

Onkofertilita – perspektivy a komplikace

Igor Crha^{1,2}, Martin Huser¹, Jana Žáková¹

¹Gynekologicko-porodnická klinika Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a FN Brno

²Katedra porodní asistence a zdravotnických záchranářů Lékařské fakulty Masarykovy univerzity

Současné metody asistované reprodukce je možné využít pro ochranu reprodukce onkologických pacientů. Základem je dobrá informovanost a spolupráce onkologů s centrem asistované reprodukce, které je schopné zajistit potřebné výkony včetně operačních. Pro ochranu reprodukce mužů je základem kryokonzervace spermatu. U žen je možné využít blokádu ovarií analogy gonadoliberinu, ovariální stimulaci s odběrem a zamražením oocytů nebo embryí, případně odběr a kryokonzervaci kůry ovarií s její následnou autotransplantací.

Klíčová slova: onkofertilita, chemoterapie, asistovaná reprodukce, vitrification.

Oncofertility – perspectives and complications

Current assisted reproduction techniques can be used to protect reproductive functions of oncological patients. The key factors towards successful clinical implementation of these methods are good awareness and collaboration between clinical oncologists and the assisted reproduction center with established reproductive protection program including surgical interventions on ovaries and testes. Sperm cryopreservation represents the basic technique to protect the reproduction of men. The recognized fertility preservation methods available for women are ovarian suppression with gonadoliberein analogues, ovarian stimulation with oocytes and embryos collection and subsequent cryopreservation or ovarian cortex tissue collection and cryopreservation.

Key words: oncofertility, chemotherapy, assisted reproduction, vitrification.

Úvod

Jedním ze závažných dlouhodobých následků moderní protinádorové léčby je poškození reprodukčních funkcí u mladých žen i mužů. Jejich ochrana se proto stala důležitou součástí komplexní péče o pacienty s onkologickým onemocněním. Gonadotoxická léčba je aplikována nejen v terapii maligních nádorů, ale také při léčbě závažných autoimunitních onemocnění. Je proto důležité bránit poškození zárodečných tkání také v těchto případech.

Problematika ochrany plodnosti onkologických pacientů je náplní nového medicínského směru označovaného jako onkofertilita. Tento termín byl zaveden do odborné terminologie již v roce 2003 skupinou odborníků vedených profesorkou Woodruff z Chicaga, byl akceptován a pro svoji výstižnost se celosvětově rozšířil.

Ochrana reprodukčních funkcí má výrazný mezioborový charakter. Základem je úzká spolupráce onkologického centra s centrem asistované reprodukce, které je schopné zajistit potřebné výkony včetně výkonů operačních. Byla tak vytvořena centra reprodukční ochrany, která poskytují konzultaci a léčbu pacientům s nově diagnostikovaným onkologickým onemocněním. Na našem pracovišti bylo Centrum reprodukční ochrany založeno již v roce 2009 (1). Předpokladem spolupráce je dobrá informovanost pracovníků onkologických center o současných možnostech zachování fertility a pravidlech odesílání pacientů do příslušného centra. Lékaři asistované reprodukce s onkology konzultují možné léčebné postupy, především jejich časovou náročnost, a s tím spojené možné riziko oddálení chemoterapie. Cílem této práce

je uvést přehled současných léčebných postupů a metod, které se při ochraně fertility mužů a žen využívají včetně možných komplikací.

Metody reprodukční ochrany u mužů

Poškození varlete patří k nejčastějším dlouhodobým vedlejším účinkům chemoterapie. Zárodečný epitel je výrazně vnímavější na poškození cytotoxickými léky než Leydigovy buňky. První práci popisující azoospermii po chemoterapii publikoval Spitz (2) již v roce 1948. Z hlediska reprodukce je mnohem závažnější alterace spermatogeneze než produkce testosteronu. Rozsah testikulární dysfunkce závisí na použitém léku a jeho dávce. Nejvyšší gonadotoxický účinek mají alkylační látky. Důležitým faktorem je také stav spermatogeneze před zahájením

Tab. 1. Přehled povinných vyšetření a informovaných souhlasů před kryokonzervací spermatu. Vyšetření musí být provedena **pouze** v laboratořích s povolením k činnosti od SÚKL!!

| AIDS | HIV 1, 2 |
|----------------------|---|
| Syfilis | RRR, TPHA |
| Hepatitidy | HBsAG, anti-HBc, anti-HCV |
| Informované souhlasy | „Žádost o kryoprezervaci ejakulátu a skladování spermií“ „Smlouva o skladování spermií“ |

Tab. 2. Současné platné parametry normospermie dle „WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen“ z roku 2010

| | |
|-----------------------|-------------|
| Objem | ≥ 1,5 ml |
| Koncentrace | ≥ 15 mil/ml |
| Celkový počet spermií | ≥ 39 mil |
| Progresivní pohyb | ≥ 32 % |
| Celkový pohyb | ≥ 40 % |
| Normální morfologie | ≥ 4 % |
| Živé spermie | ≥ 58 % |

vlastní terapie – u mužů se zhoubným onemocněním byly prokázány výrazné patologie spermatu v porovnání se zdravými muži. Tyto změny jsou vysvětlovány celkovou alterací organismu a supresivním vlivem některých faktorů, které zhoubné tumory produkují. Pro pacienty s nádorem varlete jsou nejtěžší poruchy spermatogeneze typické (azoospermie je prokazována ve více než 20 % již před léčbou). Z toho vyplývá také vhodnost cíleného urologického vyšetření na vyloučení zhoubného nádoru varlete u mužů s těžkými patologiemi spermiogramu – v řadě případů je tak možné zachytit do té doby skrytý maligní proces (3).

Cytotoxická léčba kromě poškození spermatogeneze a steroidogeneze může vést také k poškození genetické informace ve spermiích. Avšak při hodnocení zdravotního stavu dětí narozených mužům po léčbě zhoubného onemocnění nebylo prokázáno zvýšení geneticky podmíněných vrozených vad, vliv na porodní váhu ani změna poměru mezi počtem narozených chlapců a dívek. Z dostupných důkazů vyplývá závěr, že u pacientů, kteří byli léčeni cytotoxickou chemoterapií a kteří zůstali plodní, není signifikantně zvýšené riziko vrozených genetických vad u potomstva (1).

K neúčinnějším a praxí ověřeným postupům, jak uchovat fertilitu muže vystaveného léčbě spojené s vysokým rizikem poškození zárodečné tkáně, patří zamražení a dlouhodobé uchování spermatu – a to před zahájením vlastní terapie. Důležitá je dobrá spolupráce pracoviště

provádějícího léčbu zhoubného nádoru s akreditovaným centrem asistované reprodukce, které je schopné zajistit kvalitní kryokonzervaci a potřebnou péči v budoucnosti.

Sperma obsahující spermie se smíchá s kryoprotektivním médiem, rozdělí do jednotlivých dávek, zmrazí dle odpovídajícího protokolu na kryokonzervačním zařízení a přenesení do skladovacího kontejneru s tekutým dusíkem. Nezbytná je adekvátní dokumentace (4) a pro dlouhodobé skladování spermatu je neocenitelná spolupráce s tkáňovou bankou (tabulka 1).

Při kryokonzervaci spermatu onkologických pacientů je nutné počítat s výrazně sníženou kvalitou spermatu – velmi často jsou parametry spermiogramu (tabulka 2) výrazně sníženy, normospermiků je jen malý počet. Důležitá je informovanost pacienta o daném výkonu a především o postupu v budoucnosti – zajištění odpovídajících vyšetření a potřebné léčby v době, kdy bude plánovat založení rodiny.

Ochrana genitálu při radioterapii patří k základním, ale někdy opomíjeným postupům především u ozařování abdominální oblasti. U pacientů ozařovaných bez zastínění gonád byly prokázány výrazné patologie spermatu.

Na našem pracovišti jsme zahájili zamrazování spermií před chemoterapií ve spolupráci s interní hematologickou klinikou a urologickou klinikou FN Brno již v roce 1995, postupně se ke spolupráci připojovala další onkologická zařízení. V posledních letech přicházelo na kryokonzervaci ročně asi 70 mužů. Pro dosažení těhotenství je nejúčinnější metoda intracytoplasmatická injekce spermie (ICSI), při které se do vajíčka přímo zavádí hlavička spermie (3).

Metody reprodukční ochrany u žen

Fertilitu ženy ovlivňuje mnoho faktorů – věk, expozice prostředí, radiačním a chemickým agens či lékařská intervence. Fertilita ženy souvisí s celkovou ovariální rezervou – množstvím folikulů v kůře vaječníku. Na rozdíl od spermatogeneze se od narození již nové oocyty netvoří, v reprodukčním období v jednotlivých, po sobě jdoucích vlnách dozrávají skupiny tzv. kohorty folikulů, ze kterých je selektován jeden ovulační folikul a ostatní zanikají. V současné době je možné ovariální rezervu vyšetřit buď stanovením AMH (Anti-müllerian hormon), nebo AFC. AMH je glykoprotein skupiny TGF-beta

(transforming growth factor), podílí se na růstu a diferenciaci tkání. Jedním z jeho účinků, který mu dal název, je potlačení vývoje Müllera vývodu embrya v přítomnosti varlete, jehož Sertolliho buňky AMH vytváří. V ovariu je AMH produkován v buňkách granulózy preantrálních a malých antrálních folikulů do velikosti 8 mm, v primordiálních folikulech prokázán nebyl. Bylo prokázáno, že většina AMH v krvi je produkována folikuly velikosti 5–8 mm. Folikuly větší než 10 mm AMH neprodukují. Sérové hladiny AMH dobře korelují s celkovou ovariální rezervou, byla také prokázána korelace AMH s ultrazvukově stanoveným počtem antrálních folikulů AFC (antral follicles count). Při nízké ovariální rezervě se také snižuje kvalita a životaschopnost oocytů. Od narození se hladina AMH postupně zvyšuje, po menarche dosahuje ustálených maximálních hodnot ve věku mezi 20–25 lety a následně klesá k neměřitelným hodnotám v období perimenopauzy a postmenopauzy. Stanovení AMH před zahájením chemoterapie a po ukončení dává informaci o dopadu léčby na ovariální rezervu.

Riziko rozvoje předčasného ovariálního selhání u žen po chemoterapii závisí na věku pacientky, typu použitého cytostatika a jeho celkové dávce. Reprodukční ochrana u žen je komplikovanější než u mužů, zejména z důvodu větší zranitelnosti oocytů a obtížnější metody jejich získávání z organismu ženy. Přesto existují účinné metody, které dávají šanci ženám na zachování fertility i po onkologické léčbě.

Farmakologická ochrana vaječníků během chemoterapie

Chemoterapie používaná v léčbě rakoviny působí zejména na pravidelně a rychle se množící buňky, mezi něž řadíme i zárodečné buňky vaječníků. Působením depotních injekčních léků tzv. analog GnRH (gonadotropin releasing hormone, např. triptorelin) je možné ovlivnit pravidelné dozrávání vajíček ve vaječníku a uvést vaječnický do klidového stadia, podobně jako u malých dívek či žen po přechodu. Zjistilo se, že folikuly ve vaječnicích ovlivněných těmito léky jsou méně citlivé na chemoterapii.

Výsledky studií prokázaly příznivý vliv aplikace GnRH analog v průběhu chemoterapie na funkci vaječníků a statisticky signifikantní snížení rizika předčasného ovariálního selhání v důsledku aplikace chemoterapeutik u žen léčených pro Hodgkinův lymfom. Výsledky byly lepší u méně

agresivních léčebných protokolů. Při použití vysokých dávek chemoterapeutik a u agresivních léčebných režimů (např. transplantace kostní dřeně) však bylo předčasné ovariální selhání i při farmakologické ochraně gonád velmi časté. Proto se v těchto případech doporučuje tuto metodu kombinovat s jinou formou ochranné léčby (5).

Dalším příznivým účinkem aplikace GnRH analog během chemoterapie je výrazná redukce intenzity a četnosti menstruačního krvácení či nepravidelného krvácení v souvislosti s pancytopenií, což snižuje nutnost aplikace krevních derivátů. Další výhodou tohoto postupu, který se postupně začíná dostávat do klinické praxe, je možnost kombinace s ostatními metodami ovariální ochrany – zejména laparoskopickým odběrem ovariální tkáně. Je nutné si uvědomit, že suprese ovariální funkce pomocí GnRH analog nastupuje až po 7–10 dnech po jejich aplikaci. Během této krátké doby dochází v důsledku flare-up fenoménu naopak k aktivaci folikulogeneze a tudíž ke zvýšení senzitivity ovaria k cytotoxickému účinku chemoterapie. Aplikaci GnRH analog je vhodné zahájit 10 dnů před začátkem chemoterapie, což vyžaduje dobrou koordinaci a mezioborovou spolupráci při plánování léčby. K možným komplikacím suprese ovarii patří výpadek potíže z nedostatku estrogenu – návaly horka, pocení, změna nálady.

Kryokonzervace oocytů/embryí

Kryokonzervace oocytů a embryí je v současnosti rutinní součástí cyklu *in vitro* fertilizace (IVF) a moderních metod asistované reprodukce (AR). Tento standardní postup může sloužit k uchování fertility ještě před zahájením onkologické léčby. Principem je ovariální stimulace a odběr oocytů (6). Pokud má žena perspektivního partnera, je možné oocyty oplodnit a zamrazit embrya. Je možné také zamrazit neoplozené oocyty. Ve srovnání se spermií (hlavička měří cca 5 µm) je oocyt mnohonásobně větší (v době ovulace v metafázi druhého zráčího dělení 150–180 µm) a obsahuje celou řadu buněčných organel (zejména mikrotubuly mitotického vřeténka) a zonu pellucidu, které jsou velmi citlivé na fyzikální a chemické změny prostředí. Klasické metody kryokonzervace oocytů nebyly proto příliš úspěšné. Výsledky zásadně zlepšila metoda ultra-rychlé kryokonzervace buněk a tkání – vitrifikace. Vitrifikace znamená přechod roztoku do pevného skupenství procesem ultra-rychlého ochlazení, kdy dojde k rychlému snížení jeho viskozity a nevytvoří se

ledové krystaly. Klíčem k úspěchu vitrifikace je zajistit vysokou rychlost mražení v pásmu teplot +15 až -5 °C pomocí kontaktu s velmi studeným médiem. Významnou výhodou vitrifikace je její technická jednoduchost a menší finanční nákladnost. Nevyžaduje investici do programovatelného mrazicího zařízení, které je nezbytné pro kryokonzervaci konvenčními metodami. Díky významným pokrokům v kryobiologii a embryologii jsou reprodukční výsledky při použití zamrazených oocytů srovnatelné s výsledky zamrazených embryí (7). Po ukončení onkologické léčby je možné embrya rozmrazit (případně rozmražené oocyty fertilizovat) a použít k embryotransferu (tzv. kryoembryotransfer, KET). Prvního těhotenství po KET v České republice bylo dosaženo na gynekologicko-porodnické klinice v Brně v březnu roku 1994.

Velmi důležitou **praktickou** otázkou je doba potřebná na stimulaci vaječníků před odběrem oocytů. Podmínkou je souhlas onkologů se zahájením chemoterapie až po provedení punkce ovarii. V současné době využíváme modifikované stimulační protokoly, které umožňují zahájení stimulace v kterékoliv fázi menstruačního cyklu, není nutné čekat na menses. Ve většině případů je možné stimulaci a odběr oocytů zvládnout do 14 dnů.

Nové protokoly zahájení ovariální stimulace vychází z fyziologie ovariálního cyklu. Představy o dynamice vývoje folikulů byly původně založeny na klasickém modelu z poloviny osmdesátých let 20. století. Podle této teorie na začátku folikulární fáze vstoupí do finální fáze růstu jediná kohorta antrálních folikulů, ze které je selektován dominantní folikul. V roce 2003 Baerwald (8) v průběhu jednoho menstruačního cyklu prokázal dvě až tři kohorty malých antrálních folikulů, které vstupují do finální fáze růstu. Pro ovariální stimulaci v klinické praxi je důležité mít na paměti tento rytmus jednotlivých kohort, které po sobě následují s časovým odstupem. Je proto možné získat kvalitní oocyty při zahájení stimulace v jakékoliv fázi menstruačního cyklu.

Specifická je ovariální stimulace u žen s karcinomem prsu (9, 10). Vlastní podávání gonadotropinů (FSH, LH, hCG) neovlivňuje růst epiteliálních buněk mléčné žlázy včetně buněk nádorově změněných (11). Estrogeny však patří k významným faktorům růstu u některých typů karcinomu prsu, proto je vhodné volit ovariální stimulaci, která vzestup estradiolu minimalizuje. Při standardní ovariální stimulaci se hladiny estradiolu zvyšují úměrně počtu rostoucích folikulů,

proto byly hledány a vypracovány bezpečnější postupy. Odběr oocytu v nestimulovaném cyklu má minimální úspěšnost – předpokladem je ovulační cyklus, získá se maximálně 1 oocyt a na opakování vzhledem k nutnosti zahájit chemoterapii není čas. Proto se dává přednost stimulovaným cyklům, ve kterých se zvýšenému působení estradiolu předchází podáváním inhibitorů aromatázy. Kombinovaný protokol ovariální stimulace s využitím inhibitorů aromatázy snižuje spotřebu gonadotropinů a má signifikantně nižší hladiny estradiolu než standardní cyklus IVF. Použití letrozolu blokovalo vzestup estradiolu účinněji než anastrozol. Prospektivní kontrolované studie žen s karcinomem prsu stimulovaných protokolem s FSH a letrozolem neprokázaly zhoršení dlouhodobých výsledků léčby karcinomu (12).

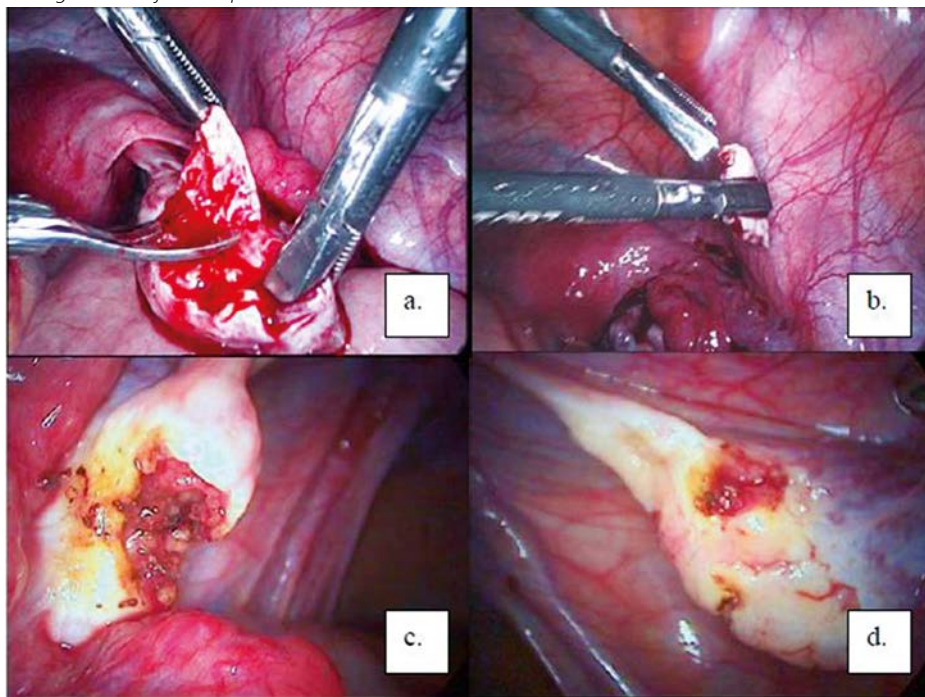
Velmi důležité je správné časování těhotenství – záleží především na průběhu onkologické léčby a stanovisku onkologa. Obecně platí vyčkat s těhotenstvím minimálně 2 roky od ukončení léčby, protože v tomto intervalu je riziko recidivy nejvyšší. Při léčbě tamoxifenem se doporučuje vyčkat minimálně 5 let. U žen s vysokým rizikem recidivy nebo s mutací genu BRCA 1, 2 je možným řešením náhradní mateřství. Před transferem je vhodné řešit případnou myomatózu dělohy (13). Řada studií pečlivě sledovala zdravotní stav žen a narozených dětí – zvýšení rizika recidivy karcinomu prsu nebo vrozených vad dětí nebylo prokázáno (14).

Možnou komplikací v souvislosti s ovariální stimulací je hyperstimulační syndrom (OHSS = ovarian hyperstimulation syndrom), který je charakterizován růstem velkého počtu folikulů, enormním zvětšením vaječniku, vznikem objemného ascitu, hydrothoraxu a změnami vnitřního prostředí včetně zvýšeného rizika trombofilních příhod. Toto riziko je možné minimalizovat individuálním nastavením dávky FSH dle hladiny AMH nebo dle AFC. U žen s vysokým AMH či AFC je riziko OHSS vysoké.

Kryokonzervace tkáně vaječníků

Jednou z možností ochrany zárodečné tkáně je odběr a kryokonzervace kortikální vrstvy ovarii. Takto získaná tkáň může být po vyléčení zhoubného onemocnění transplantována zpět do organismu ženy, dojde k obnově produkce ženských pohlavních hormonů a zrání vajíček, které je možné využít k oplození běžnými metodami asistované reprodukce.

Obr. 1. a/ Laparoskopický odběr kortexu pravého ovaria b/ odebraný vzorek c/ ovarium po odběru a koagulaci okrajů d/ biopsie levého ovaria



První pokusy o kryokonzervaci a transplantaci ovariální tkáně byly zahájeny již v polovině 20. století. Podmínkou úspěchu ale byl až rozvoj metod asistované reprodukce a kryobiologie na přelomu 20. a 21. století – první dítě po autotransplantaci kryokonzervované kůry ovaria se narodilo v roce 2004 v Belgii.

Odběr ovariální tkáně se provádí laparoskopicky, velikost odebraného vzorku je projednána s pacientkou. Je nutné vzít v úvahu velikost rizika režimu chemoterapie a také riziko odběru tkáně na ovariální rezervu. Nejčastěji se odebírá proužek kůry velikosti cca 10 × 20 mm a síly 1–2 mm (obrázek 1). Po odběru je neprodleně uložen do kultivačního média a v transportní komůrce s adekvátním prostředím (teplota, vlhkost) transportován do embryologické laboratoře. Vzorky jsou zde dále

zpracovány – rozřezány na tenké proužky velikosti cca 5 × 1 mm a připraveny ke kryokonzervaci. Zbytky stromální tkáně jsou odstraněny a odeslány na histologické vyšetření k vyloučení nádorové infiltrace. V současné době se používá metoda ultrarychlého zamrazení – vitrifikace s kvalitním vitrificačním médiem v kryptobách.

Transplantace může být provedena se svolením onkologa po vyléčení zhoubného nádoru. Nejčastěji se volí ortotopická transplantace do reziduálního ovaria nebo jeho bezprostředního okolí. Po šetrném rozmrazení se tenké proužky umístí a fixují pod peritoneum. Existuje také metoda heterotopické transplantace např. pod kůži předloktí. Ve světové literatuře již byly prezentovány desítky těhotenství a porodů po kryokonzervaci a autotransplantaci kůry ovarii (15).

Výhodou této metody je kratší doba potřebná na odběr tkáně než při stimulaci a odběru oocytů, i když při nových protokolech stimulace je v porovnání s dřívějšími protokoly výrazně zkrácena na cca 12–14 dnů. Nevýhodou je riziko poškození transplantované tkáně s folikuly hypoxií do doby, než dojde k jejímu adekvátnímu cévnímu zásobení. V České republice byl nedávno popsán případ, kdy po transplantaci kůry ovaria se sice obnovil menstruační cyklus, ale ani při opakovaných stimulacích pro IVF se nepodařilo získat žádný oocyt (16).

Závěr

Ochrana plodnosti při onkologické léčbě vyžaduje mezioborovou spolupráci celého týmu odborníků a také výraznou individualizaci použitých metod vedoucích k zachování reprodukčního potenciálu léčeného jedince. Je nutná úzká mezioborová spolupráce mezi onkology a pracovištěm asistované reprodukce s adekvátními zkušenostmi a vybavením pro potřebné výkony. Předpokladem je dobrá informovanost onkologů o současných možnostech ochrany reprodukce mladých mužů a žen a jejich odeslání na konzultaci do příslušného centra asistované reprodukce. Velmi důležitý je časový faktor, aby nedošlo ke zbytečnému prodloužení se zahájením onkologické léčby. Optimální spolupráci výrazně napomáhá vytvoření Centra ochrany reprodukce, které efektivně propojuje onkology, specialisty reprodukční medicíny a embryology. Cílem je seznámit pacienta s dostupnými možnostmi na záchranu reprodukčních funkcí, informovat o možných vedlejších účincích léčby a reálných šancích na úspěch. Na základě těchto validních informací se pacienti mohou rozhodnout o vlastní léčbě.

Vzniklo za podpory MH CZ - DRO (FNBr, 65269705).

LITERATURA

1. Huser M. Onkofertilita – nová oblast reprodukční medicíny. 1.ed. Praha: Mladá fronta a.s., 2014: 109 s.
2. Spitz S. The histological effects of nitrogen mustard on human tumours and tissues. *Cancer* 1948; 1: 383–398.
3. Crha I, Ventruba P, Žáková J, et al. Survival and infertility treatment in male cancer patients after sperm banking. *Fertil. Steril.* 2009; 91(6): 2344–2348.
4. Pokyny pro lékaře odesílající pacienty na zamrazení reprodukčních buněk dostupné na: <http://www.ivfbrno.cz>
5. Huser M, Smerdova L, Janku P, et al. Fertility status of Hodgkin lymphoma patients treated with chemotherapy and adjuvant gonadotropin-releasing hormone analogues. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015; 32(8): 1187–1193.
6. Ventruba P, Žáková J, Trávník P, et al. Aktuální otázky asistované reprodukce v České republice. *Čes. Gynek.* 2013; 78(4): 392–398.
7. Argyle CE, Harper JC, Davies MC. Oocyte cryopreservation: where are we now? *Hum. Reprod. Update* 2016; 22(4): 440–449.
8. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. *Fertil. Steril.* 2003; 80: 116–122.
9. Halászová N, Crha I, Huser M, et al. Zachování fertility u žen s karcinomem prsu před gonadotoxickou léčbou. *Čes. Gynek.* 2017; 82 (4): 287–292.
10. Weinberger V, Minář L, Bránčíková D. Moderní chirurgická a biologická léčba karcinomu prsu. *Čes. Gynek.* 2012; 77(6): 513–520.
11. Cooley A. Effect of infertility and pregnancy-related hormones on breast cell proliferation in vitro. *Human. Reprod.* 2012; 27: 146–152.
12. Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K. Safety of fer-

- tility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 2630–2635.
13. Hudeček R, Ivanová Z, Šmerdová M, et al. Vliv aplikace GnRH analogu na peroperační a postoperační výsledky myomektomie u žen v reprodukčním věku. *Čes. Gynek.* 2012; 77(2): 109–117.
14. Sergentanis TN, Diamantaras AA, Perlepe C, et al. IVF and breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 2014; 20(1): 106–123.
15. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015; 32(8): 1167–1170.
16. Mardesić T, Jelínková L, Melicharová L. Úspěšná transplantace ovariální tkáně u pacientky s ovariálním selháním po onkologické léčbě. *Čes. Gynek.* 2017; 82 (1): 38–41.