
PŘEHLEDNÉ REFERÁTY

Možnosti ochrany reprodukčních funkcí žen a mužů podstupujících léčbu cytotoxickými léky

Němec P.¹, Huser M.², Souček M.³

¹Revmatologická ambulance, II. interní klinika Lékařské fakulty Masarykovy Univerzity a FN u sv. Anny v Brně,

²Centrum asistované reprodukce CAR 01, Gynekologicko-porodnická klinika Lékařské fakulty Masarykovy Univerzity a FN Brno, ³II. interní klinika Lékařské fakulty Masarykovy Univerzity a FN u sv. Anny v Brně

Souhrn

Terapie závažných orgánových postižení u systémových chorob pojiva a systémových vaskulitid vyžaduje často použití cytostatik. K závažným nežádoucím účinkům těchto léků patří i nevratné poškození zárodečné tkáně gonád. Destrukce ovariálních folikulů vede k primární ovariální nedostatečnosti a k rozvoji následné neplodnosti s příznaky klimakterického syndromu. Destrukce varlat může vést až k trvalé azoospermii. Otázka ochrany reprodukčních funkcí žen a mužů není dosud zcela vyřešena. V následujícím textu je podán přehled současných možností ochrany reprodukčních funkcí žen a mužů podstupujících léčbu cytotoxickými léky, zahrnující moderní metody asistované reprodukce a nové možnosti farmakologické ochrany využívající analoga gonadoliberinu.

Klíčová slova: asistovaná reprodukce, GnRH analoga, neplodnost, systémové onemocnění pojiva

Summary

Němec P., Huser M., Souček M.: Ways of protection of reproductive functions of women and men undergoing treatment with cytotoxic drugs

Therapy of serious organ affections in connective tissue diseases and systemic vasculitides often requires the use of cytostatics. Irreversible damage of gonads' germinal tissue belongs to serious adverse effects of these drugs. Destruction of ovarian follicles leads to the primary ovarian insufficiency and to the development of subsequent infertility with symptoms of climacteric syndrome. Destruction of testicles can even lead to permanent azoospermia. The question of protection of reproductive functions of women and men has not been entirely answered yet. The overview of present ways of protection of reproductive functions of women and men undergoing the treatment with cytotoxic drugs including modern methods of assisted reproduction and new ways of pharmacological protection using gonadoliberin analogs is described in the text.

Key words: assisted reproduction, GnRH analogs, infertility, connective tissue disease

Čes. Reumatol., 16, 2008, No. 2, p. 81–88.

ÚVOD

Některá onemocnění, se kterými se revmatolog setkává ve své praxi, zejména systémová onemocnění pojiva nebo systémové vaskulitidy a současně terapie těchto onemocnění, jsou významnými faktory, které mohou způsobit úplnou ztrátu plodnosti. V terapii těchto onemocnění jsou často používána cytostatika. K závažným nežádoucím účinkům zejména alkylačních cytostatik patří i nevratné poškození zárodečné tkáně gonád. Na rozdíl od jiných rychle proliferujících tkání organismu, bývá poškození ovarií většinou nevratné, a to v důsledku předem determinovaného počtu ovariálních folikulů při narození. Destrukce folikulů vede k primární ovariální nedostatečnosti a k rozvoji následné neplodnosti s příznaky klimakterického syndromu. Rovněž poškození zárodečné tkáně varlat může být nevratné a může vést k trvalé azoospermii. Otázka ochrany reprodukčních funkcí žen i mužů není dosud zcela vyřešena.

Předčasné ovariální selhání (premature ovarian failure – POF) je častým dlouhodobým následkem cytostatické léčby. Klinicky je definováno jako vymizení menses po dobu delší než 6 měsíců u ženy mladší 40 let s elevací sérových hladin gonadotropinů (folikulostimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH) nad 20 IU/l). Z důvodu předem determinovaného počtu ovariálních folikulů při narození bývá poškození ovarií většinou nevratné. Destrukce folikulů vede k primární ovariální insuficienci a následné sterilitě s příznaky klimakterického syndromu (1). Riziko rozvoje POF u žen podstupujících léčbu cytotoxickými léky závisí zejména na věku pacientky, typu použitého gonadotoxického agens, použitém léčebném režimu a dosažené kumulativní dávce. Gonadotoxický účinek cytostatik je rozdílný. Mezi látky s nejsilnějším gonadotoxickým účinkem patří alkylační cytostatika (cyklofosamid, chlorambucil, busulphan). Uvádí se, že kumulativní dávka 20 g cyklofosfamidů je asociována s rozvojem POF až u 50 % dvacetiletých pa-

cientek s autoimunitním onemocněním podstupujících cytotoxickou léčbu (2–4). Naopak metotrexat vykazuje minimální nežádoucí vliv na folikulární aparát ovarií.

První práce popisující azoospermii po cytostatické terapii byla publikována již v roce 1948 (5). Od té doby byla publikována řada prací s touto problematikou, poukazující na negativní vliv cytotoxické léčby zhoubných nádorů na reprodukční funkce mužů. Některé práce rovněž prokázaly abnormality reprodukčních funkcí mužů se systémovými chorobami pojiva, například systémovým lupusem erythematodes, převážně související s cytotoxickou léčbou tohoto onemocnění (6, 7). Nejčastěji prokazovanými abnormalitami v souvislosti s cytostatickou léčbou jsou snížení počtu životaschopných spermií (oligozoospermie), případně jejich úplné chybění v ejakulátu (azoospermie), zvýšený počet abnormálních spermií (teratozoospermie) a snížení pohyblivosti spermií (asthenozoospermie).

Mechanismus nepříznivého účinku alkylačních cytostatik na ovariální a testikulární tkáň není dosud zcela objasněn. V případě ovarií se předpokládá zejména toxické působení na buňky membrana granulosa nebo oocyt, vedoucí ke konečné atrezii folikulu. Cyklofosfamid zasahující do buněčného cyklu převážně rychle se množících buněk, působí na buňky membrana granulosa, jejichž dělení probíhá pod kontrolou hypofyzárních gonadotropinů. Nepřímé důkazy naznačují, že právě vystupňovaná gonadotropní stimulace je předpokladem pro negativní působení cytostatické léčby na ovarium. Její podávání vede k rychlému zániku již zralých folikulů, následnému nástupu dozrávání ještě nezralých folikulů a urychlení deplece počtu primordiálních folikulů (8).

V experimentálních pracích na zvířeti byl opakovaně prokázán vliv cyklofosfamidu na snížení hmotnosti testes (9). U mužů léčených cyklofosfamidem bývají přítomny spolu se změnami tkáňe varlat i změny v hladinách gonadotropních hormonů a nižší sérové hladiny testosteronu (10). Předpokládá se, že cyklofosfamid inhibuje v testes tvorbu pohlavních hormonů (testosteronu, estradiolu) (11). Další z mechanismů negativního působení cyklofosfamidu na testikulární tkáň předpokládá inhibici procesu spermatogeneze na úrovni meiózy pohlavních buněk. V rámci zachování genové stability dochází ke zpomalení buněčného cyklu pohlavních buněk, což umožní aktivaci reparačních mechanismů poškozené DNA. V případě ireverzibilního poškození DNA dochází k aktivaci procesu programované buněčné smrti pohlavních buněk (12). Morfometrické studie, prováděné na krysách, prokázaly, že proces spermatogeneze je ovlivňován počínaje 7. dnem od jednorázového perorálního podání cyklofosfamidu

(100 mg/kg) (13). Ve studii Elangovan a spoluautorů, byl v experimentu na myších, prokázán negativní vliv cyklofosfamidu na hmotnost varlat, počet a motilitu spermií (14). Tyto změny korelovaly s prokazovanými změnami spermatogeneze, přičemž míra životaschopnosti spermií, stupeň poškození fertility a sérová hladina testosteronu byla závislá na dávce cyklofosfamidu. Dávka cyklofosfamidu, odpovídající 750 mg/m² používaným v humánní medicíně, vedla většinou k ireverzibilní zástavě spermatogeneze. Snížení hmotnosti varlat pravděpodobně odráží inhibici procesu spermatogeneze a snížení počtu dozrávajících spermií (15). Pokles motility spermií a poškození jejich DNA může být způsobeno oxidativním stresem, spojeným s produkcí reaktivních forem kyslíku, navozenou cyklofosfamidem (16). Negativní působení cytotoxických léků, ale rovněž i ionizujícího záření na proces spermatogeneze, je pravděpodobně zprostředkováno působením na prekurzorové kmenové buňky (spermatogonia). Dochází nejen k destrukci kmenových buněk, ale rovněž, v případě přeživších spermatogonií, k inhibici procesu jejich dozrávání (17). Přesto jsou spermatogonia, na rozdíl od dalších zástupců procesu spermatogeneze (spermatocytů, spermatidů), relativně rezistentní vůči působení cyklofosfamidu, snad kromě vysokých dávek odpovídajících 750 mg/m² používaným v humánní medicíně.

Proces spermatogeneze je ovlivňován řadou endokrinních (extratestikulárních) a parakrinních (intratestikulárních) signálů. Intratestikulární signály jsou reprezentovány zejména pohlavními hormony (testosteronem, estradiolem) produkovány intersticiálními Leydigovými buňkami varlete. Předpokládá se, že cyklofosfamid způsobuje destrukci Leydigových buněk, což spolu s možným negativním vlivem cyklofosfamidu na expresi některých genů enzymů, podílejících se na procesu syntézy testosteronu, vede k poklesu jeho sérové hladiny a negativnímu ovlivnění procesu spermatogeneze.

Moderní metody asistované reprodukce (AR) mohou dnes nabídnout ženám i mužům se závažnými systémovými chorobami pojiva šanci na vlastní rodinu. V posledních letech jsou usilovně vyvíjeny i postupy k prevenci neplodnosti již před zahájením a v průběhu cytostatické léčby.

Ochrana reprodukčních funkcí žen Kryokonzervace gamet

Rutině používanou metodou, která vede k záchráně fertility u žen, je kryokonzervace oocytů před zahájením cytostatické léčby. Jedná se o metodu intenzivně rozvíjenou zejména v posledním desetiletí, nicméně jejímu rutinní rozšíření do běžné praxe zatím brání poměrně malá úspěšnost při dosažení fertility z kryokonzervovaných oocytů

(18). Přestože významných úspěchů v této oblasti již bylo dosaženo, je třeba dořešit ještě mnoho otázek při standardizaci procesu kryokonzervace i rozmrazování lidských oocytů (19). Intenzivně jsou zkoumány technické postupy při kryokonzervaci a rozmrazování, které by byly schopny předejít poškození obalu oocyty (zona pelucida hardening) a sítě mikrotubulů (meiotic spindle), která je nezbytná k dokončení meiózy maturovaného oocyty (20). Významným limitujícím faktorem tohoto postupu je nutnost podstoupit hormonální ovariální stimulaci s následným odběrem oocytů, což posouvá možnost zahájení cytostatické terapie o 3–4 týdny. Hormonální stimulace může navíc zhoršit průběh estrogendependentního onemocnění, jakým je kupříkladu systémový lupus erythematosus. Současnou podmínkou pro použití této metodiky je i relativně dobrý zdravotní stav pacientky.

Kryokonzervace embryí

Další klinicky běžně používaný postup, který může vést k zajištění fertility ženy před zahájením cytostatické léčby je provedení *in vitro* fertilizace IVF-cyklu s oplozením a následnou kryokonzervací embryí po jejich kultivaci v podmínkách *in vitro* (21). Tato metoda je technicky již dobře zvládnuta a zavedena do běžné praxe, nicméně její využití je limitováno několika požadavky. Významně limitujícím požadavkem, podobně jako při předchozím postupu ochrany reprodukčních funkcí ženy, je podmínka relativně dobrého zdravotního stavu pacientky, který dovolí posunutí zahájení cytostatické léčby o 3–4 týdny s nutností podstoupit hormonální ovariální stimulaci s následným odběrem oocytů. I v tomto případě je nutné počítat s možným negativním vlivem hormonální stimulace na aktivitu systémového onemocnění pojiva. Dalším převážně legislativním a etickým omezením je existence partnera pacientky a jeho písemný souhlas s provedením IVF-cyklu a poskytnutí jeho spermií k oplození získaných oocytů. Proto tento postup není vhodný u velmi mladých pacientek, které nemají stálého partnera.

Kryokonzervace ovariální tkáně

Metodou volby u pacientek, které nesplňují některé z výše uvedených podmínek je možnost kryokonzervace ovariální tkáně před zahájením cytostatické léčby. Výhodou této metody je její rychlá proveditelnost bez nutnosti odložit zahájení léčby systémového onemocnění pojiva. Další nespornou výhodou této metody je rovněž fakt, že pacientka nemusí podstoupovat hormonální ovariální stimulaci, která může negativně ovlivnit průběh systémového onemocnění. Pro pacienty s nově diagnostikovaným systémovým onemocněním pojiva se závažným orgánovým postižením, kteří vy-

žadují včasné zahájení léčby cytotoxickými léky, je kryokonzervace ovariální tkáně vhodnou alternativou prevence ovariálního poškození či selhání (22, 23). Cílem procesu je nabídnout pacientce po úspěšném ukončení léčby základního onemocnění, bez známek jeho aktivity či recidivy, možnost reimplantace takto zachované ovariální tkáně do malé pánve či na jiné místo lidského těla (heterotopická autotransplantace).

Technika odběru a kryokonzervace ovariální tkáně je již poměrně dobře propracovaná. Základní limitací metody je ovšem proces *in vitro* maturace nezralých oocytů v takto získané ovariální tkáni (24). Pokroky v kryobiologii ovariální tkáně, vyzkoušené na laboratorních zvířatech, odstartovaly mnoho projektů bank ovariální tkáně, které mohou urychlit rozvoj této prozatím experimentální metody v běžné klinické praxi (25). V pilotní studii Hovatty a Newtona, publikované v roce 1996, autoři vyzkoušeli kryokonzervační postupy s využitím různých kryoprotektantů a potvrdili, že ovariální tkáň je odolná k procesu hlubokého zamražení (26–28). Později Newton a zejména Gook prokázali, že právě primordiální folikuly jsou nejvíce odolné vůči celému procesu zamražení a rozmražení a následně získali maturované oocyty, které pocházely ze zamražené a následně rozmražené ovariální tkáně implantované imunodeficitním myším (29, 30).

Doposud byla ovariální tkáň úspěšně zamražená a následně transplantována kromě myši také u ovce, králíka a kosmana (31–33). Tyto studie ukázaly jasnou korelaci mezi poškozením tkáně a délkou trvání ischemie při odběru a zpracování ovariální tkáně. Pokles počtu primordiálních folikulů v důsledku hypoxie je odhadován na 50–65 %. Podle některých studií jsou buňky ovariální tkáně schopny tolerovat ischemii minimálně po dobu 3 hodin. V současnosti jsou zkoumány možnosti využití látek, zejména antioxidantů (kyselina askorbová) či růstových faktorů (VEGF), které by dokázaly snížit procento buněk poškozených kryokonzervací (34).

Tyto úspěchy vedly k vypracování kryokonzervačních protokolů v humánní medicíně. V současné době jsou využívány dva základní typy kryokonzervačních protokolů podle typu použitého kryoprotektantu. K hodnocení úspěšnosti kryokonzervačních postupů jsou využívány metody histologického vyšetření tkáně, zejména procento přežívání primordiálních folikulů a procento fibrotizace ve štěpu po transplantaci.

V roce 2004 byl popsán první případ, kdy došlo po ortotopické autotransplantaci zamraženého vzorku ovariální tkáně k vývoji euploidního embrya a v zápětí k porodu dítěte u pacientky léčené pro lymfom (35). U pacientky byla však pozorována sporadická ovulace, a proto je možné, že

gravidita vznikla z oocytu ovaria ponechaného *in situ*. V roce 2005 byla publikována práce izraelských autorů, ve které bylo dosaženo gravidity a porodu zdravého dítěte po ortotopické autotransplantaci ovariální tkáně a následném IVF cyklu u 28leté ženy tři roky po ukončení chemoterapie pro non-Hodgkinský lymfom (36).

Odběr ovariální tkáně se provádí laparoskopicky v krátkodobé celkové anestezii. Více než 90 % buněk ovariálního kortexu tvoří primordiální folikuly obklopené vrstvou granulózových buněk a vazivové tkáně. Většina folikulů je umístěna v oblasti do 1 mm pod kortikálním epitelem ovaria. Z důvodu zachování růstového potenciálu folikulů je nutné odebrat několik plátků ovariálního kortexu v tloušťce 1–3 mm a zachovat tak integritu těchto doprovodných struktur ovariální tkáně. Neoptimálnější z hlediska dalšího zpracování se jeví odběr 2–3 plátků tkáně z obou ovarii, které jsou před kryokonzervací zpracovány na menší kousky o velikosti 10 x 3 x 2 mm.

Techniky autotransplantace ovariální tkáně u člověka lze rozdělit na ortotopické a heterotopické. Ortotopická technika znamená uložení štěpu do malé pánve do peritoneální duplikatury, ovarické fossy či přímo do hormonálně inaktivního ovaria, případně mnohočetné injekce suspenze malých kousků ovariální tkáně do ovariálního kortexu (36, 37). Některými autory bylo prokázáno, že peritoneální tkáň se lépe hodí k transplantaci než jiné oblasti (sval, podkoží), protože zde došlo k menší ztrátě počtu primordiálních folikulů (38). Nevýhodou ortotopické transplantace je větší invazivnost převážně laparoskopického, někdy i laparotomického výkonu. Méně invazivní metodou bez nutnosti celkové anestezie je heterotopická autotransplantace ovariální tkáně do podkoží předloktí nebo podbříšku. V humánní medicíně bylo dosaženo vývoje diploidního embrya v autotransplantátu, zatím bez dosažení gravidity po embryotransferu (35).

Klinickým důkazem funkce autotransplantátu ovariální tkáně je obnovení menstruačního cyklu u pacientky s iatrogenní amenoreou po cytostatické terapii. Podle doposud publikovaných prací došlo k obnovení menstruace v intervalu 6–12 měsíců po transplantaci. Nejjednodušší možností sledování funkce ovariálního štěpu je monitorování poklesu hladin ovariálních steroidů a gonadotropinů, případně sledování nových markerů a ukazatelů ovariální funkce a rezervy – inhibinů (INH A, INH B) a antimüllerianského hormonu (AMH). Jejich hladiny začnou v krvi stoupat o několik týdnů dříve, než je v krvi detekován signifikantní pokles hladiny gonadotropinů.

Odborná debata o výhodách a potencionálních rizicích této metody vedla k vytvoření expertní pracovní skupiny a doporučeného postupu Ame-

rické společnosti pro reprodukční medicínu (ASRM) publikovaného v roce 2004 (39). V těchto doporučeních je mimo jiné konstatováno, že se doposud jedná o experimentální metodu, má být vyžadován písemný souhlas pacienta a souhlas etické komise a je nezbytná mezioborová spolupráce. V Evropě v dubnu roku 2004 vstoupila v platnost směrnice Evropské unie č. 2004/23/EC o darování, zprostředkování, testování, zpracování, ochraně, skladování a šíření lidských tkání a buněk. Tato směrnice stanovuje standardy a podmínky pro pracoviště, které se touto problematikou zabývají.

Farmakologická ochrana GnRH analogy

Všechny výše popsané metody vycházejí s rozvinutých metod AR a využívají zkušeností s kryokonzervací lidských gamet, embryí či ovariální tkáně. Zásadní otázkou však zůstává možnost prevence ovariálního poškození agresivní cytotoxickou léčbou.

Opakovaně bylo pozorováno, že dívky léčené pro nádorové onemocnění v prepubertálním věku, nevykazují ve srovnání s dospělými ženami, jejichž zárodečné buňky podléhají cyklické hormonální stimulaci a proliferaci, tak častá poškození ovariálních funkcí (40).

Základní vlastností oocytů je jejich rozsáhlý germinální potenciál a dělicí schopnosti, které je předurčují k tomu, aby byly jednou z prvních obětí agresivní cytotoxické terapie. Na druhé straně proces folikulogeneze a maturace oocyty je vysoce hormonálně závislý a je ovlivňován řadou endokrinních i parakrinních signálů. Mezi hormony, které hrají významnou roli v těchto procesech patří FSH a LH, produkované v adenohipofýze pod regulační kontrolou gonadoliberinu (GnRH). Působením výše uvedených hormonů je možné oocyt zastavit ve vývoji na úrovni primordiálních folikulů, jako je tomu v prepubertálním období vývoje ženy. Takto inhibované oocyt pak vykazují výrazně nižší senzitivitu na cytotoxickou léčbu, jak bylo již potvrzeno v pilotních studiích izraelských autorů Blumenfelda a kol. (41). Hormonální suprese ovarii tedy vychází z hypotézy, že ovarium je v klidovém stádiu méně citlivé na cytotoxické léky. Tato hypotéza byla již ověřena experimentálně a také několika pilotními studiemi na lidských ovarii (42). K útlumu činnosti vaječnic dochází až po několika dnech. Přesný mechanismus této ochrany však není znám, protože primordiální folikuly, které tvoří rozhodující část folikulární rezervy, nejsou pod vlivem gonadotropinů (41). Jedním z předpokládaných mechanismů protektivního působení GnRH analogů je jejich inhibiční vliv na produkci FSH. Alkylační cytostatika vedou k nárůstu destrukce a apoptózy dozrávajících a diferencujících se folikulů, což je spojeno se snížením produkce pohlavních hormonů

a některých růstových faktorů ze superrodiny TGF- β peptidů, například AMH, inhibinu, aktivinu, produkovaných dozrávajícími folikuly. Snížená plazmatická koncentrace těchto látek pak vede zpětnovazebně k nárůstu produkce FSH, jehož vyšší hladina stimuluje klidové folikuly k diferenciaci a dozrávání. Ty se následně stávají náchylnějšími k toxickému působení alkylačních cytostatik. Další z možných mechanismů protektivního účinku GnRH analogů může být jejich inhibiční vliv na utero-ovariální perfuzi a snížení kumulativní expozice ovarií cytotoxickým lékům. Další z mechanismů účinku těchto léků připouští existenci GnRH receptorů v lidských pohlavních orgánech, jejichž stimulace může vést k inhibici apoptózy dozrávajících folikulů.

Léky, schopné zastavit cyklickou sekreci FSH a LH, jsou analoga GnRH v dlouhodobém kontinuálním podání. Běžně se používají v protokolech ovariální stimulace při IVF (43). Důkaz o protektivním účinku současného podávání analogů GnRH při cytotoxické terapii z důvodu maligních, ale i systémových autoimunitních chorob, byl již opakovaně podán a v současné době probíhá řada prospektivních randomizovaných studií, které si kladou za cíl potvrdit efektivitu tohoto postupu (44). Výsledky ukazují efektivitu této metody zejména u mladších pacientek. Určitou nevýhodou použití GnRH analogů je přechodné zvýšení sekrece gonadotropinů po dobu 7–10 dnů od podání, tzv. flare-up fenomén, při němž je naopak senzitivita ovariální tkáně na chemoterapii zvýšena. Metodou volby je v tomto případě použití GnRH antagonistů, jejichž aplikace v kombinaci s GnRH analogem, zajistí ovariální supresi do 4–5 dnů (45). V praxi tedy tento postup zahrnuje aplikaci GnRH analogu (Diphereline 3 mg) v podobě intramuskulární injekce a následnou aplikaci GnRH antagonisty (Cetrotide 3 mg) opět v podobě intramuskulární injekce 6 hodin po aplikaci GnRH analogu. Tento postup zajistí ovariální inhibici a možnost zahájení agresivní cytotoxické léčby po 4–5 dnech. K udržení ovariální suprese je nezbytné opakované podání GnRH analogu (Diphereline 3 mg) po dobu terapie základního onemocnění v jednoměsíčních intervalech. Po ukončení této léčby dochází k obnovení ovariálních funkcí a menstruační obvykle během 5 měsíců.

Na našem revmatologickém pracovišti je tento postup realizován ve spolupráci s Centrem asistované reprodukce CAR 01 Gynekologicko-porodnické kliniky Lékařské fakulty Masarykovy Univerzity a Fakultní nemocnice Brno, ve kterém probíhá výzkumný projekt ochrany reprodukčních funkcí u žen podstupujících chemoterapii pro hematologickou malignitu (OvarOnko), který si klade za primární cíl ověření protektivního podává-

ní GnRH analog za účelem ochrany ovariální tkáně v průběhu tří různých režimů chemoterapie u pacientek s Hodgkinovým lymfomem ve fertilním věku (45–48).

Ochrana reprodukčních funkcí mužů Kryokonzervace spermatu

Za nejúčinnější postup ochrany reprodukčních funkcí chlapců a mužů je v současné době považován odběr, zamražení a dlouhodobé uskladnění spermatu. V Centru asistované reprodukce Gynekologicko-porodnické kliniky Lékařské fakulty Masarykovy Univerzity a FN Brno byl program zamražení a dlouhodobého uskladnění spermatu zahájen v roce 1995 (5). K odběru spermatu je využívána pouze masturbace. Elektroejakulace případně chirurgický odběr spermatu je využíván výjimečně. K uchování zamraženého spermatu je používáno komerční médium Medi-Cult, IVF Science. Sperma se před zamražením smíchá s konzervačním médiem a aplikuje se do kryotub Nunclon o objemu 2 ml. Zamražení probíhá buď pomocí programovatelného zařízení Planer Kryo F10 standardní křivkou ochlazování, nebo bez použití přístroje, pouze v parách dusíku. Proces transportu v termoboxu je validován. Kryotuby jsou uloženy v kapalně fází dusíku při teplotě – 196 °C, ve skladovacím kontejneru LS 4800, Tailor Wharton HARSCO s kontrolérem hladiny a alarmem. Kapacita jednoho kontejneru je 4800 ampulí o objemu 2 ml. Je zajištěno automatické doplňování tekutým dusíkem ze skladovacích kontejnerů. Kryobanka je zabezpečena proti vniknutí nepovolených osob systémem elektronického zabezpečení.

Základním požadavkem programu kryokonzervace spermatu je existence speciální kryobanky pro dlouhodobé a bezpečné skladování spermatu. Její provoz vyžaduje přesnou databázi pacientů a vlastní dokumentaci. Důležitým momentem je srozumitelné informování pacientů o možnostech a podmínkách zamražení spermatu a jeho použití v budoucnosti. Délka uchování zamraženého spermatu v kryobance je prakticky limitována pouze její skladovací kapacitou.

V letech 1995 až 2005 bylo do Centra asistované reprodukce Gynekologicko-porodnické kliniky FN Brno odesláno ke kryokonzervaci spermatu 521 mužů a chlapců ve věku od 14 do 64 let před terapií maligního nádoru chemoterapií, aktinoterapií nebo orchiektomií. V práci Crhy a spoluautorů bylo provedeno hodnocení spermiogramu podle manuálu Světové zdravotnické organizace (5). Jako hranice normospermie byla stanovena koncentrace 20 mil./ml, progresivní pohyb 50 % a normální morfologie spermií 50 %. Nejčastější diagnózou byl zhoubný nádor varlete (45,7 %), Hodgkinův lymfom (16,5 %), leukemie (8,4 %), non-Hodgkinův lymfom (7,1 %) a zhoubné nádor-

ry kosti a chrupavky (6,5 %). Ostatní nádorová onemocnění se v souboru vyskytovala sporadicky. Oligozoospermie byla přítomna u 54,1 % pacientů zejména u pacientů se zhoubným nádorem varlete. Azoospermie byla přítomna u 10 % mužů, nejčastěji u pacientů s leukemií. Asthenozoospermie byla přítomna u 60,8 % případů, zejména u pacientů se zhoubným nádorem varlete. Kryokonzervované sperma využilo celkem 30 mužů (6,4 %). V Centru asistované reprodukce podstoupilo léčbu celkem 22 párů (73,3 %). Ve všech případech bylo pro oplození oocytů využito metody intracytoplazmatické injekce spermie. Bylo dosaženo celkem 7 klinických těhotenství (31,8 %) a 5 porodů.

Farmakologická ochrana GnRH analogy

Práce, která sledovala prevalenci poškození reprodukčních funkcí u 240 děvčat a chlapců mladších 15 let postupujících kombinovanou chemoterapií (protokol MOPP) pro Hodgkinův lymfom, prokázala azoospermii u 83 % chlapců, ale vývoj ireverzibilního POF pouze u 13 % děvčat (49). Na základě těchto výsledků, vysoké prevalence azoospermie u prepubertálních chlapců, nelze očekávat signifikantní efekt terapie GnRH analogy v ochraně fertility u chlapců a mužů (50).

Alternativní možnosti ochrany reprodukčních funkcí mužů

V odborné literatuře se objevují ojedinělé práce prokazující protektivní efekt některých méně běžných postupů před gonadotoxickým účinkem alkylačních cytostatik.

Ve studii čínských autorů byl sledován protektivní efekt čaje Yukmijihwang-tang (YJT) na ochranu reprodukčních funkcí laboratorních krys, kterým byla podávána alkylační cytostatika (cyklofosfamid) (51). YJT je vícesložkový bylinný čaj používaný k léčbě mužské neplodnosti v tradiční čínské medicíně. 8 týdnů starým krysám (Wistar) bylo podáváno buď placebo, nebo pouze cyklofosfamid, nebo cyklofosfamid a YJT. Cyklofosfamid byl podáván prvních 7 dní v dávce 20 mg/kg/den, p.o.. YJT byl perorálně podáván po dobu 56 dní v dávce 1 g/kg/den. Ve skupině léčené cyklofosfamidem bylo ve srovnání s kontrolní skupinou zaznamenáno signifikantní snížení hmotnosti testes, snížení počtu a motility spermii. Naopak ve skupině léčené cyklofosfamidem + YJT bylo ve srovnání se skupinou léčenou pouze cyklofosfamidem zaznamenáno signifikantní zvýšení těchto ukazatelů. Ve skupině, ve které byl podáván YJT, bylo dále zaznamenáno snížení známek oxidativního stresu v testikulární tkáni. Narozdíl od skupiny léčené pouze cyklofosfamidem neklesala exprese transkripčního faktoru (cAMP-responsive element modulator – CREM), který bývá široce exprimován v mužských zárodečných pohlavních buňkách a je nezbytný pro

postmeiotickou diferenciaci pohlavních buněk. Podle autorů tato práce poukázala na možný protektivní vliv čaje YJT při ochraně reprodukčních funkcí v experimentu na krysích samcích léčených gonadotoxickou léčbou.

Ve studii indických autorů byl sledován protektivní efekt kyseliny lipoové (kyseliny thioctové) (52, 53). Dvěma skupinám krysích samců (Wistar) byl podáván perorálně cyklofosfamid v dávce 15 mg/kg jednou týdně po dobu 10 týdnů. Jedné z těchto skupin byla současně intraperitoneálně podávána kyselina lipoová v dávce 35 mg/kg jednou týdně po dobu 10 týdnů vždy 24 hodin před podáním cyklofosfamidu. Studie zahrnovala i kontrolní skupinu s a bez předléčení kyselinou lipoovou. Ve skupině léčené cyklofosfamidem bylo zaznamenáno signifikantní snížení počtu a motility spermii a zvýšení počtu abnormálních spermii. Ve skupině léčené cyklofosfamidem bylo dále při fluorimetrické analýze DNA zaznamenáno výraznější poškození DNA spermii v důsledku zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku vlivem podávání cyklofosfamidu. V této skupině byly rovněž zaznamenány změny aktivity a hladin některých enzymatických antioxidantů (superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza) a neenzymatických antioxidantů (glutathion, ascorbát, alfatocopherol). Naopak ve skupině předléčené kyselinou lipoovou bylo zaznamenáno zvýšení počtu a kvality spermii, snížení produkce reaktivních forem kyslíku a menší rozsah poškození DNA. Autoři se domnívají, že podání kyseliny lipoové před aplikací cyklofosfamidu má protektivní efekt na reprodukční funkce krysích samců.

KOMENTÁŘ

Terapie závažných systémových chorob pojiva a systémových vaskulitid vyžaduje často použití cytotoxických léků. K nežádoucím účinkům těchto léků patří i nevratné poškození zárodečné tkáně gonád způsobující trvalou neplodnost. Na rozdíl od jiných rychle proliferujících tkání organismu bývá poškození ovarií většinou nevratné, a to v důsledku předem determinovaného počtu ovariálních folikulů při narození. Destrukce folikulů vede k primární ovariální nedostatečnosti a k rozvoji následné neplodnosti s příznaky klimakterického syndromu. Rovněž poškození zárodečné tkáně varlat může být nevratné a může vést k trvalé azoospermii.

Moderní metody AR mohou dnes nabídnout ženám se závažnými systémovými chorobami pojiva šanci na vlastní rodinu. Metody kryokonzervace oocytů a embryí před zahájením cytotoxické léčby základního onemocnění jsou však zatíženy řadou problémů. Oocyt je vzhledem ke své stavbě při

kryokonzervaci velmi zranitelný. Po rozmražení dochází k oplození a dosažení těhotenství jen výjimečně (54). Proces zmražení a rozmražení velmi dobře snáší jen kvalitní embrya. Neopomenutelnou limitací těchto postupů je nutnost podstoupit hormonální ovariální stimulaci s následným odběrem oocytů, což posouvá možnost zahájení cytostatické léčby o 3–4 týdny a může negativně ovlivnit průběh systémového autoimunitního onemocnění. Limitující podmínkou je tedy i relativně dobrý zdravotní stav pacientky.

V posledních letech je věnována maximální pozornost výzkumu možnosti kryokonzervace ovariální tkáň. Tato metoda odstraňuje některé limitující faktory metod kryokonzervace oocytů a embryí, zejména nutnost oddálení zahájení cytotoxické terapie. Vlastní protokol kryokonzervace je již dobře propracován, ale využití zamraženého materiálu a proces *in vitro* maturace je stále ve stadiu experimentu. Vyřešení problémů *in vitro* maturace oocytů by znamenalo zásadní přínos pro zachování plodnosti u žen ve fertilním věku podstupujících léčbu cytotoxickými léky.

Zásadní otázkou zůstává možnost prevence trvalého ovariálního poškození agresivní cytostatickou léčbou. Slibnou metodou se ukazuje být hormonální ovlivnění aktivity ovarií s využitím GnRH analogů. Jejich působením je možné oocyty zastavit ve vývoji na úrovni primordiálních folikulů. Takto inhibované oocyty pak vykazují výrazně nižší senzitivitu na cytotoxickou léčbu.

Za neúčinnější a prakticky jediný používaný postup ochrany reprodukčních funkcí chlapců a mužů je v současné době považován odběr, zmražení a dlouhodobé uskladnění spermatu ve specializovaných spermabankách. Tento postup ochrany reprodukčních funkcí chlapců a mužů nemá prakticky žádné limitace.

Povinností revmatologů, ale i jiných odborníků setkávajících se s touto problematikou je zajistit léčeným pacientkám a pacientům se systémovými chorobami pojištění dostatečnou kvalitou života, z daného pohledu zejména nabídnout šanci na založení vlastní rodiny.

*Podpořeno grantovým projektem
IGA MZ ČR – NR/8469-3*

LITERATURA

1. **Laml T, Schulz-Lobmeyr I, Obruca A, et al.** Premature ovarian failure: etiology and prospects. *Gynecol Endocrinol* 2000; 14: 292–302.
2. **Blumenfeld Z.** How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes, or ovaries. *Oncologist* 2007; 12: 1044–54.
3. **Blumenfeld Z, Eckman A.** Preservation of fertility and ovarian function and minimization of chemotherapy-in-

duced gonadotoxicity in young women by GnRH-a. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 34: 40–3.

4. **Blumenfeld Z, Shapiro D, Shteinberg M, et al.** Preservation of fertility and ovarian function and minimizing gonadotoxicity in young women with systemic lupus erythematosus treated by chemotherapy. *Lupus* 2000; 9: 401–5.
5. **Crha I, Ventruba P, Žáková J, et al.** Kryokonzervace spermatu před gonadotoxickou léčbou – 11 let zkušenosti. *Čes Gynek* 2007; 72: 320–6.
6. **Silva CA, Hallak J, Pasqualotto FF, et al.** Gonadal function in male adolescents and young males with juvenile onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002; 29: 2000–5.
7. **Rueffer U, Breuer K, Josting A, et al.** Male gonadal dysfunction in patients with Hodgkin's disease prior to treatment. *Ann Oncol* 2002; 13: 333.
8. **Ataya K, Rao LV, Laurence E, et al.** Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide induced ovarian follicular depletion in Rhesus monkeys. *Biol Reprod* 1995; 52: 365–72.
9. **Trasler JM, Hales BF, Robaire B.** Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats: effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol Reprod* 1986; 34: 275–83.
10. **Hoorweg-Nijman JJ, Delemarre-vande-Wall HA, De-Wall FC, et al.** Cyclophosphamide-induced disturbance of gonadotropin secretion manifesting testicular damage. *Acta Endocrinol* 1992; 126: 143–8.
11. **Ghosh D, Das UB, Ghosh S, et al.** Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. *Drug Chem Toxicol* 2002; 25: 281–92.
12. **Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, et al.** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 39–85.
13. **Matsui H, Mitsumori K, Yasuhara K, et al.** Morphological evaluation of cyclophosphamide testicular toxicity in rats using quantitative morphometry of spermatogenic cycle stages. *J Toxicol Sci* 1995; 20: 407–14.
14. **Elangovan N, Chiou TJ, Tzeng WF, et al.** Cyclophosphamide treatment cause impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology* 2006; 222: 60–70.
15. **Katoh C, Kitajima S, Saga Y, et al.** Assessment of quantitative dual-parameter flow cytometric analysis for the evaluation of testicular toxicity using cyclophosphamide and ethinylestradiol treated rats. *J Toxicol Sci* 2002; 27: 87–96.
16. **Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL et al.** DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen duality. *J Nadrol* 2000; 21: 33–44.
17. **Kangasniemi M, Huhtaniemi I, Meistrich ML.** Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of a spermatogonia in the irradiated LBNF1 rat. *Biol Reprod* 1996; 54: 1200–8.
18. **Boldt J, Cline D, McLaughlin D.** Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. *Hum reprod* 2003; 18: 1250–5.
19. **Quintans CJ, Donaldson MJ, Bartolino MV, et al.** Birth of two babies oocytes that were cryopreserved in a choline-based freezing medium. *Hum Reprod* 2002; 17: 3149–52.
20. **Marrs RP, Greene J, Stone BA.** Potential factors affecting embryo survival and clinical outcome with cryopreserved pronuclear human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 1766–71; discussion 1771–2.
21. **D'Angelo A, Amso NN.** Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2002; 17: 2787–94.
22. **Meirow D, Fasouliotis SJ, Nugent D, et al.** A lapa-

- roscopic technique for obtaining ovarian cortical biopsy specimens for fertility conservation in patients with cancer. *Fertil Steril* 1999; 71: 948–51.
23. **Donnez J, Bassil S.** Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 248–59.
 24. **Oktay K.** Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 526–34.
 25. **Rutherford AJ, Gosden RG.** Ovarian tissue cryopreservation: a practical option? *Acta Paediatr* 1999; 88: 13–8.
 26. **Hovatta O.** Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 729–34.
 27. **Newton H, Aubard Y, Rutherford A, et al.** Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996; 11: 1487–91.
 28. **Newton H, Fisher J, Arnold JR, et al.** Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 1998; 13: 376–80.
 29. **Gook DA, Edgar DH, Borg J, et al.** Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2003; 18: 1772–81.
 30. **Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG.** Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 2000; 15: 1300–4.
 31. **Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Meister H, et al.** Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinal tissue in female rabbits following radiotherapy. *Hum Reprod* 2004; 19: 1287–93.
 32. **Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG.** Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod* 1995; 10: 2334–8.
 33. **Kim SS, Yang HW, Kang HG, et al.** Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril* 2004; 82: 679–85.
 34. **Oktay K, Buyuk E, Veeck L, et al.** Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 363: 837–40.
 35. **Oktay K, Tilly J.** Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation. *Lancet* 2004; 364: 2091–2; author reply 2092–3.
 36. **Bedaiwy MA, Falcone T.** Ovarian tissue banking for cancer patients: reduction of post-transplantation ischemic injury: intact ovary freezing and transplantation. *Hum Reprod* 2004; 19: 1242–4.
 37. **Blumenfeld Z.** Preservation of fertility and ovarian function and minimalization of chemotherapy associated gonadotoxicity and premature ovarian failure: the role of inhibin-A and -B as markers. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 93–105.
 38. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2004; 82: 993–8.
 39. **Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendockt A, et al.** Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 2004; 82: 1390–4.
 40. **Schilsky R, Sherins R, Hubbard S, et al.** Long-term follow-up of ovarian function in women treated with MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease. *Am J Med* 1981; 71: 552–556.
 41. **Blumenfeld Z.** Preservation of fertility and ovarian function and minimalization of chemotherapy associated gonadotoxicity and premature ovarian failure: the role of inhibin-A and -B as markers. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 93–105.
 42. **Blumenfeld Z.** Fertility after treatment for Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2002; 13(Suppl 1): 138–47.
 43. **Pritchard KI.** GnRH analogues and ovarian ablation: their integration in the adjuvant strategy. *Recent Results Cancer Res* 1998; 152: 285–97.
 44. **Manger K, Wildt L, Kalden JR, et al.** Prevention of gonadal toxicity and preservation of gonadal function and fertility in young women with systemic lupus erythematosus treated by cyclophosphamide: the PREGO-Study. *Autoimmun Rev* 2006; 5: 269–72.
 45. **Mardešić T, Šnajderová M, et al.** Protocol combining GnRH agonists and GnRH antagonists for rapid suppression and prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25: 90–2.
 46. **Huser M, Crha I, Hudecek R, et al.** Ovarian tissue cryopreservation – new opportunity to preserve fertility in female cancer patients. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; 8: 49–55. Review.
 47. **Huser M, Višňová H, Ventruba P, et al.** Možnosti ochrany reprodukčních funkcí u žen podstupujících chemoterapii pro hematologickou malignitu. *Prakt gyn* 2006; 9: 6–8.
 48. **Huser M, Juránková E, Crha I, et al.** Kryokonzervace ovariální tkáně – šance na záchranu fertility žen s nádorovým onemocněním. *Čes Gynek* 2007; 72: 68–73.
 49. **Ortin TT, Shoshlak CA, Donaldson SS.** Gonadal status and reproductive function following treatment for Hodgkin's disease in childhood: The Stanford experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19: 873–80.
 50. **Blumenfeld Z.** Gender difference: fertility preservation in young women but not in men exposed to gonadotoxic chemotherapy. *Minerva Endocrinol* 2007; 32: 23–34.
 51. **Oh MS, Chang MS, Park W, et al.** Yukmijihwang-tang protects against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *Reprod Toxicol* 2007; 24: 365–70.
 52. **Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, et al.** Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology* 2006; 217: 71–8.
 53. **Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, et al.** Protective effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced testicular toxicity. *Clin Chim Acta* 2006; 367: 114–9.
 54. **Paynter SJ.** Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Human Reprod Update* 2000; 6: 449–56.

MUDr. Petr Němec, Ph.D.

Revmatologická ambulance

II. interní klinika LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Pekařská 53

656 91 Brno

e-mail: petr.nemec@fnusa.cz