

## Αποκατάσταση της δραστηριότητας των ωοθηκών και εγκυμοσύνη μετά από μεταμόσχευση ωοθηκικού ιστού: μια ανασκόπηση 60 περιπτώσεων επανεμφύτευσης ωοθηκικού ιστού

---

### *Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation*

Jacques Donnez, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> Marie-Madeleine Dolmans, M.D., Ph.D.,<sup>b</sup> Antonio Pellicer, M.D., Ph.D.,<sup>c</sup> Cesar Diaz-Garcia, M.D.,<sup>c</sup> Maria Sanchez Serrano, M.D.,<sup>c</sup> Kristen Tryde Schmidt, M.D., Ph.D.,<sup>d</sup> Erik Ernst, M.D., Ph.D.,<sup>f</sup> Valerie Luyckx, M.D.,<sup>b</sup> and Claus Yding Andersen, M.Sc., D.M.Sc.<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Infertility Research Unit, Societe de Recherche pour l'Infertilite, and

<sup>b</sup> Gynecology Research Unit, Institut de Recherche Experimentale et Clinique, Universite Catholique de Louvain, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium;

<sup>c</sup> Valencia Program for Fertility Preservation, La Fe University Hospital and University Clinic Hospital, Valencia, Spain;

<sup>d</sup> Fertility Clinic and

<sup>e</sup> Laboratory of Reproductive Biology, Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, Copenhagen; and

<sup>f</sup> Fertility Clinic, University Hospital of Aarhus, Aarhus, Denmark

---

Η επιθετική χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία και η μεταμόσχευση του μυελού των οστών (Bone Marrow Transplantation-BMT) μπορούν να θεραπεύσουν > 90 % των κοριτσιών και των νεαρών γυναικών που προσβάλλονται από διαταραχές που απαιτούν μια τέτοια θεραπεία. Ωστόσο, οι ωοθήκες είναι πολύ ευαίσθητες σε κυτταροτοξικά φάρμακα, ειδικά σε αλκυλιωτικούς παράγοντες, που ταξινομούνται ως υψηλού κινδύνου για δυσλειτουργία των γονάδων (1-6).

Η κυκλοφωσφαμίδη είναι ο παράγοντας που εμπλέκεται περισσότερο συχνά στην πρόκληση βλάβης στα ωάρια και τα κοκκίωδη κύτταρα (granulose cells) με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο (4-6). Η ιοντίζουσα ακτινοβολία στην περιοχή της κοιλιάς σχετιζόμενη με παράγοντες αλκυλίωσης, συχνά προκαλεί πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (Premature Ovarian Failure-POF), καθιστώντας τις ασθενείς άγονες σχεδόν στο 100 % των περιπτώσεων. Πράγματι, για την ακτινοθεραπεία, έχει αναφερθεί ότι μια δόση 5-20 Gy χορηγούμενη στην ωοθήκη είναι επαρκής για να βλάψει εντελώς τη λειτουργία των γονάδων (4-7), ανεξάρτητα από την ηλικία της ασθενούς. Η εντατική χημειοθεραπεία και / ή η συνολική ακτινοβολία του σώματος (Total Body Irradiation-TBI) που απαιτείται πριν από την μεταμόσχευση του μυελού των οστών (BMT) αποτελούν το συνδυασμό θεραπείας που παρουσιάζει το μεγαλύτερο κίνδυνο για πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (POF).

Ο κίνδυνος για POF εκτιμάται ότι είναι 92 % σε μια μελέτη από τους Meirou και Nugent (8), και οι Teinturier et al (9) ανέφεραν στην πραγματικότητα 0 % ανάνυψη των ωοθηκών μετά τη θεραπεία με την αλκυλιωτική ουσία βουσουλφάνη πριν την μεταμόσχευση του μυελού των οστών (BMT). Πρόσφατα, οι Jadoul et al (10) ανέφεραν ότι η λειτουργία των ωοθηκών είναι προβληματική στην πλειονότητα των γυναικών μετά την BMT και ότι αυτή η δυσλειτουργία συνδέεται κυρίως με την ηλικία κατά τη στιγμή της θεραπείας και τη μετέπειτα θεραπεία με TBI (10).

### **ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ:**

#### **ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΛΟΓΕΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ**

---

Πολλές επιλογές είναι διαθέσιμες σήμερα για τη διατήρηση της γονιμότητας σε ασθενείς με καρκίνο και για να τους δώσουν την ευκαιρία να γίνουν μητέρες, όταν έχουν ξεπεράσει την ασθένειά τους: κρυοσυντήρηση εμβρύου, κρυοσυντήρηση ανώριμου ή ώριμου ωοκυττάρου, και κρυοσυντήρηση ιστού των ωοθηκών. Η κρυοσυντήρηση ωαρίων

και εμβρύων θα συζητηθεί αλλού σε αυτή την έκδοση, από τους Cobo et al και Bedoschi και Oktay (11, 12).

Η κρυσυντήρηση ωοθηκικού ιστού είναι η μόνη διαθέσιμη επιλογή για κορίτσια προεφηβικής ηλικίας και για τις γυναίκες που δεν μπορούν να καθυστερήσουν την έναρξη της χημειοθεραπείας (1, 3). Η κρυσυντήρηση ωοθηκικού ιστού θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη για κάθε ασθενή που υποβάλλεται σε θεραπεία που ενδέχεται να βλάψει τη μελλοντική γονιμότητα, οι ενδείξεις είναι πυελικές, εξωπυελικές, ή/και συστηματικές κακοήθεις νόσους, καθώς και καλοήθεις ασθένειες (1, 3). Η ηλικία της ασθενούς θα πρέπει να ληφθεί υπόψη, διότι το αποθεματικό ωοθυλακίων των ωοθηκών εξαρτάται από την ηλικία (10). Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η γονιμότητα τίθεται σε κίνδυνο κατά τα μέσα της δεκαετίας των 30, και η διαδικασία κατά πάσα πιθανότητα δεν θα πρέπει να προσφέρεται στις γυναίκες μετά την ηλικία των 38 ετών, αλλά περιορίζεται σε ασθενείς κάτω από αυτό το όριο (1, 3, 13). Σε πολλά τμήματα, το όριο καθορίζεται στα 35 έτη (1, 3, 13). Στο πρόγραμμα διατήρησης της γονιμότητας της Βαλένθια, η Antimullerian ορμόνη (AMH) και η μέτρηση ωοθυλακίων του άντρου (Antral Follicle Count -AFC) χρησιμοποιούνται ως κριτήρια επιλογής.

## ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ: ΕΙΔΙΚΟ ΘΕΜΑ

Σήμερα δεν υπάρχει συναίνεση ή οδηγία σχετικά για την ηλικία κατά την οποία πραγματικά επιτυγχάνεται η αναπαραγωγική ικανότητα, καθιστώντας ασαφές το πώς μπορούν να εφαρμοστούν αποτελεσματικά οι συστάσεις σε ασθενείς με καρκίνο κάτω από την ηλικία των 18 ετών. Οι συνηθέστεροι λόγοι για τη μη συζήτηση επιλογών διατήρησης της γονιμότητας στον παιδιατρικό πληθυσμό με καρκίνο περιλαμβάνουν το ότι "δεν διατρέχουν σημαντικό κίνδυνο" στο 29% των περιπτώσεων, "πάρα πολύ μικρή ηλικία" σε 27 %, "αναπόδεικτες τεχνικές" σε 22 %, "έλλειψη υποδομών" σε 10 %, και "μη χρηματοδότηση" σε 8 % (6, 10, 13).

TABLE 1

Series of ovarian cortex cryopreservation in children.

Authors	Patients		Age (y)		Patients <16y		Patients <10y	
	n	Range	Mean	n	%	n	%	
Feigin et al. (22)	23	5-17.5	13.5	NA	NA	NA	NA	
Poirot et al. (16)	47	0.8-15	6.1	47	100	38	81	
Anderson et al. (21)	36	5-35	19.2	11	31	3	8	
Revel et al. (23)	19	5-20	15.3	8	42	2	11	
Oktay and Oktay (24)	26	4-21	14.3	9	35	6	23	
Borgström et al. (25)	57	8-19.8	14.4	40	70	4	7	
Jadoul et al. (20)	58	0.8-15.8	10.4	58	100	21	36	

Note: Adapted from Jadoul et al. (20).

Source: Transplantation of ovarian tissue. *Revifertil* 2013.

Πολλοί συγγραφείς έχουν ασχοληθεί με το θέμα της κρυσυντήρησης ιστού των ωοθηκών κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας (4-6, 14-21), αλλά μόνο λίγες περιπτώσεις που έχει εκτελεστεί αυτή η διαδικασία σε παιδιά έχουν τεκμηριωθεί (20) (Πίνακας 1). Οι Jadoul et al αναφέρουν τη μεγαλύτερη σειρά κρυσυντήρησης ιστού των ωοθηκών σε κορίτσια < 16 ετών. Όταν ταξινομούνται σύμφωνα με τον κατάλογο των παραγόντων κινδύνου για διαταραχές γονιμότητας των Wallace et al (7), οι Jadoul et al διαπίστωσαν ότι 14 ασθενείς ήταν χαμηλού κινδύνου, 32 στην κατηγορία μεσαίου κινδύνου, και 4 σε υψηλό κίνδυνο POF, αλλά έδειξαν ότι είναι δύσκολο να δοθεί στην ασθενή ή τους γονείς της μια ακριβή εκτίμηση του κινδύνου για τη γονιμότητα, γιατί η εξέλιξη της νόσου δεν είναι ποτέ απόλυτα προβλέψιμη (20). Πράγματι, 20 % των κοριτσιών άλλαξε κατηγορία από το χαμηλό / μέσο έως υψηλό κίνδυνο, διότι η μεταμόσχευση του μυελού των οστών (BMT) ήταν αναγκαία ή επειδή περαιτέρω γοναδοτοξικά φάρμακα απαιτούνται κατά την

υποτροπή της νόσου. Επιπλέον, η συνεχιζόμενη λειτουργία των ωοθηκών δεν αποκλείει τον κίνδυνο της μετέπειτα POF (10, 20).

Ένα σημαντικό θέμα είναι η ποσότητα του ωοθηκικού φλοιού που συλλέγεται για κρυσυντήρηση. Η απόφαση ως προς την ποσότητα του ωοθηκικού φλοιού που πρέπει να αφαιρεθεί επηρεάζεται κυρίως από τον εκτιμώμενο κίνδυνο της ωοθηκικής ανεπάρκειας που σχετίζεται με τη σχεδιαζόμενη θεραπεία και τον υπάρχοντα όγκο των ωοθηκών. Για τις περιπτώσεις με ακτινοβολήση της πυέλου, TBI, και υψηλές δόσεις αλκυλιωτικών παραγόντων, θα πρέπει να εκτελείται ωοθηκεκτομή. Θα πρέπει επίσης να εκτελείται σε πολύ νεαρά κορίτσια λόγω του μικρού μεγέθους των ωοθηκών (10, 20).

Στη σειρά των Poirot et al (16) ολόκληρη η ωοθήκη απομακρύνθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ στη σειρά των Anderson et al (21), η διαδικασία περιλάμβανε βιοψίες των ιστών του φλοιού. Στη σειρά των Jadoul et al (20), 20 κορίτσια (με μέση ηλικία 6,5 χρόνια) υποβλήθηκαν σε μονομερή ωοθηκεκτομή και 38 κορίτσια (με μέση ηλικία 12,4 χρόνια) είχαν βιοψίες φλοιού που ελήφθησαν χωρίς ωοθηκεκτομή.

## **ΟΡΘΟΤΟΠΙΚΗ ΑΥΤΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ**

---

Ο κύριος στόχος της κρυσυντήρησης ωοθηκικού ιστού είναι να αποκαταστήσει τη γονιμότητα. Η μέθοδος περιλαμβάνει την επανεμφύτευση φλοιώδους ωοθηκικού ιστού στην πυελική κοιλότητα (ορθοτοπική βάση) ή σε ετεροτοπική περιοχή όπως το αντιβράχιο ή το κοιλιακό τοίχωμα μόλις η θεραπεία έχει ολοκληρωθεί και η ασθενής είναι ελεύθερη νόσου.

Κατ'αρχήν, θα πρέπει να είμαστε πολύ σαφείς σχετικά με τους όρους που χρησιμοποιούμε. Ορθοτοπική σημαίνει μέσα στην πυελική κοιλότητα επάνω στην υπόλοιπη ωοθήκη ή κοντά σε αυτήν ή στο περιβάλλον της μήτρας. Ετεροτοπική σημαίνει σαφώς έξω από την περιτοναϊκή κοιλότητα. Φυσική κύηση μπορεί να επιτευχθεί μέσω ορθοτοπικής μεταμόσχευσης ιστού, εάν η σάλπιγγες παραμένουν άθικτες.

## **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΟΡΘΟΤΟΠΙΚΗΣ ΑΥΤΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ**

---

Υπάρχουν ουσιαστικά δύο τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανάλογα με την παρουσία ή όχι μιας τουλάχιστον παραμένουσας ωοθήκης:

1. Εάν τουλάχιστον μία ωοθήκη είναι παρούσα, η τεχνική αρχίζει με αποφλοιώση της ωοθήκης. Ένα μεγάλο κομμάτι του ωοθηκικού φλοιού απομακρύνεται για να υπάρξει πρόσβαση στο μυελό (medulla) (Εικ. 1) και το αγγειακό του δίκτυο. Ακόμα κι αν αυτή η περιοχή δείχνει κάποια σημάδια ίνωσης, ένα αγγειακό δίκτυο εξακολουθεί να είναι παρόν (αν και σημαντικά μειωμένο) (1, 26). Τα κομμάτια ωοθηκικού φλοιού στη συνέχεια σταθεροποιήθηκαν με τη χρήση 7-0 ή 8-0 ραμμάτων προπυλενίου σύμφωνα με προηγουμένως περιγραφείσες μικροχειρουργικές τεχνικές (1, 3, 27, 28), ή απλά να τοποθετήθηκαν στο μυελό (medulla) και σταθεροποιήθηκαν με Interceed ή κόλλα ινώδους (26, 28). Αυτή η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί με λαπαροσκόπηση ή λαπαροτομία. Μισοί από τους ασθενείς στην ομάδα της σειράς του Pellicer υποβλήθηκαν σε αυτή τη διαδικασία σύμφωνα με τη βοήθεια μικροχειρουργικής, όπως περιγράφεται στη σειρά από τους Silber et al με επανεμφύτευση φρέσκου ιστού (27). Στην ομάδα του Andersen (29), ωοθηκικός ιστός εναποτίθεται στο μυελό (medulla) μετά την πραγματοποίηση μιας τομής στο φλοιό. Ο ιστός επομένως τοποθετείται σε μία υποφλοιώδη περιοχή, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

2. Εάν και οι δύο ωοθήκες είναι απύσες, ένα περιτοναϊκό παράθυρο μπορεί να δημιουργηθεί σε δύο στάδια, όπως στην περίπτωση που δημοσιεύθηκε το 2004 (30), για να

προκληθεί αγγειογένεση πριν από τη διαδικασία της μεταμόσχευσης ή σε ένα στάδιο όπως περιγράφηκε πρόσφατα (31). Η τομή για αυτό το περιτοναϊκό παράθυρο γίνεται στο πρόσθιο φύλλο του ευρύ συνδέσμου σε μια περιοχή όπου ένα αγγειακό δίκτυο είναι ορατό (οπισθοπεριτοναϊκά αγγεία. Εικ. 2). τα θραύσματα τοποθετούνται στο παράθυρο και στη συνέχεια καλύπτεται με Interceed, οι ακμές των οποίων στερεώνεται με κόλλα ινώδους. Η μέθοδος του περιτοναϊκού παραθύρου μπορεί επίσης να γίνει εάν μια μη λειτουργική ωοθήκη είναι ακόμα στη θέση της.



## ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΡΙΩΝ ΚΕΝΤΡΩΝ (Βέλγιο, Δανία, Ισπανία)

Αναλύσαμε τα δεδομένα από την ομάδα του Donnez, την ομάδα του Andersen και την ομάδα του Pellicer για να αξιολογήσουμε 60 ορθοτοπικές μεταμοσχεύσεις. Όλες οι ωοθηκικές βιοψίες καταψύχθηκαν με τη διαδικασία βραδείας κατάψυξης και στην πλειονότητα των περιπτώσεων (73 %) ο ωοθηκικός φλοιός απομακρύνθηκε πριν από οποιαδήποτε χημειοθεραπεία. Οι ενδείξεις ήταν οι αιματολογικές ασθένειες σε 35 % των περιπτώσεων, η κακοήθης παθολογία (εκτός από αιματολογικές ασθένειες) σε 45 %, και η καλοήθης παθολογία (σύνδρομο Turner, οικογένεια, ιστορικό POF, ενδομητρίωση, υποτροπιάζουσες κύστεις των ωοθηκών, κλπ.) σε 20 %.

Αποκατάσταση της ωοθηκικής δραστηριότητας παρατηρήθηκε σε τουλάχιστον 52 περιπτώσεις μεταξύ των 56 (93 %, Πίνακας 2). Στην αναφερόμενη σειρά, το περιτοναϊκό παράθυρο που δημιουργήθηκε κοντά στο ωοθηκικό ομφαλό (hilus) και τον ωοθηκικό μυελό (medulla) αποδείχθηκε εξίσου αποτελεσματικό ως θέσεις επανεμφύτευσης, τουλάχιστον για την αποκατάσταση της ωοθηκικής δραστηριότητας (όπως αποδεικνύεται από την ανάπτυξη των ωοθυλακίων). Μεγάλες ταινίες (8-10 χιλιοστά - MO: 5 mm) και μικροί κύβοι (2 mm<sup>3</sup>) ιστού φάνηκε να αποκαθιστούν ουσιαστικά τη λειτουργία των ενδοκρινών αδένων των ωοθηκών.

Στη σειρά του Donnez, αποκατάσταση της λειτουργίας των ωοθηκών παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από τρεις, όπου δεν υπήρχαν θυλάκια στο επαναμοσχευμένο κατεψυγμένο-αποψυγμένο ωοθηκικό ιστό, εξηγώντας την απουσία αποκατάστασης της ωοθηκικής δραστηριότητας. Μεταξύ αυτών των τριών γυναικών, δύο είχαν υποβληθεί σε κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού σε άλλη χώρα και μία σε ένα άλλο νοσοκομείο. Αυτό υπογραμμίζει τη σημασία της αξιολόγησης της πυκνότητας των ωοθυλακίων πριν από τη λήψη της απόφασης για επανεμφύτευση ιστού.

Στη σειρά του Pellicer, τέσσερις ασθενείς υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση μόνο τρεις μήνες πριν από τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Καμία από αυτές δεν είχε ανακτήσει τη λειτουργία των ωοθηκών μέχρι τότε, και ένα μεγαλύτερο διάστημα παρακολούθησης (follow-up) θα απαιτηθεί για να αξιολογηθούν σωστά τα αποτελέσματά

τους. Δεκαεπτά από τις 18 ασθενείς έδειξαν να έχουν ανακτήσει τη λειτουργία των ωοθηκών.

Στη σειρά του Andersen, και οι 25 ασθενείς ανέκτησαν τη λειτουργία των ωοθηκών. Ωστόσο, σε μια ασθενή, μόνο τρία τεμάχια του φλοιού ιστού είχαν αρχικά ληφθεί και μεταμοσχεύτηκαν, και άλλη μία γυναίκα ήταν 36 ετών κατά τη στιγμή της λήψης. Σε αυτές τις δύο περιπτώσεις, η ωοθηκική δραστηριότητα δεν υπερέβη τους 8 μήνες (32). Σε όλες τις περιπτώσεις, χρειάστηκαν 3.5 έως 6.5 μήνες μετά την επανεμφύτευση πριν ανιχνευτεί μια αύξηση στην E2 και μία μείωση στην FSH (μέσος όρος 4,5 μήνες). Το χρονικό διάστημα μεταξύ της εμφύτευσης φλοιώδους ιστού και της πρώτης κατακόρυφης αύξησης (peek) της E2 συνάδει με στοιχεία που προκύπτουν από πρόβατα και ανθρώπους, αν και κάποια διακύμανση μπορεί να παρατηρηθεί (1, 3, 26, 30). Αυτή η διακύμανση μπορεί να εξηγηθεί από μια διαφορά στο αποθεματικό θυλακίων κατά το χρόνο της κρυσυντήρησης, με μερικές γυναίκες να έχουν ήδη λάβει μια πρώτη αγωγή χημειοθεραπείας πριν από τη βιοψία των ωοθηκών και την κρυσυντήρηση (26). Πράγματι, ο χρόνος για την κατακόρυφη αύξηση της E2, ταυτόχρονα με τη μείωση της FSH, ήταν μεγαλύτερος (5.5 με 6.5 μήνες) σε ασθενείς που είχαν λάβει χημειοθεραπεία πριν την κρυσυντήρηση σε σχέση με εκείνες που δεν είχαν (3.5 έως 4.5 μήνες) (26).

## Κυήσεις

Ο Πίνακας 2 συνοψίζει τα δεδομένα από τις τρεις ομάδες, συμπεριλαμβάνοντας ένα σύνολο 60 ασθενών που υποβλήθηκαν σε ορθοτοπική μεταμόσχευση. Έντεκα ασθενείς έμειναν έγκυες (μεταξύ των οποίων και δύο συνεχιζόμενες κυήσεις στις 24 και 30 εβδομάδες), και έξι από αυτές τις γυναίκες έχουν ήδη γεννήσει 12 υγιή μωρά.

**TABLE 2**

Data from a series of 60 cases of reimplantation from three centers (Belgium, Denmark, and Spain).

Team	Patients	Freezing technique	Cryopreservation before chemotherapy	Pathology			Graft site		Outcome		Pregnancy		Live birth				
				Hemalogic malignancies	Malignant pathology without	Benign pathology	Ovarian medulla	Peritoneal window	Ovarian activity (no. of patients)	Average time for restoration of ovarian activity	Total no. of pregnancies	Natural IVF	No. of live births	No. of Spontaneous IVF			
Belgium	13	Slow-freezing	77% (6/13)	38.5% (5/13)	23% (3/13)	38.5% (5/13)	61.5% (8/13)	54% (7/13)	100% <sup>3</sup>	4.5 mo	6	4	2	3	6	4	2
Denmark	25	Slow-freezing	88% (22/25)	32% (8/25)	44% (11/25)	24% (6/25)	44% (11/25)	36% (6/25)	25.2% <sup>4</sup>	4.7 mo	8	6	2	2	4	3	1
Spain	22	Slow-freezing	95% (21/22)	36.5% (8/22)	59% (13/22)	4.5% (1/22)	65.5% (14/22)	36.5% (8/22)	17% <sup>5</sup>	4.4 mo	4 <sup>6</sup>	3	1	1	2 (twin delivery)	—	—

<sup>3</sup> For the three patients with loss of ovarian activity, cryopreservation was performed in other ovaries. No follicles were observed in frozen-thawed ovarian fragments used for histologic analysis in any of those three cases.  
<sup>4</sup> In two cases, ovarian activity did not exceed 6 months.  
<sup>5</sup> Four patients with very short follow-up (<3 mo) are not included.  
<sup>6</sup> Including two patients with ongoing pregnancies at 24 and 30 wk.

Source: Reimplantation of ovarian tissue. *Fertil Steril* 2013.

Ο Πίνακας 3 δείχνει την παγκόσμια σειρά 24 ζωντανών γεννήσεων που έχουν αποκτηθεί μέχρι σήμερα. Η διαδικασία βραδείας κατάψυξης χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις. Το γεγονός ότι > 50% των γυναικών ήταν σε θέση να συλλάβουν αποτελεί φυσικά ένα καλό επιχείρημα υπέρ της ορθοτοπικής επανεμφύτευσης. Η ηλικία των ασθενών κατά το χρόνο της κρυσυντήρησης είναι ένας προγνωστικός παράγοντας, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (26). Πράγματι, η πλειονότητα των εγκύων γυναικών ήταν < 30 ετών. Στην ομάδα του Donnez, μία γυναίκα της οποίας ο ιστός υποβλήθηκε σε κρυσυντήρηση σε ηλικία 17 ετών και επανεμφυτεύθηκε στην ηλικία των 25 ετών, έχει ήδη γεννήσει τρία υγιή μωρά σε <3 χρόνια (Πίνακας 3). Στην ομάδα του Andersen, επίσης, μια γυναίκα έχει γεννήσει τρία υγιή μωρά μετά από κρυσυντήρηση και επανεμφύτευση.

Το περιτοναϊκό παράθυρο που δημιουργείται κοντά στον ωοθηκικό ομφαλό (hilus) αποδείχθηκε αποτελεσματικό στις περιπτώσεις που περιγράφονται εδώ (1, 26, 33-35). Σε άλλες περιπτώσεις, ο ιστός μεταμοσχεύθηκε στο μυελό (medulla) μετά την αποφλοιώση ή τοποθετήθηκε κάτω από το φλοιό (1, 3, 32, 36, 37). Αν και έχει αποδειχθεί ότι η χημειοθεραπεία προκαλεί βλάβη στα αιμοφόρα αγγεία των ωοθηκών με εναπόθεση – μετάπτωση υαλίνης (hyalinization) και στένωση του αυλού, νεοαγγείωση με CD34, πολλαπλασιασμός έχει συνεπακόλουθα αποδειχθεί (38). Το αγγειογόνο δυναμικό της

ωοθήκης ίσως εξηγεί γιατί ο ωοθηκικός μυελός (medulla) είναι μια καλή θέση μεταμόσχευσης, ακόμη και μετά από αρκετά χρόνια ατροφίας (3).

**TABLE 3**

Series of 24 live births after transplantation of frozen-thawed ovarian cortex.

References	Cryopreservation procedure	Graft site	Live birth	
			Spont.	IVF
Donnez et al. (1, 3, 26, 30, 31)	SF	Peritoneal window (2 steps) Peritoneal window (1 step)	+	++
Meinow et al. (58)	SF	Ovarian medulla	+++	-
Demeestere et al. (33)	SF	Beneath the ovarian cortex	-	+
Andersen et al. (40, 41, 76, 77)	SF	Ovarian and peritoneal windows (2 steps)	++	-
	SF	Subcortical ovarian pocket	+	+
Siber et al. (37, 75)	SF	Ovarian medulla	+	+
River et al. (34)	SF	Ovarian medulla	++	-
Roux et al. (35)	SF	Ovarian and peritoneal windows (1 and 2 steps)	+	-
Sanchez et al. (28)	SF	Ovarian medulla	+	-
Revel et al. (78) <sup>a</sup>	SF	Peritoneal window (slice)	-	++ (twins)
Dittrich et al. (79)	SF	Peritoneal window	-	+
Revell et al. (80)	SF	Ovarian medulla	+	-
García Rada (81)	SF	Peritoneal pocket	+	+

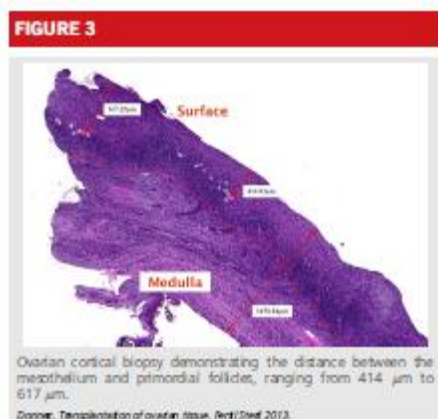
Note: Four ongoing pregnancies at the present time two in Spain, one in South Africa, and one in Australia.  
<sup>a</sup>Peritoneal communication, 2012.  
Donnez. Transplantation of ovarian tissue. *Reprod Sci* 2013.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι όλα τα μωρά που γεννήθηκαν ήταν υγιή και ότι δεν παρατηρήθηκε καμία υποτροπή της αρχικής νόσου.

#### ΜΑΘΗΜΑΤΑ: ΤΙ ΜΠΟΡΟΥΜΕ ΝΑ ΜΑΘΟΥΜΕ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΥΠΑΡΧΟΥΣΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ;

##### Πάχος της βιοψίας

Με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (1, 3, 13, 39), έχουμε συστήσει τη λήψη βιοψίας πάχους 1 - 1,5 mm από τον φλοιό των ωοθηκών. Πράγματι, αρχέγονα ωοθυλάκια μπορεί να βρεθούν σε μια απόσταση 0,8 mm από το μεσοθήλιο (mesothelium) (Εικ. 3). Θεωρούμε αυτή τη σύσταση ότι είναι υψίστης σημασίας, επειδή επιφανειακές ή πολύ λεπτές βιοψίες μπορούν να οδηγήσουν σε απουσία αρχέγονων ωοθυλακίων στον αφαιρούμενο φλοιό. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, δεν βρέθηκαν θυλάκια σε τέτοιες περιπτώσεις στη σειρά του Donnez. Σε δύο περιπτώσεις, που οι βιοψίες πραγματοποιήθηκαν σε άλλη χώρα ήταν πολύ λεπτές και ως εκ τούτου, ανεπαρκής.



##### Μεταφορά της βιοψίας

Ακόμα κι αν οι περισσότεροι συγγραφείς συνιστούν ο ωοθηκικός ιστός να μεταφέρεται σε ιδανικές συνθήκες στο εργαστήριο για κατάψυξη, και οι χρόνοι μεταφοράς να μειωθούν όσο το δυνατόν, η εμπειρία των Δανών (40) απέδειξε ότι ο ωοθηκικός ιστός



μπορεί να καταψυχθεί με επιτυχία μετά από 4-5 ώρες μεταφοράς. Πράγματι, αναφέρθηκαν κυήσεις σε αυτή την ομάδα μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση ωοθηκικού ιστού που είχε μεταφερθεί για το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα πριν από την κατάψυξη (32, 40, 41).

### **Βραδεία Κατάψυξη έναντι Υαλοποίησης**

Μια σημαντική εξέλιξη υπό διερεύνηση επί του παρόντος σε ένα πειραματικό μοντέλο είναι η υαλοποίηση των θραυσμάτων ωοθηκικού ιστού. Η συζήτηση είναι πολύ σημαντική, διότι όλες οι κυήσεις που επιτεύχθηκαν μετά από επανεμφύτευση ανθρώπινου ωοθηκικού ιστού έχουν μέχρι στιγμής προκύψει από ιστό που καταψύχθηκε σύμφωνα με την τεχνική της αργής κατάψυξης (Πίνακας 3).

Ωστόσο, τα αποτελέσματα υαλοποίησης είναι όλο και πιο πολλά υποσχόμενα. Σε μια εκτενή ανασκόπηση, οι Amorimet et al (42) συνόψισαν τις αρχές υαλοποίησης και τόνισαν την ανάγκη να κατανοήσουμε πώς τα διαλύματα υαλοποίησης και τα πρωτόκολλα μπορούν να επηρεάσουν τον ωοθηκικό ιστό.

Τόσο η βραδεία κατάψυξη όσο και η υαλοποίηση βρέθηκαν να διατηρούν τη μορφολογία των αρχέγονων και των πρωτογενών θυλακίων (42), αλλά τα δευτερογενή θυλάκια και το στρώμα ήταν σταθερά καλύτερα διατηρημένα με υαλοποίηση, με βάση πρόχειρες ιστολογικές παρατηρήσεις (43). Μολονότι η ακεραιότητα του στρώματος έχει προταθεί ότι διατηρείται μετά την υαλοποίηση (43, 44, 45) και ότι καταστρέφεται μετά από αργή κατάψυξη (42, 46, 47), σε προηγούμενες μελέτες, η ομάδα του Zelinski ήταν η πρώτη που έδειξε μορφολογικά άθικτα δευτερογενή ωοθυλάκια σε μακάκους μετά την υαλοποίηση ωοθηκικού ιστού (43).

Οι Ting et al (43) έδειξαν πρόσφατα ότι καταστροφή κοκκιωδών κυττάρων (granulose cells) στα δευτερογενή θυλάκια παρατηρήθηκε πιο συχνά μετά από βραδεία κατάψυξη από ό, τι μετά την υαλοποίηση. Αυτή η βλάβη των κοκκιωδών κυττάρων παρατηρήθηκε επίσης από τους Nottola et al μετά την αργή κατάψυξη (48), καθώς υπήρξε κακός συγχρονισμός μεταξύ του πολλαπλασιασμού των κοκκιωδών κυττάρων και της ωρίμανσης των ωοκυττάρων.

Η μορφολογία και η ανάπτυξη των πρόδρομων ωοθυλακίων του άντρου (preantral follicles) από κρυοσυντηρημένο ιστό ωοθήκης έχει εξεταστεί μόνο σε κατεψυγμένους, μη υαλοποιημένους ιστούς και δοκιμάστηκαν για μέχρι 14 ημέρες σε καλλιέργεια (49, 50). Οι Ting et al ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν τη μακροπρόθεσμη βιωσιμότητα και λειτουργία των δευτερογενών θυλακίων *in vitro* μετά την υαλοποίηση των ιστών με τη χρήση εγκλειστης τρισδιάστατης καλλιέργειας (encapsulated three-dimensional culture) (43).

Με τη βραδεία κατάψυξη, ο εξωκυτταρικός σχηματισμός πάγου μπορεί μερικές φορές να προκαλέσει βλάβη, ιδιαίτερα όταν η κυτταρική πυκνότητα είναι υψηλή και οι συνδέσεις κύτταρο-προς-κύτταρο είναι εκτεταμένες (όπως στον ωοθηκικό ιστό) (42, 49-51). Σε αντίθεση, η υαλοποίηση σχεδιάστηκε για να εμποδίσει όλες τις μορφές των κρυστάλλων πάγου. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να είναι πιο ωφέλιμη από την κρυοσυντήρηση ιστού (51, 52). Όπως τονίζεται από τους Amorimet et al σε μία ανασκόπηση (42), η υαλοποίηση εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ της τοξικότητας του κρυοπροστατευτικού παράγοντα και των συγκεντρώσεων του κρυοπροστατευτικού που απαιτούνται για την επιτυχή υαλοποίηση και τη βέλτιστη ψύξη και το ρυθμό θέρμανσης. Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της υαλοποίησης περιλαμβάνουν το μέγεθος του ιστού, τον τύπο του κρυοπροστατευτικού, το χρόνο έκθεσης, και τη θερμοκρασία (42, 43).

Τα πρωτεύοντα θηλαστικά θα συνεχίσουν να αποτελούν σημαντικό μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για συστηματική σύγκριση και βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων υαλοποίησης, καθώς και τη δοκιμή νέων κρυοπροστατευτικών παραγόντων και διάφορες συσκευές κλειστού συστήματος για ενδεχόμενη κλινική χρήση (42, 43). Η ομάδα του Donnez πολύ πρόσφατα απέκτησε εξαιρετικά αποτελέσματα μετά την

επανατοποθέτηση των υαλοποιημένα ωθηκικών ιστών σε μπαμπούινο. Πράγματι, παρατηρήθηκε φυσιολογική πυκνότητα και βιωσιμότητα των ωθυλακίων, καθώς και ανάπτυξη των ωθυλακίων του άντρου (antral) και ωχρού σωματίου (53). Ωστόσο, αυτά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα δεν επαρκούν για να μας επιτρέψουν να προτείνουμε την υαλοποίηση του ανθρώπινου ωθηκικού ιστού αν και το ότι προκύπτουν μόνον ζωντανές γεννήσεις σε πρωτεύοντα θηλαστικά μετά από επανεμφύτευση υαλοποιημένου ιστού θα αντιπροσώπευε ένα αρκετά ισχυρό επιχείρημα που την ευνοεί. Πράγματι, η κύηση και η γέννηση αποτελούν την ισχυρότερη απόδειξη ότι η ποιότητα τόσο των κοκκιωδών (granulosa) κυττάρων όσο και των ωοκυττάρων είναι καλά διατηρημένη.

#### Ορθοτοπική Μεταμόσχευση έναντι Ετεροτοπικής Μεταμόσχευσης (Πίνακας 4)

Στη θεωρία, ο ωθηκικός ιστός μπορεί να μεταμοσχευθεί ορθοτοπικά (στην πυελική κοιλότητα ή στο μυελό-medulla-των ωθηκών ή σε περιτοναϊκό παράθυρο) ή ετεροτοπικά (στο κοιλιακό τοίχωμα, το αντιβράχιο, το μυ του ορθού, κλπ.) (54, 55). Παρ'όλα αυτά, η κλινική αξία των ετεροτοπικών επανεμφυτεύσεων παραμένει αμφισβητήσιμη λόγω της έλλειψης κύησης με αυτή την προσέγγιση σε σχέση με τις 24 γεννήσεις ζώντων νεογνών που αποκτήθηκαν μετά από την ορθοτοπική επανεμφύτευση (Πίνακας 3). Επιπλέον, οι ετεροτοπικές θέσεις μπορεί να μην παρέχουν ένα βέλτιστο περιβάλλον για την ανάπτυξη των ωθυλακίων, πιθανώς λόγω των διαφορών σε θερμοκρασία, πίεση, παρακρινείς παράγοντες και την παροχή αίματος. Η πυελική κοιλότητα με το ενδοπεριτοναϊκό της περιβάλλον (περιτοναϊκό υγρό και ειδική οξυγόνωση) είναι πιθανό να είναι μια καλύτερη περιοχή για την ανάπτυξη των ωθυλακίων. (1, 3, 32, 36).

TABLE 4		
Advantages and disadvantages of heterotopic and orthotopic sites for ovarian tissue reimplantation.		
	Heterotopic (subcutaneous)	Orthotopic
Advantages	No limitation of number of fragments transplanted. Easy transplantation procedure. Easy access for follicular monitoring and oocyte collection.	Possibility of natural conception. Restoration of fertility demonstrated. Favorable environment for follicular development.
Disadvantages	Restoration of fertility not yet demonstrated. IVF procedure required. Effect of the local environment on oocyte quality is unknown.	Number of fragments transplanted limited by ovarian size. Invasive transplantation procedure.

Donnez. Transplantation of ovarian tissue. *Reprod Sci* 2013.

Ωστόσο, η αποκατάσταση της ενδοκρινικής λειτουργίας έχει αποδειχθεί με συνέπεια μετά ετεροτοπική ωθηκική μεταμόσχευση (56). Σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη του Kim (56), και οι πέντε ασθενείς ανάκτησαν την ενδοκρινική λειτουργία εντός 3-5 μηνών μετά τη μεταμόσχευση κατεψυγμένου-αποψυγμένου ωθηκικού ιστού στον χώρο μεταξύ του μυ του ορθού και της θήκης του ορθού.

Σύμφωνα με τον Oktay et al (54, 55) και τον Kim (56), τα πλεονεκτήματα της μεταμόσχευσης ωθηκικού ιστού σε ετεροτοπικές θέσεις περιλαμβάνουν : 1) την αποφυγή επεμβατικών διαδικασιών, 2) την εύκολη απόκτηση των ωαρίων, 3) οικονομικά αποδοτική τεχνολογία, όταν απαιτείται επαναλαμβανόμενη μεταμόσχευση, και 4) την ευφικτότητα, ακόμη και σε περίπτωση σοβαρών πυελικών συμφύσεων που εμποδίζουν την ορθοτοπική μεταμόσχευση (Πίνακας 4).

#### Ποιότητα των ωαρίων

Μερικές ασθενείς χρειάζονται εξωσωματική γονιμοποίηση να μείνουν έγκυες, αλλά θα πρέπει να τονιστεί ότι στις σειρές που δημοσιεύθηκαν από τους Andersen et al (13, 32), Dolmans et al (57), και Meirrow et al (58), ένα ποσοστό άδειων θυλακίων ύψους 29 % -35 % παρατηρήθηκε κατά τη διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης μετά από διέγερση με



γοναδοτροπίνες. Αυτή η δυσλειτουργική ωθυλακιόγνεση θα μπορούσε να είναι λόγω μη συγχρονισμού ωρίμανσης κοκκιωδών (granulosa) κυττάρων και ωοκυττάρων, όπως αναφέρθηκε σε ξενομεταμοσχεύσεις ανθρώπινο ωθηκών, με τα τα κοκκιώδη κύτταρα να είναι ώριμα, ενώ τα ωοκύτταρα ανώριμα (48, 59).

Το ίδιο το ωοκύτταρο θα μπορούσε να καταστραφεί από τις διαδικασίες κατάψυξης και απόψυξης, που οδηγούν σε ένα υψηλότερο ποσοστό άδειων θυλακίων ή τροποποιήσεις ωαρίου, ενώ τα κοκκιώδη κύτταρα μπορεί να είναι πιο ανθεκτικά, όπως καταδεικνύεται από αρκετές μελέτες (13, 32, 57, 58), όπου ένα ποσοστό >30 % άδειων θυλακίων παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια προσπαθειών εξωσωματικής γονιμοποίησης μετά από επανεμφύτευση ωθηκικού φλοιού.

Η τροποποιημένη ωθυλακιόγνεση μπορεί επίσης να είναι λόγω του σημαντικά μειωμένου αποθεματικού των ωθηκών μετά τη μεταμόσχευση. Μόσχευμα με ιστό φλοιού με σποραδικά χαμηλή πυκνότητα ωθυλακίων θα μπορούσε να είναι η αιτία της δυσλειτουργικής ωθυλακιόγνεσης. Μια άλλη αιτία βλάβης στα ωοκύτταρα είναι η καθυστέρηση που συμβαίνει πριν να επιτευχθεί αποτελεσματική επαναγγείωση του μοσχεύματος μετά τη μεταμόσχευση (60-62). Άλλοι παράγοντες, όπως το υπάρχον δίκτυο των αγγείων στο μυελό (medulla) των ωθηκών, επίσης να επηρεάζει το ποσοστό επαναγγείωσης, τονίζοντας τον κρίσιμο ρόλο του προϋπάρχοντος αγγειακού δικτύου δημιουργώντας την έννοια της "αγγειακής κλίνης" (vascular bed) που πρόσφατα προτάθηκε (63).

### **Η Έννοια της Αγγειακής Κλίνης - «Vascular Bed»**

---

Μετά την επανεμφύτευση, > 50 % των αρχέγονων ωθυλακίων χάνονται, κυρίως λόγω ισχαιμίας των ιστών μετά τη μεταμόσχευση, εν αναμονή της αγγειογένεσης. Δύο μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για αυτή την απώλεια ωθυλακίων : 1) η ισχαιμική βλάβη και η καθυστέρηση στην επανοξυγόνωση (61, 62) και 2) η ενεργοποίηση των ωθυλακίων (64, 65). Ο πρώτος μηχανισμός για να προκαλέσει απώλεια των θυλακίων είναι η ισχαιμία. Έχει αποδειχθεί σαφώς ότι επανοξυγόνωση των ωθηκικών μοσχευμάτων σημειώνεται από την ημέρα 5 και μετά, όπως αποδεικνύεται από τη σημαντική αύξηση στις τιμές pO<sub>2</sub> που αξιολογήθηκε με παραμαγνητικό συντονισμό ηλεκτρονίων 5 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση.

Αποδείχθηκε, επίσης, με μελέτες της επαναγγείωσης, ότι η έναρξη της επαναιμάτωσης των μοσχευμάτων πραγματοποιείται επίσης την 5η ημέρα και, πολύ σημαντικό, ότι χημικά αγγεία είναι παρόντα, αποδεικνύοντας τον ουσιαστικό ρόλο των αγγείων του μοσχεύματος, καθώς και των αγγείων του ξενιστή (61, 6). Η πρόληψη της ισχαιμικής βλάβης του ιστού είναι, ως εκ τούτου, απαραίτητη για να μειωθεί η απώλεια των ωθυλακίων. Η αγγειογένεση μπορεί να διεγερθεί με τη χορήγηση αγγειογόνων παραγόντων (αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου - VEGF), γοναδοτροπίνες, κλπ.), και τη χορήγηση αντιαποπτωτικών παραγόντων (Kit ligand, c-Kit, αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης I και II, 8Bγ - κυκλικής μονοφωσφορική γουανοσίνης, παράγοντα 9 ανάπτυξης και διαφοροποίησης, κ.λπ.) και θα μπορούσε επίσης να διαδραματίσει ένα ρόλο στην επιβίωση των ωθυλακίων (60). Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες έγιναν επί τη βάση πειραμάτων in vitro καλλιιεργειών και δεν υπάρχει ισχυρή απόδειξη ότι αυτοί οι παράγοντες θα μπορούσαν να λειτουργήσουν in vivo στον άνθρωπο (63).

Ο δεύτερος μηχανισμός που προκαλεί την απώλεια των θυλακίων είναι η ενεργοποίηση των ωθυλακίων (64, 65). Αυτή η ενεργοποίηση θα πρέπει να θεωρείται ως επιταχυνόμενη ανάπτυξη χωρίς φρένο (εικ. 4). Ωστόσο, αυτή η επιταχυνόμενη ανάπτυξη δεν είναι φυσιολογική, καθώς διαφορές στην ωρίμανση των κοκκιωδών κυττάρων και των ωαρίων έχουν ανιχνευθεί (48). Επιπλέον, η κατάψυξη και οι διαδικασίες απόψυξης επηρεάζουν τη μορφολογία, ειδικότερα το πάχος του στρώματος των κυττάρων της θήκης (65).

Δεδομένου ότι τα κύτταρα της θήκης εμπλέκονται στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων, παρέχοντας δομική υποστήριξη για ωοθυλάκια, η έννοια της προετοιμασίας αγγειακής κλίνης πριν από την τοποθέτηση του μοσχεύματος θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, προκειμένου να μειωθεί σημαντικά η απώλεια των ωοθυλακίων. Πρόσφατες μελέτες σε μπαμπούνους και μακάκος ρέζους (αδημοσίευτα δεδομένα) έδειξαν ότι το μόσχευμα σε ένα "φρέσκο" ωοθηκικό ομφαλό (ovarian hilus) (24 ώρες μετά την ωοθηκεκτομή) αποδίδει καλύτερη επιβίωση των ωοθυλακίων από ότι η ινωτική περιοχή (1 μήνα μετά την ωοθηκεκτομή). Στην πράξη, η θέση της επανεμφύτευσης μπορεί να προετοιμαστεί με (encapsulated) έγκλειστο σε κάψα VEGF (66) και / ή στρωματικά κύτταρα εμπλουτισμένα σε κύτταρα CD34 (67). Πολύ πρόσφατες δημοσιεύσεις (68) δείχνουν ότι η θεραπεία του ξενιστή με μελατονίνη ή επώαση του μοσχεύματος με βιολογική κόλλα πλούσια σε υαλουρονικό οξύ (υαλουρονάνη- hyaluronan), ιδιαίτερα σε συνδυασμό με VEGF-A και βιταμίνη E, μπορεί να βελτιώσει την επιβίωση του μοσχεύματος.

Είναι ωστόσο ασαφές κατά πόσον η αύξηση της αγγείωσης σε μόσχευμα φλοιού είναι επωφελής ή όχι για τη διατήρηση των αποθεματικών της ωοθήκης μετά τη μεταμόσχευση. Πράγματι, οι Delgado - Rosas et al (69) και οι Meirrow et al (38) ανέφεραν αλλαγές στην πυκνότητα των μικροαγγείων σε ηλικιωμένο ωοθηκικό φλοιό, καθώς και σε φλοιώδη ιστό εκτεθειμένο σε χημειοθεραπεία. Οι δύο αυτές εκθέσεις μπορούν να υποδεικνύουν, αν και είναι ασαφές αν είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα το μειωμένο αποθεματικό των ωοθηκών, ότι η αυξημένη αγγείωση του φλοιού μπορεί να έχει ευεργετικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων προχωρημένου σταδίου, αλλά και ότι μπορεί επίσης να είναι επιβλαβής για τα λανθάνοντα αρχέγονα θυλάκια.

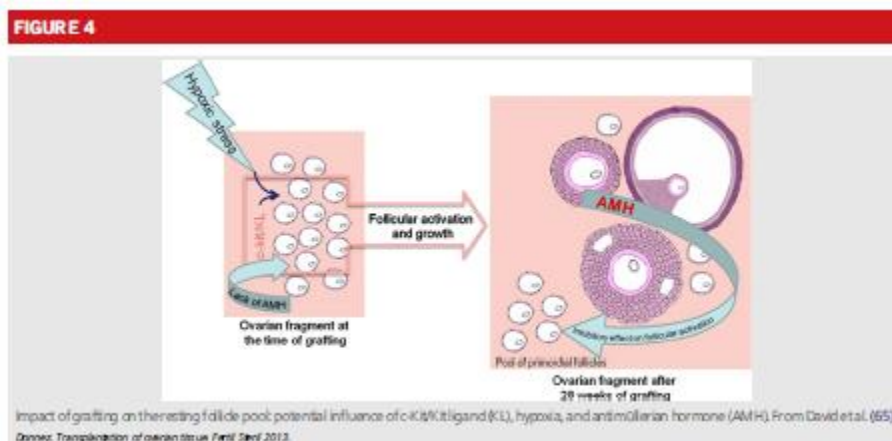
Όλα αυτά τα πρόσφατα στοιχεία τονίζουν τη σημασία της προετοιμασίας της αγγειακή κλίνη ώστε να ευνοηθεί η ταχύτερη επαναγγείωση του μοσχεύματος, επειδή η ενισχυμένη αγγείωση του αγγειακού στρώματος είναι πιθανό να αυξήσει την αγγείωση στο εμβολιασμένο φλοιό.

### **Αποκατάσταση της Ωοθηκής Λειτουργίας και της Διάρκειας της Ωοθηκικής Δραστηριότητας**

---

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η ωοθυλακική ανάπτυξη λαμβάνει χώρα εντός 4-5 μηνών από τη μεταμόσχευση, αλλά και μεγάλη μεταβλητότητα έχει παρατηρηθεί. Πράγματι, ακόμη και αν είναι γενικά αποδεκτό ότι μια περίοδος R120 ημερών είναι αναγκαία για την έναρξη της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, η αποκατάσταση της ωοθηκικής δραστηριότητας έχει παρατηρηθεί να εμφανίζεται σε ένα ευρύ παράθυρο, από 8 έως 26 εβδομάδες. Μερικοί συγγραφείς έχουν αναφέρει πολύ γρήγορη αποκατάσταση (2 μήνες) (5, 27, 70). Δεν αποκλείεται η ενεργοποίηση των ωοθυλακίων που παρατηρήθηκε σε πειραματικά μοντέλα (64) ή η επιβίωση των ωοθυλακίων του άντρου (η οποία είναι σπάνια, επειδή δεν είναι ανθεκτικά στην ψύξη) να είναι υπεύθυνη για την ταχεία αποκατάσταση της ωοθηκικής δραστηριότητας που παρατηρείται σε ορισμένες, αν και λίγες, περιπτώσεις.

Πράγματι, στην αρχική περίοδο που ακολουθεί μετά τη διαδικασία εμφύτευσης (σε ένα πειραματικό μοντέλο), έχουν παρατηρηθεί σημαντικά υψηλότεροι αριθμοί πρωτογενών και δευτερογενών θυλακίων σε θραύσματα μοσχεύματος από ό, τι σε φρέσκο ιστό (64). Το υποξικό stress και η έλλειψη AMH σε μοσχεύματα των ωοθηκών κατά τη στιγμή της μεταμόσχευσης προκαλούν την ενεργοποίηση των ωοθυλακίων και την ανάπτυξη, και μόνο η AMH που παράγεται αργότερα από δευτερογενή θυλάκια ασκεί ανασταλτικό αποτέλεσμα επί της ενεργοποίησης των ωοθυλακίων (65) (Εικ. 4).



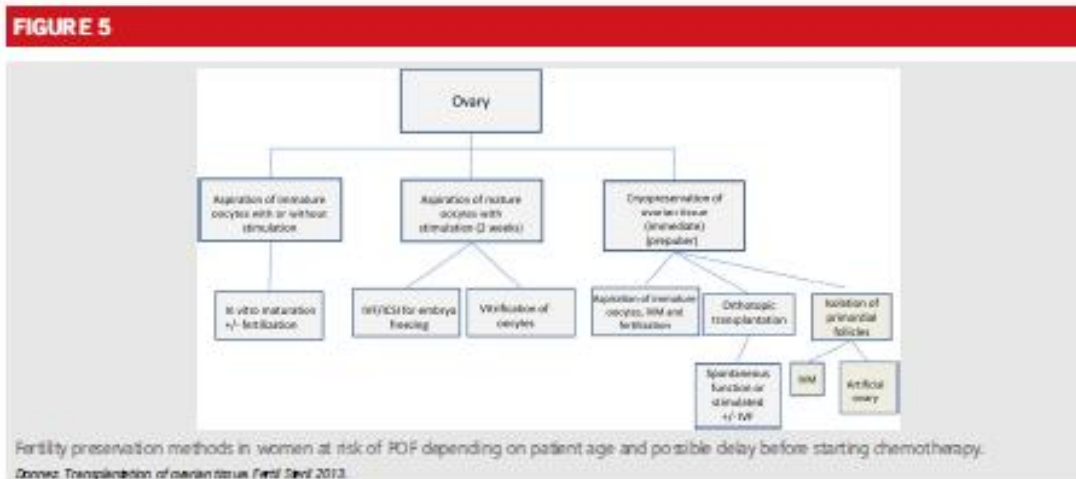
Υπάρχουν μεμονωμένες παραλλαγές στη διάρκεια της ενδοκρινικής λειτουργίας μετά την μεταμόσχευση. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται ότι η διάρκεια ζωής των ωοθηκικών μοσχευμάτων είναι περισσότερη από το αναμενόμενο. Έχει αναφερθεί ότι η λειτουργία των ωοθηκών μπορεί να παραμείνει για 7 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση νωπού ή κρυοδιατηρημένου ωοθηκικού ιστού, αλλά θα πρέπει να θεωρούμε ότι η μέση διάρκεια είναι 4-5 χρόνια, αν η πυκνότητα των ωοθυλακίων είναι καλά διατηρημένη (1, 3, 26, 32, 55, 56, 71).

Δείκτες ωοθηκικής λειτουργίας έχουν περιορισμένη αξία μετά τη μεταμόσχευση (72). Πράγματι, η AMH παραμένει μη ανιχνεύσιμη και τα επίπεδα της ανασταλίνης-β βρέθηκαν να είναι χαμηλά και να ποικίλουν μεταξύ των ατόμων. Βρέθηκε ότι οι τιμές της AMH και της ανασταλίνης-β δεν συνδέονται με τη διάρκεια της λειτουργίας του ωοθηκικού μοσχεύματος ή την πιθανότητα επίτευξης εγκυμοσύνης (72). Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη μακροζωία του ωοθηκικού μοσχεύματος, οι οποίοι περιλαμβάνουν: 1) το αποθεματικό των ωοθηκών (πυκνότητα ωοθυλακίων, η οποία εξαρτάται από την ηλικία), 2) τη χημειοθεραπεία πριν από την κρυοσυντήρηση, 3) το μέγεθος του μοσχεύματος και τη μέθοδο προετοιμασίας του ωοθηκικού ιστού (κατάψυξη - τεχνικές απόψυξης), 4) την ανομοιογενή κατανομή ωοθυλακίων σε κομμάτια μοσχεύματος φλοιού, και 5) το αγγειογόνο δυναμικό της θέσεως μοσχεύματος που επηρεάζει το βαθμό της ισχαιμίας μετά τη μεταμόσχευση.

Είναι ενδιαφέρον ότι, οι Poirot et al (73) και η ομάδα Andersen (74) ήταν σε θέση να επάγουν την εφηβεία με επανεμφύτευση κατεψυγμένου - αποψυγμένου προεφηβικού ωοθηκικού ιστού σε δύο νεαρά κορίτσια, αποδεικνύοντας ότι ωοθηκικός ιστός που υποβλήθηκε σε βιοψία και κρυοσυντήρηση πριν από την εφηβεία είναι λειτουργικά φυσιολογικός μετά την επανεμφύτευση, τουλάχιστον από την άποψη ενδογενούς παραγωγής στεροειδών. Η νέα αυτή εξέλιξη θα πρέπει, ωστόσο, να επικυρωθεί στο μέλλον.

## ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Παρά το γεγονός ότι υπήρξαν "μόνο" 24 μωρά που γεννήθηκαν χρησιμοποιώντας αυτή την μέθοδο κατά την τελευταία δεκαετία, η επανεμφύτευση κατεψυγμένου-αποψυγμένου ωοθηκικού ιστού δεν θα πρέπει πλέον να θεωρείται ως πειραματική διαδικασία (Πίνακας 3). Είναι δύσκολο να πραγματοποιήσουμε στατιστικές αναλύσεις σχετικά με την αποτελεσματικότητα της τεχνικής, επειδή ένας περιορισμένος αριθμός γυναικών έχουν υποστεί αυτομεταμόσχευση ωοθηκικού ιστού σε σύγκριση με τον αριθμό των ασθενών που είχαν ιστό τους σε κρυοσυντήρηση. Στην παρούσα ανασκόπηση, αναλύοντας τα αποτελέσματα του Andersen, του Pellicer, καθώς και του Donnez, 11 ασθενείς από τις 60 συνέλαβαν, και 6 από αυτές έχουν ήδη γεννήσει 12 υγιή μωρά.



Η συλλογή ωοθηκών θα μπορούσε επίσης να οδηγήσει στην ανάπτυξη πρόσθετων τεχνικών για τη διατήρηση της γονιμότητας (82). Αν η χημειοθεραπεία μπορεί να καθυστερήσει, η υαλοποίηση των ώριμων ωοκυττάρων ή η κατάψυξη εμβρύου (εφόσον το σπέρμα είναι διαθέσιμο) θα μπορούσε να ξεκινήσει αμέσως μετά την κρυοσυντήρηση του ωοθηκικού ιστού (Εικ. 5). Εάν υπάρχει κίνδυνος μετάδοσης των κακοθών κυττάρων, όπως στην περίπτωση της λευχαιμίας (83-86), η απομόνωση των αρχέγονων ωοθυλακίων ακολουθούμενη από μεταμόσχευση ενός αλγινικού πλέγματος Matrigel που περιέχει απομονωμένα κύτταρα των ωοθηκών θα μπορούσε να προβλεφθεί υπό το φως της εν εξελίξει έρευνας στο πεδίο αυτό, ως μία από τις κύριες γραμμές της έρευνας για το μέλλον (87). Πράγματι, τα επόμενα χρόνια, ψάχνουμε κυρίως τα εξής:

1) η βελτίωση των τεχνικών κατάψυξης και

2) να βελτιωθεί η «αγγειακή κλίση» πριν από την επανεμφύτευση ώστε να αυξηθούν τα ποσοστά κυήσεων.

Από την άλλη πλευρά, η κρυοσυντήρηση του ωοθηκικού ιστού μπορεί να συνδυάζεται με αφαίρεση, μέσω παρακέντησης, μικρών ωοθυλακίων του άντρου (antral follicles), καθιστώντας δυνατή την κατάψυξη τόσο του ωοθηκικού ιστού όσο και απομονωμένων ανώριμων ωοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που υπάρχουν στο μέσο των εκτομών όταν τα θραύσματα των ωοθηκών παράγονται και πρόδρομα ωοθυλάκια του άντρου (preantral follicles) είναι παρόντα στο μυελό της ωοθήκης (ovarian medulla), όπου μπορεί να είναι ιδιαίτερα άφθονα (78, 88, 89).

Εν κατακλείδι, από την πρώτη γέννηση ζωντανού εμβρύου μετά από ορθοτοπική μεταμόσχευση κατεψυγμένου-αποψυγμένου ωοθηκικού ιστού (30), 24 μωρά έχουν γεννηθεί (Πίνακας 3). Είναι καιρός να εξετάσουμε τη διατήρηση της γονιμότητας σε γυναίκες ως μία από τις σπουδαιότερες προκλήσεις της επόμενης δεκαετίας και να προσφέρουμε στις γυναίκες που αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο προκαλούμενης ή ιατρογενούς πρόωρης εμμηνόπαυσης, καλύτερες πιθανότητες να γίνουν μητέρες (Εικ. 5).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update* 2006;12:519-35.
2. Jadoul P, Donnez J. How does bone marrow transplantation affect ovarian function and fertility? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012;24:164-71.
3. Donnez J, Jadoul P, Squifflet J, Van Langendonck A, Donnez O, van Eyck AS, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 2010;24:87-100.
4. Wallace WH, Thomson AB, Saran F, Kelsey TW. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:738-44.
5. Schmidt KT, Rosendahl M, Ernst E, Loft A, Andersen AN, Dueholm M, et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in 12 women with chemotherapy-induced premature ovarian failure: the Danish experience. *Fertil Steril* 2011;95:695-701.
6. Anderson RA, Wallace WHB. Antimüllerian hormone, the assessment of the ovarian reserve and the reproductive outcome of the young patient with cancer. *Fertil Steril* 2013;99:1469-75.

7. Wallace WHB, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 2005;6:209–19.
8. Meirou D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 2001;7:535–43.
9. Teinturier C, Hartmann O, Valteau-Couanet D, Benhamou E, Bougneres PF. Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: high-dose busulfan is a major cause of ovarian failure. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:989–94.
10. Jadoul P, Anckaert E, Dewandeleer A, Steffens M, Dolmans MM, Vermeylen C, et al. Clinical and biologic evaluation of ovarian function in women treated by bone marrow transplantation for various indications during childhood or adolescence. *Fertil Steril* 2011;96:126–133.e3.
11. Cobo A, Garcia-Velasco JA, Domingo J, Remohí J, Pellicer A. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients? *Fertil Steril* 2013;99:1485–95.
12. Bedoschi G, Oktay K. Current approach to fertility preservation by embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 2013;99:1496–502.
13. Greve T, Schmidt KT, Kristensen SG, Ernst E, Andersen CY. Evaluation of the ovarian reserve in women transplanted with frozen and thawed ovarian cortical tissue. *Fertil Steril* 2012;97:1394–8.
14. Schmidt KTL, Larsen EC, Yding Andersen C, Nyboe Andersen A. Risk of ovarian failure and fertility preserving methods in girls and adolescents with a malignant disease. *British J Obstet Gynaecol* 2010;117:163–74.
15. Brougham MF, Wallace WH. Subfertility in children and young people treated for solid and haematological malignancies. *Br J Haematol* 2005; 131:143–55.
16. Poirot CJ, Martelli H, Genestie C, Golmard JL, Valteau-Couanet D, Helardot P, et al. Feasibility of ovarian tissue cryopreservation for prepubertal females with cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2007;49:74–8.
17. Michaeli J, Weintraub M, Gross E, Ginosar Y, Ravitsky V, Eizenman E, et al. Fertility preservation in girls. *Obstet Gynecol Int* 2012;2012:139–93.
18. Martin JR, Patrizio P. Options for fertility preservation in pediatric populations undergoing cancer chemotherapy. *Pediatr Endocrinol Rev* 2009;6:306–14.
19. Sauvat F, Binart N, Poirot C, Sarnacki S. Preserving fertility in prepubertal children. *Horm Res* 2009;71:82–6.
20. Jadoul P, Dolmans MM, Donnez J. Fertility preservation in girls during childhood: is it feasible, efficient and safe and to whom should it be proposed? *Hum Reprod Update* 2010;16:617–30.
21. Anderson RA, Wallace WH, Baird DT. Ovarian cryopreservation for fertility preservation: indications and outcomes. *Reproduction* 2008;136:681–9.
22. Feigin E, Abir R, Fisch B, Kravarusic D, Steinberg R, Nitke S, et al. Laparoscopic ovarian tissue preservation in young patients at risk for ovarian failure as a result of chemotherapy/irradiation for primary malignancy. *J Pediatr Surg* 2007;42:862–4.
23. Revel A, Revel-Vilk S, Aizenman E, Porat-Katz A, Safran A, Ben-Meir A, et al. At what age can human oocytes be obtained? *Fertil Steril* 2009;92:458–63.
24. Oktay K, Oktem O. Fertility preservation medicine: a new field in the care of young cancer survivors. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:267–73.
25. Borgstrom B, Hreinsson J, Rasmussen C, Sheikh M, Fried G, Keros V, et al. Fertility preservation in girls with Turner syndrome: prognostic signs of the presence of ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94: 74–80.
26. Donnez J, Silber S, Andersen CY, Demeestere I, Piver P, Meirou D, et al. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births. *Ann Med* 2011;43:437–50.
27. Silber SJ, Lenahan KM, Levine DJ, Pineda JA, Gorman KS, Friez MJ, et al. Ovarian transplantation between monozygotic twins discordant for premature ovarian failure. *N Engl J Med* 2005;353:58–63.
28. Sanchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escrivá MJ, Simón C. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril* 2010;93:268.e11–3.
29. Schmidt KLT, Yding Andersen C, Starup J, Loft A, Byskov AG, Nyboe Andersen A. Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer. Follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. *Reprod Biomed Online* 2004;8:448–53.
30. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405–10.
31. Donnez J, Jadoul P, Pirard C, Hutchings G, Demylle D, Squifflet J, et al. Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease. *Fertil Steril* 2012;98:720–5.
32. Schmidt KLT, Yding Andersen C, Loft A, Byskov AG, Ernst E, Nyboe Andersen A. Follow up of ovarian function post chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. *Hum Reprod* 2005;20: 3539–46.
33. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist* 2007;12:1437–42.
34. Piver P, Amiot C, Agnani G, Pech J, Rohrlach PS, Vidal E, et al. Two pregnancies obtained after a new technique of autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. In: 25th Annual Meeting of ESHRE, June 28–July 1, 2009. Amsterdam, The Netherlands: Hum Reprod; 2009:115.
35. Roux C, Amiot C, Agnani G, Aubard Y, Rohrlach PS, Piver P. Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Fertil Steril* 2010;93:2413.e15–9.
36. Donnez J, Squifflet J, Van Eyck AS, Demylle D, Jadoul P, Van Langendonck A, et al. Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience. *Reprod Biomed Online* 2008;16:694–704.
37. Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril* 2010;94:2191–6.
38. Meirou D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E, et al. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod* 2007;22:1626–33.
39. Kitajima M, Defrere S, Dolmans MM, Colette S, Squifflet J, Van Langendonck A, et al. Endometriomas as a possible cause of reduced ovarian reserve in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2011;96: 685–91.
40. Rosendahl M, Schmidt KT, Ernst E, Rasmussen PE, Loft A, Byskov AG, et al. Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark—an overview of the technique. *Reprod Med Online* 2011;22:162–71.
41. Ernst E, Bergholdt S, Jorgensen JS, Andersen CYCA. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 2010;25:1280–1.
42. Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011;23:160–86.
43. Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, Zelinski MB. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Hum Reprod* 2011;26:2461–72.
44. Keros V, Xella S, Hulthenby K, Pettersson K, Sheikh M, Volpe A, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009;24:1670–83.
45. Xiao Z, Wang Y, Li L, Luo S, Li SW. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. *Fertil Steril* 2010;94:2323–8.
46. Gook DA, Edgar DH. Cryopreservation of the human female gamete: current and future issues. *Hum Reprod* 1999;14:2938–40.
47. Gook DA, Edgar DH, Stern C. The effects of cryopreservation regimens on the morphology of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169: 99–103.
48. Nottola S, Camboni A, Van Langendonck A, Demylle D, Macchiarelli G, Dolmans MM, et al. Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertil Steril* 2008;90:23–32.
49. Amorim CA, Dolmans MM, David A, Jaeger J, Vanacker J, Camboni A, et al. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertil Steril* 2012;98: 1291–8.e1–2.

50. Amorim CA, Van Langendonck A, David A, Dolmans MM, Donnez J. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Hum Reprod* 2009;24:92–9.
51. Amorim CA, David A, Dolmans MM, Camboni A, Donnez J, Van Langendonck A. Impact of freezing and thawing of human ovarian tissue on follicular growth after long-term xenotransplantation. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:1157–65.
52. Fahy GM, Wowk B, Wu J, Phan J, Rasch C, Chang A, et al. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology* 2004;48:157–78.
53. Amorim C, Jacobs S, Devireddy R, Van Langendonck A, Vanacker J, Jaeger J, et al. Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Hum Reprod*. In press.
54. Oktay K, Economos K, Kan M, Rucinski J, Veeck L, Rosenwaks Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA* 2001;286:1490–3.
55. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2012;26:391–405.
56. Kim SS. Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:489–93.
57. Dolmans MM, Donnez J, Camboni A, Demylle D, Amorim C, Van Langendonck A, et al. IVF outcome in patients with orthotopically transplanted ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009;24:2778–87.
58. Meirou D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005;353:318–21.
59. Camboni A, Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A. Autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a young woman: ultrastructure and viability of grafted tissue. *Fertil Steril* 2008;90:1215–8.
60. David A, Dolmans MM, Van Langendonck A, Donnez J, Amorim CA. Immunohistochemical localization of growth factors after cryopreservation and 3 weeks' xenotransplantation of human ovarian tissue. *Fertil Steril* 2011;95:1241–6.
61. van Eyck AS, Jordan B, Gallez B, Heilier JF, Van Langendonck A, Donnez J. Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. *Fertil Steril* 2009;92:374–81.
62. van Eyck AS, Bouzin C, Feron O, Romeu L, Van Langendonck A, Donnez J, et al. Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. *Fertil Steril* 2010; 93:1676–85.
63. Donnez J. Strategies to improve the graft survival. In: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> World ISFP Congress, Miami, 2012.
64. Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Gadisseux E, Van Langendonck A, Camboni A, Coupe A, et al. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction* 2007; 134:253–62.
65. David A, Van Langendonck A, Gilliaux S, Dolmans MM, Donnez J, Amorim CA. Effect of cryopreservation and transplantation on the expression of Kit ligand and anti-müllerian hormone in human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2012;27:1088–95.
66. des Rieux A, Ucakar B, Mupendwa BP, Colau D, Feron O, Carmeliet P, Pr\_eat V. 3D systems delivering VEGF to promote angiogenesis for tissue engineering. *J Control Release* 2011;150:272–8.
67. Dath C, Dethy A, Van Langendonck A, van Eyck AS, Amorim CA, Luycckx V, et al. Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells. *Hum Reprod* 2011;26:1431–9.
68. Friedman O, Orvieto R, Fisch B, Felz C, Freud E, Ben-Haroush A, et al. Possible improvements in human ovarian grafting by various host and graft treatments. *Hum Reprod* 2012;27:474–82.
69. Delgado-Rosas F, Gayt\_an M, Morales C, G\_omez R, Gayt\_an F. Superficial ovarian cortex vascularization is inversely related to the follicle reserve in normal cycling ovaries and is increased in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2009;24:1142–51.
70. von Wolff M, Donnez J, Hovatta O, Keros V, Maltaris T, Montag M, et al. 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;45:1547–53.
71. Andersen CY, Silber SJ, Berghold SH, Jorgensen JS, Ernst E. Long-term duration of function of ovarian tissue transplants: case reports. *Reprod Biomed Online* 2012;25:128–32.
72. Janse F, Donnez J, Anckaert E, de Jong FH, Fauser BC, Dolmans MM. Limited value of ovarian function markers following orthotopic transplantation of ovarian tissue after gonadotoxic treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:1136–44.
73. Poirot C, Abirached F, Prades M, Coussieu C, Bernaudin F, Piver P. Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2012;379:588.
74. Ernst E, Kjærsgaard M, Birkebæk NH, Clausen N, Andersen CY. Case report: Stimulation of puberty in a girl with chemo- and radiation therapy induced ovarian failure by transplantation of a small part of her frozen/thawed ovarian tissue. *Eur J Cancer* 2013;49:911–4.
75. Silber SJ, DeRosa M, Pineda J, Lenahan K, Grenia D, Gorman K, et al. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum Reprod* 2008; 23:1531–7.
76. Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG, Loft A, Ottosen C, Dueholm M, et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 2008;23:2266–72.
77. 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.
78. Revel A, Laufer N, Ben Meir A, Lebovich M, Mitrani E. Micro-organ ovarian transplantation enables pregnancy: a case report. *Hum Reprod* 2011;26: 1097–105.
79. Dittrich R, Lotz L, Keck G, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, et al. Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. *Fertil Steril* 2012;97:387–90.
80. Revelli A, Marchino G, Dolfini E, Molinari E, Delle Piane L, Salvagno F, et al. Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy. *Fertil Steril* 2013;99:227–30.
81. García Rada A. Spanish woman becomes pregnant through ovarian tissue transplantation. *BMJ* 2012;344:d8350.
82. Grynberg M, Poulain M, Sebag-Peyrelevede S, le Parco S, Fanchin R, Frydman N. Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. *Fertil Steril* 2012;97:1260–8.
83. Dolmans M-M, Luycckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil Steril* 2013;99:1513–21.
84. Dolmans MM, Marinescu C, Saussoy P, Van Langendonck A, Amorim C, Donnez J. Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. *Blood* 2010;116: 2908–14.
85. Dolmans MM. Safety of ovarian autotransplantation. *Blood* 2012;120: 4275–6.
86. Greve T, Clasen-Linde E, Andersen MT, Andersen MK, Sørensen SD, Rosendahl M, et al. Cryopreserved ovarian cortex from patients with leukemia in complete remission contains no apparent viable malignant cells. *Blood* 2012;120:4311–6.
87. Vanacker J, Luycckx V, Dolmans MM, des Rieux A, Jaeger J, Van Langendonck A, et al. Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. *Biomaterials* 2012;33:6079–85.
88. Revel A, Koler M, Simon A, Lewin A, Laufer N, Safran A. Oocyte collection during cryopreservation of the ovarian cortex. *Fertil Steril* 2003; 79:1237–9.
89. Kristensen SG, Rasmussen A, Byskov AG, Andersen CY. Isolation of pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue. *Hum Reprod* 2011;26: 157–66.