir kısmı tanı aldıklarında henüz ailelerini tamamlamamışlardır. Alacakları gonadotoksik kemoterapi ve tedavi sırasındaki fizyolojik yaşlanma nedeniyle ovaryan fonksiyon kaybı tehlikesi taşırlar. Sonuç olarak, 40 yaş altında invaziv meme kanseri tedavisi alan kadınların %10'undan azı tedavi sonrası çocuk sahibi olabilmektedir. Genç kanser hastalarının %50'den fazlası anne olma isteğinde olduğundan, üreme potansiyelinin korunması önemli bir sorun olmuştur. Son on yılda fertilitte korunması isteği dramatik olarak artmıştır ve günümüzde gonadotoksik tedavi alacak genç hastalar için standart bir özen vardır.

Şimdilerde, fertilitte prezervasyonu için en oturmuş yöntem, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sonrası oositlerin ve/veya embriyoların kriyoprezervasyonudur. Ancak, fertilitte koruma yöntemleri tümörün cerrahi olarak çıkarılması ve adjuvan kemoterapi öncesi yapılırsa bile, meme kanseri gibi hormona duyarlı tümörlerde, ovaryan hiperstimülasyon sırasında ulaşılan suprafizyolojik serum estradiol düzeyleri riskidüşünülmemelidir. Buna ilaveten, giderek daha fazla sayıda genç meme kanseri hastası, cerrahi öncesi acil neoadjuvan kemoterapi adaydırlar. Onkolojik açıdan enteresan olabilecek bu durum, tanı ile gonadotoksik tedavi arasını optimal prezervasyon için

daralttığından, fertilite korunmasını komplike hala getirir. Ayrıca folikül uyarılması sırasında tümör hala yerindedir.

Son zamanlarda, özellikle kontrollü hiperstimülasyonun uygun olmadığı genç hastalarda, eksojen FSH uygulamadan küçük antral foliküllerden kumulus-oosit kompleksinin (KOK) alınması önerilmiştir. Gerçekten in vitro matürasyon (IVM) sonrası oluşan metafaz II oositler dondurulabilir veya embriyo kriyoprezervasyonu için döllenebilirler. Günümüzde, bu yöntemin etkinliğini değerlendirmek zor olsa da, meme tümörü alınmasından önce hastalara daha güvenli bir yol olabilir. İlâveten, IVM ve ovaryan doku kriyoprezervasyonu birleştirilerek, fertilite koruma stratejileri güçlendirilebilir. Ancak siklusun hangi fazında alınan KOK'lerinin in vitro olgunlaşma kapasiteleri bilinmemektedir.

MATERYAL VE METOTLAR

Olgular

2011-2014 yılları arasında, neoadjuvan kemoterapi öncesi IVM kullanılarak acil fertilite korunmasına aday, 18-40 yaş arası 248 meme kanserli hasta prospektif olarak çalışıldı (**Şekil I**). Her iki gruptaki kadınlar çalışmaya alınma koşullarını sağlıyorlardı: i- invaziv meme kanseri tanısı; ii- neoadjuvan kemoterapi endikasyonu; iii-hormon tedavisi olmaması; iv-daha önce kemoterapi almamış olmak; v-her iki overin varlığı; vi-transvajinal ultrasonografilerde overlerin görünüyor olması; vii-her iki overi içeren 10'dan fazla küçük antral folikül (3-10mm çapında) olması. Parteneri olmayan hastalara oosit kriyoprezervasyonu önerildi. Nişanlı olan hastalara oosit veya embriyo dondurulması önerildi.

Hormon ölçümleri ve ultrasonografi bulguları

Onkofertilite konsültasyonundan önce her kadına serum AMH ve progesteron düzeyi ölçümü ile antral folikül değerlendirilmesi için transvajinal ultrasonografi yapıldı. Serum AMH düzeylerinde en düşük belirlenme limiti 0.13ng/ml idi ve lineerite 21ng/ml idi. Serum progesteron düzeyinde en düşük belirlenme limiti 0.1ng/ml idi ve lineerite 60ng/ml idi.

Ultrasonografi değerlendirmeleri iki ayrı operatör tarafından, ormon değerleri bilinmeden, 3.7-9.3MHz multi-frekans transvajinal prob ile yapıldı. 3-20mm ortalama çapı olan tüm foliküller değerlendirildi.

Luteal faz tanısı korpus luteum varlığı ve >3ng/ml serum progesteron düzeyi ile konuldu.

Teknik

Oosit toplanması, hCG enjeksiyonundan 36 saat sonra yapıldı. Orta derece sedasyon yapıldı. 19-gauge iğne ile vajinal ultrason eşliğinde, KOK (kumulus oosit kompleksi içeren foliküller, önceden ısıtılmış ve içinde 3ml 2UI/ml heparin içeren 15ml Nucleon tüpler içine alındı. Foliküler sıvı daha sonra kültür tabaklarında incelendi, KOK'leri ayrıldı ve 1ml IVM kültür ortamı olan ve %20 inaktive maternal serum, 0.75UI/ml FSH ve 0.75UI/ml LH Menopur ile zenginleştirilmiş kültür tabaklarına konuldu ve %5 CO² / %20 O² / N² gaz karışımında, 37⁰C ta inkübe edildi. 24 saat kültür sonrası KOK'leri hiyaluronidaz solüsyonu ile denude edildi ve nükleer oosit matürasyonu değerlendirildi. Hastanın seçimine dayanarak, matür metafaz II oositler aynı gün donduruldu veya ICSI ile fertilize edildi ve 24 sat sonra zigotlar donduruldu.

24 saat sonunda olgunlaşmayan oositler 24 saat daha kültürde tutuldular. 48 saat sonra metafaz II evresine ulaşanlar donduruldu. Olgunlaşmayanlar imha edildi.

Oosit toplama oranı

Foliküler ve luteal faz gruplarında immatür oosit toplama etkinliğini objektif değerlendirmek için toplanan KOKx100/antral folikül sayısı oranını kullandık.

Oosit/zigot kriyoprezervasyonu

Haziran 2011'den önce Fransa'da vitrifikasyon ruhsatsız olduğundan tüm matür oositler slow-freezing yöntemi ile donduruldular. Ocak 2012 den itibaren tüm oositler ve embriyolar vitrifiye edildiler.

Tüm zigotlar, vitrifikasyon yöntemi ile donduruldu. Vitrifikasyon, oosit veya zigot dondurulması için Vitrolife tarafından önerilen şekilde kapalı Rapid-i vitrifikasyon sistemi ve Blast-freeze medyumunu kullanılarak yapıldı.

Over dokusu dondurulması

Over dokusu dondurulması ve IVM yöntemlerinin her ikisini birden isteyen kadınlarda, oosit toplandıktan sonra laparoskopi yapıldı. Ultrasonografide en fazla antral folikül görülen overden bir parça makasla kesilerek alındı. Doku parçası, buz üzerinde 4°C ta Ferticult Hepes ile steril tabağa kondu. Makas ve bistüri yardımıyla 5x10mm fragmanlar hazırlandı. Her biri, buz üzerinde 4°C ta 800µl Ferticult Hepes medyum içeren kriyotüpler içine transfer edildi. Donnez tarafından önerilen yöntemle donduruldu.

İstatistik analiz

Veri dağılımı normal olduğunda, merkezi eğilim ve variabilite ölçümleri ortalama±SEM; normal kesin olmadığında median ve dağılım kullanıldı. Olgular, oositlerin toplandığı döneme göre "foliküler grup" veya "luteal grup" olarak ayrıldılar. Bu iki grup arasındaki devamlı değişkenler arasındaki farklar, uygun olduğunda Student's t veya Mann-Whitney testleri ile değerlendirildi. Her iki gruptaki kategorik değişkenler iki-tarafli Pearson χ^2 testi ile karşılaştırıldı. <0.05 P-değeri istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Hastalar ve hormon-folikül özellikleri

Hastaların ortalama yaşı 31.5±0.3 idi (**Tablo I**). Tüm hastalara invaziv duktal karsinom tanısı konmuştu ve hastaların 35 tanesinde (%18) nod invazyonu vardı. 150 hastada tümörde estrojen ve/veya progesteron reseptörü vardı. Her hastanın dosyası multidisipliner incelendikten sonra, neoadjuvan kemoterapi stratejisi onkolog tarafından belirlendi. Foliküler ovaryan durum analizinde, ortalama antral folikül sayısı 22.1±0.8 folikül ve serum AMH düzeyleri 22.1±0.33ng/ml bulundu.

Onfertilite danışmasından sonra, hastaların önemli bir kısmı (n=213) oositlerini dondurmaya, embriyo dondurmaya (n=35) tercih etti. Buna ilaveten 34 hasta, oosit dondurulmasıyla beraber over dokusu dondurulmasını istedi.

Oosit toplanmasının yapıldığı siklus dönemine göre IVM sonuçlarının karşılaştırılması

127 hastada foliküler fazda, 121 hastada luteal fazda immatür oosit toplanması yapıldı (Tablo II). Foliküler fazdaki 43 (% 33.8) hastada hCG günü dominant folikül vardı. Genel olarak oosit toplama oranı (ORR) %41.4 idi ve her iki grup arasında anlamlı farklılık yoktu. Elde edilen kumulus oosit kompleksleri (COC) sayılarında, 24 ve 48 saatlik kültürlerde olgunlaşma oranlarında, ve in vitro olgunlaşmış oosit oranlarında

foliküler ve luteal fazlar arasında anlamlı değişiklik yoktu. Foliküler fazdaki grupta dominant folikülden alınan olgun yumurtalar nedeniyle dondurulan yumurta sayısı daha fazlaydı, ancak bu olgun yumurtalar sonuçlara dahil edilmediler.

Enteresan olarak, hangi fazda olursa olsun IVM metafaz II oositlerin fertilizasyon kapasiteleri benzerdi ve sonuçta dondurulan zigot sayıları karşılaştırılabilirdi.

Her iki grupta işlem sonrası komplikasyon olmadı ve hastalar gecikme olmadan kemoterapilerine başlayabildiler.

TARTIŞMA

Çalışmamız, meme kanserli olgularda, siklusun her hangi bir fazında alınan immatür yumurtalarda kumulus-oosit komplekslerinin (KOK) IVM potansiyellerinin karşılaştırılabilir olup olmadığını araştırdı. Bu hastalarda fertilite koruması klasik olarak tümörün cerrahi olarak çıkarılması sonrası adjuvan kemoterapi başlamadan önceki 2-6 hafta arsında yapılır. Bu zaman aralığı, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sonrası oosit veya embriyo dondurulmasına izin verir. Ancak giderek daha fazla sayıda genç kadına, cerrahi öncesi neoadjuvan kemoterapi protokolleri önerilmektedir. Bu strateji genellikle pozitif lenf nodu olan veya 2c veya daha büyük tümörü olan kadınlara uygulanır, çünkü bu kadınlarda mikrometastaz olasılığı vardır. Neoadjuvan kemoterapi kullanımı en az iki şekilde fertilite korunmasını daha karmaşık hale getirir. Birinci olarak, tanı ve gonadotoksik tedavi arasındaki zaman optimal prezervasyon için çok kısadır. İkincisi, memede hala var olan tümör, eksojen FSH uygulaması ile serum estradiol düzeylerini düşürmek için aromataz inhibitörlerinin beraber kullanıldığı protokollerle bile kontrollü ovaryan hiperstimülasyon ile teorik olarak genişleme riski taşır. Bu yüzden neoadjuvan kemoterapi alacak kadınlara genellikle over dokusu dondurma önerilir. Ancak bu teknik, çok az sayıda gebelik bildirimini ile hala deneysel kabul edilmektedir. Ayrıca, henüz kanser tanısı almış bir kadına over dokusu elde etmek için yapılacak cerrahi müdahale bazen çok invaziv gelebilir.

Son zamanlarda uyarılmamış sikluslarda immatür oosit toplanması, eksojen FSH uygulamadan oosit ve/veya embriyo dondurulmasına olanak sağladığından, kadın fertilesini korumak için çekici bir olanak olarak sunulmuştur. Bazı yazarlar, vitrifikasyon öncesi olgunlaştırılan yumurtaların toplanan yumurta başına oosit matürasyon oranının, IVM öncesi dondurulan yumurta oranına göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle, bizim politikamız IVM oositlerin dondurulmasıdır. Bu çalışma, büyük bir seri meme kanserli hastada, gonadotoksik tedavi öncesi acil durumlarda fertilite korunması için, IVM'un güvenilir ve uygun bir yöntem olduğunu gösterir. Ayrıca ovaryan uyarılmaya gereksinim olmadığından, neoadjuvan kemoterapi alacak hastalar için de uygun olabilir.

Sonuçlarımız, geç foliküler fazda yumurta toplamak, daha fazla yumurta dondurulmasını sağlandığını gösterir. Bu, dominant folikülden olgun yumurta alınması nedeniyledir. Ancak Son ve arkadaşları, IVM sikluslarında en optimal sonucun, dominant folikül çapının ondört mm olduğu sikluslarda sağlandığını daha önce göstermişlerdir.

Sonuç olarak, ortalama 6.4 ± 0.3 oosit dondurulmuştur ki bu, Azim ve arkadaşları tarafından meme kanserli olgularda letrozol ile ovaryan uyarılma protokolü ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilir. Aslında uyarılma sonucu toplanarak dondurulan oositler, IVM sonrası dondurulanlara oranla daha iyi gelişme potansiyeline sahip

olabilirler. Netekim, bazı yazarlar IVM ile karşılaştırıldığında, ovaryan uyarılma sonrasında daha iyi gebelik ve canlı doğum oranları bildirmişlerdir.

Çalışmamızın ana bulgusu, immatür oosit toplamada, menstrüel siklusun fazından bağımsız olarak, sonuçların karşılaştırılabilir olmasıdır. Aslında elde edilen KOK ve ORR, foliküler ve luteal fazda benzerdi. Kanser hastalarındaki ORR, PCOS hastalarında bildirilenlerle benzerdi.

Menstrüel siklusun farklı fazlarında toplanarak dondurulan IVM oositleringerçek potansiyelini (yani, canlı doğum oranlarını) bilmiyoruz.

Ancak kanser hastalarında dondurulan oositlerin sonuçları ile ilgili ciddi veri eksikliği vardır. Kullanılan teknik ne olursa olsun, bu kadınlarda çok az sayıda canlı doğum bildirilmiştir. Bu nedenle, foliküler veya luteal fazda yapılan IVM işlemindeaynı etkinlik konuşulurken dikkatli olunmalıdır.

Bizim hastalarımızda ORR iyi olmasına rağmen, bazen düş kırıklığı olabilir. Bu nedenle hastalarla konuşurken bu sınırlamalar açıkça belirtilmelidir. Bu nedenle, fertilitte korunması etkinliğini arttırmak için hastalara immatür oosit toplanması ve ovaryan doku dondurulması beraber teklif edilmelidir.

Şu ana kadar, IVM sonrası oosit vitrifikasyonunu takiben sağlıklı hatalarda dört, kanser hastalarında bir gebelik bildirilmiştir.

Bu araştırma, menstrüel siklusun hangi fazı olursa olsun, küçük antral foliküllerden immatür oosit toplanmasının sonuçlarının benzer olduğunu gösterir. Sonunda, dondurulan matür oosit sayıları karşılaştırılabilirdi. Bu veriler, acil fertilitte korunması isteyen meme kanserli hastalara IVM yönteminin teklif edilebileceğini gösterir.