

Cryopreservatie ovariumweefsel

Gonneke Pilgram
Lucette van der Westerlaken
Klinisch embryologen

Leoni Louwe
Gynaecoloog

LEIDEN



Geen belangenverstrengeling te vermelden voor
G.S.K. Pilgram, L.A.J. van der Westerlaken en L.A. Louwe

Historie

- 1950 ovary cryopreservation in rodents, minimally successful
(Parkes 1952, Green 1956, Farron 1960)
- 1960 cryoprotectant Glycerol, ineffective (rodents)
- 1970 effective cryoprotectants e.g. DMSO (rodents)
- 1990 fresh/frozen ovarian tissue, fertility restoration (rodents)
(Cox1 1996, Harp 1994, Sztein 1996, Shaw 2000)
- 1990 transplantation cryopreserved ovarian tissue (sheep)
(Gosden 1994, Baird 1999, Aubard 1999)
- 1990 human ovarian tissue in SCID-xenograft model
(Candy 1995, Newton 1996, Revel 2000, Oktay 2000)
- 2000 avascular transplantation cryopreserved ovarian tissue (human)
(Oktay 2000)
- 2004 livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue
 (human)
(Donnez, 2004)
- 2018 Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity
 published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort (human)
(Gellert, 2018)

Historie van richtlijnen Nederland

2007

Cryopreservatie van ovariumweefsel

NVOG

Op verzoek NVOG en IKNL*

samengevoegd:

*IKNL: Integraal kankercentrum Nederland

2009

Behoud ovariële functie na
kankerbehandeling

Werkgroep oncologische gynaecologie

2016

**Richtlijn Fertiliteitsbehoud bij
vrouwen met kanker (409 bladzijden)**

www.oncoline.nl

www.richtlijndatabase.nl

Wettelijke eisen: Wet Veiligheid en Kwaliteit Lichaamsmateriaal (WVKL)

- Eisenbesluit lichaamsmateriaal 2006
- Richtlijn 2004/23/EG
- Richtlijn 2006/17/EG
- Richtlijn 2012/39/EU

 CIBG
Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport

> Retouradres Postbus 15114 2500 BC Den Haag

WVKL erkenning Orgaanbank
Eenheid: IVF-Laboratorium
Albinusdreef 2 2333 ZA te LEIDEN
Registratienummer: 6277 L/EO

Verantwoordelijke personen
Mevrouw dr. ir. L.A.J. van der Westerlaken

Type lichaamsmateriaal	Pre/postmortaal	Handelingen	Doelen	Aanwijzingen
Ovariumweefsel	☒ ☐	1,2,4	A	-
Eicel autoloog	☒ ☐	1,2,4	A	-
Eicel donor	☒ ☐	1,2,4	A	-
Embryo partnerdonatie	☒ ☐	1,2	A	-
Semen donor	☒ ☐	1,2,4	A	-
Semen partnerdonatie	☒ ☐	1,2,4	A	-

Handelingen
1. bewaren
2. bewerken
3. distribueren¹
4. in ontvangst nemen na verkrijgen

Doelen
A. directe toepassing op de mens
B. verdere verwerking tot geneesmiddel

Aanwijzingen
I. Exporteren
II. Importeren
III. Ontvangen uit een andere EU-lidstaat



Methoden van transport, invriezen en ontdooien

Cryopreservatie van ovariumweefsel

Aanbevelingen:

Uitgangsvraag

Wat is de meest geschikte (d.w.z. met zo weinig mogelijk viabiliteitsverlies van follikels, oöcyten en stromaal weefsel) laboratoriumprocedure om ovariumweefsel te transporteren, in te vriezen en te ontdooien, en welke viabiliteits-assays zijn het meest geschikt om deze procedure vast te stellen?

Aanbevelingen

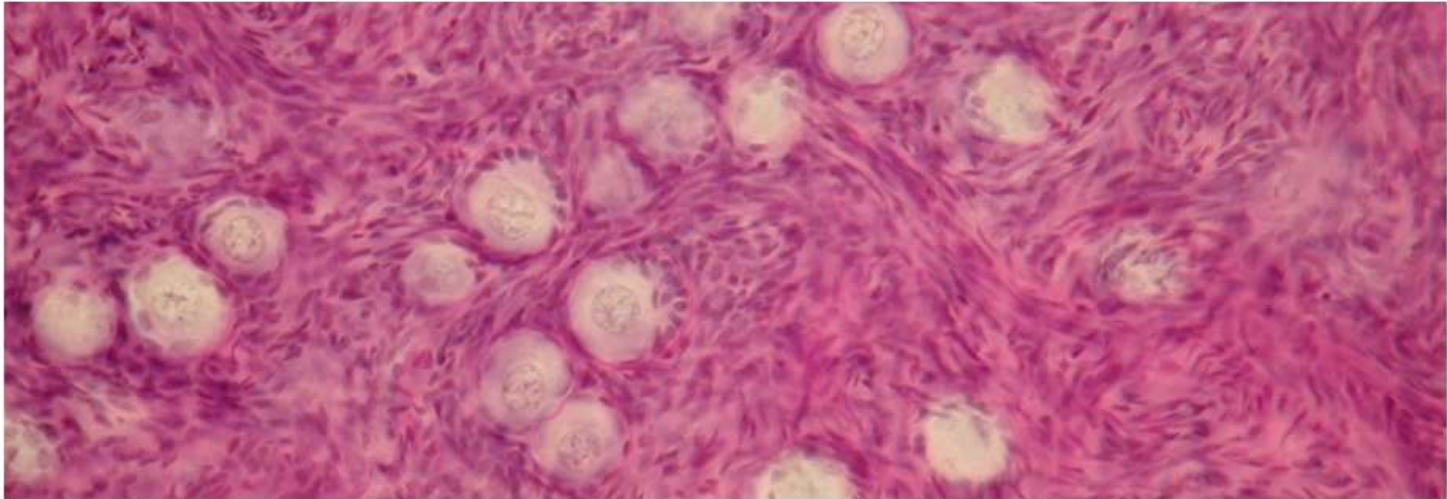
Er wordt geadviseerd om ovariumweefsel bij voorkeur binnen 4-5 uur, maar tot een maximum van 20 uur, op ijs te transporteren naar het laboratorium dat de invriesprocedure uitvoert.

Er wordt geadviseerd om ovariumweefsel m.b.v. de slow-freezing methode in te vriezen.

Er wordt geadviseerd om een viabiliteits-assay uit te voeren om de effectiviteit van de invries- en ontdooimethode te testen. Op dit moment kan (als gevolg van onvoldoende beschikbare data) geen voorkeur voor een bepaalde assay worden aangegeven.

Er wordt geadviseerd om de aanwezigheid van follikels in ovariumweefsel vast te stellen met behulp van histologisch onderzoek.

Er wordt geadviseerd om elke transplantatie van ingevroren/ontdooit ovariumweefsel bij een patiënt die eerder een maligniteit heeft gehad vooraf te laten gaan door uitgebreide informatie over de oncologische risico's aan de patiënt, onderzoek van een representatief deel van het ovariumweefsel op maligne cellen door histologie, immunohistochemie en zo mogelijk moleculair biologische technieken (PCR).



The Copenhagen Workshop on Cryopreservation of Ovarian Tissue

The Copenhagen Workshop on Cryopreservation of Ovarian Tissue is a three-day laboratory and lecture course designed for scientists (scientific as well as clinical fellows) who are interested in learning the technique behind the successful and well established Danish Cryopreservation Programme for Ovarian Tissue.



Keuze laboratorium protocol (2)

Kopenhagen:

- Invriesmedium: DMSO versus ethylene glycol

Percentage morfologisch normale follikels voor en na cryopreservatie

	Cryoprotectant solution			
	I	II	III	IV
Before	97 ± 0.5	97 ± 0.7	97 ± 0.8	97 ± 1.3
After	32 ± 11.0	31 ± 11.0	47 ± 11.0	63 ± 8.0

I = Leibowitz medium, 10% fetal calf serum (FCS) and 1.5 mol/l dimethylsulphoxide (DMSO);

II = Leibowitz medium, 10% FCS and 1.5 mol/l ethylene glycol;

III = phosphate-buffered saline (PBS), 0.1 mol/l sucrose and 1.5 mol/l DMSO;

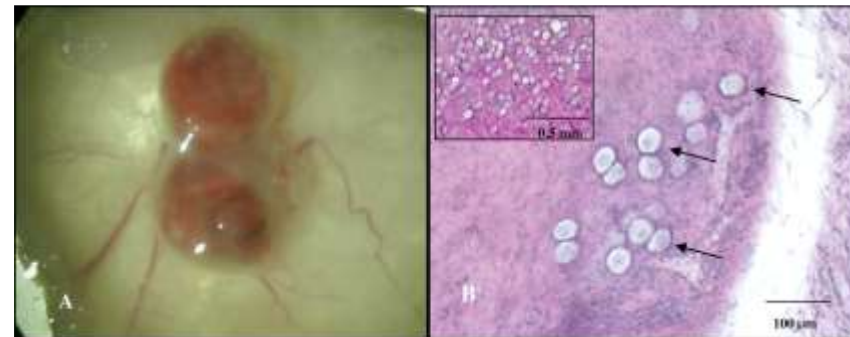
IV = PBS, 0.1 mol/l sucrose and 1.5 mol/l ethylene glycol.

- Viabiliteitsassay m.b.v. xenotransplantatie:

Aanwezigheid van vascularisatie

Aanwezigheid van morfologisch normale primordial follikels,
primaire en secundaire follikels

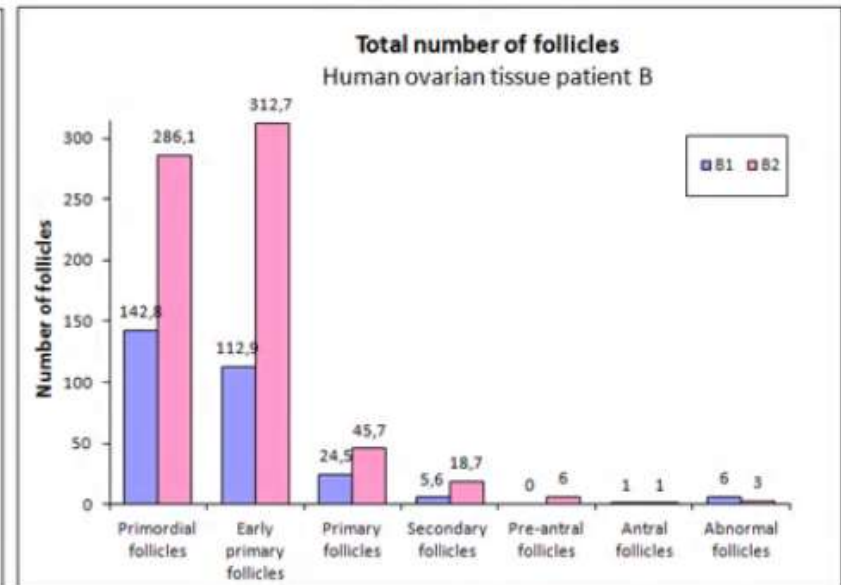
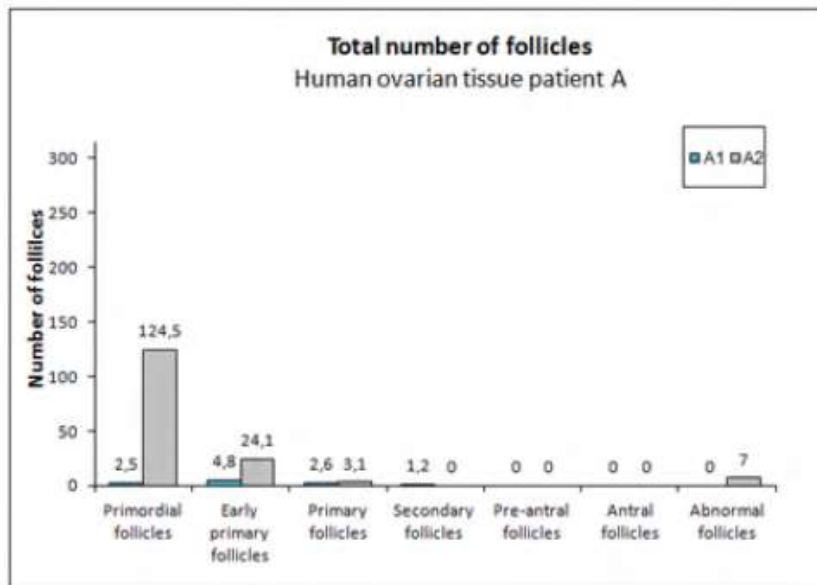
- Zwangerschappen na cryopreservatie



Keuze laboratorium protocol (3)

LUMC

Evaluatie aantal follikels na ontdooien



Keuze laboratorium protocol (4)

Viabiliteitsassay m.b.v. markers:

- 3 proliferatie markers (PCNA, Cdc-2 en Ki-67 antibodies)
- 2 apoptose markers (Cc3 en Tunel)

Resultaat:

Granulosa cellen in de follikels waren positief voor de proliferatie markers

Slechts minimale hoeveelheden van de apoptose markers zijn gedetecteerd

Conclusie:

Na cryopreservatie is het ovariumweefsel levensvatbaar

Aanmelding verzoek ovarium cryopreservatie

Risico POI

Metastase risico inschatten

Prognose patiënte

Informed consent patiënte (en ouders bij leeftijd <16 jaar)

Toestemming CME op indicatie

Iedereen voorbereid: lab, afdeling, OK

Risk of ovarian metastasis according to cancer type.

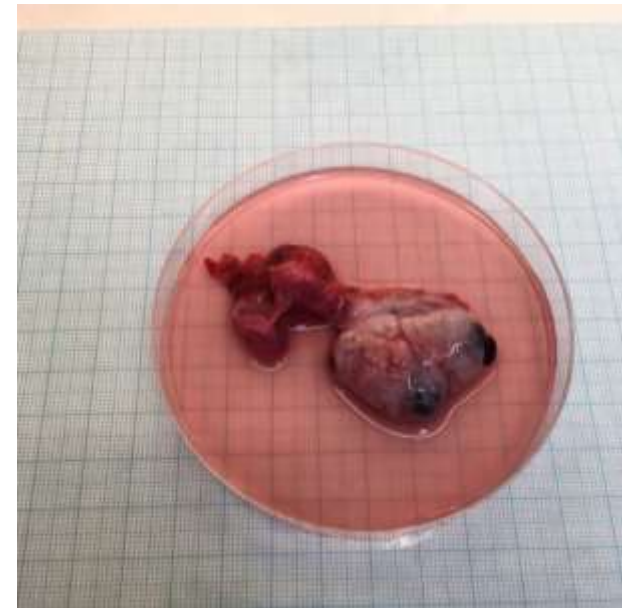
High risk	Moderate risk	Low risk
Leukemia	Breast cancer Stage IV Infiltrating lobular subtype	Breast cancer Stage I-II Infiltrating ductal subtype
Neuroblastoma	Colon cancer	Squamous cell carcinoma of the cervix
Burkitt lymphoma	Adenocarcinoma of the cervix	Hodgkin's lymphoma
	Non-Hodgkin lymphoma	Osteogenic carcinoma
	Ewing sarcoma	Nongenital rhabdomyosarcoma
		Wilms tumor

Note: Adapted from Sonmezer and Oktay (4) and modified according to the recent literature: Ewing sarcoma and NHL were recategorized from low to moderate risk.

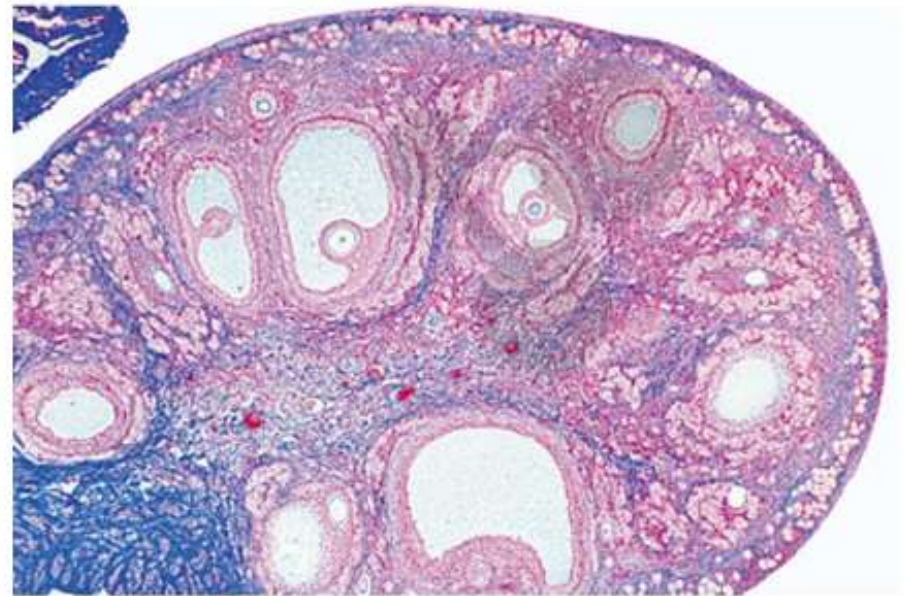
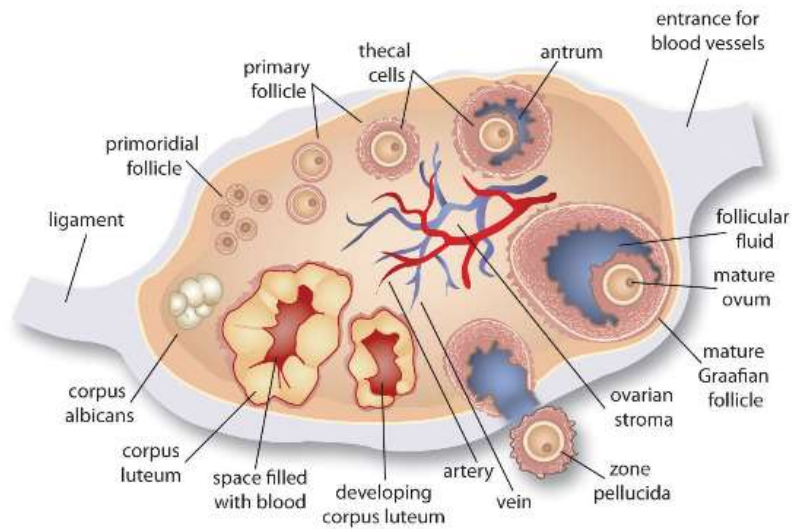
Aanmelding cryopreservatie ovarium



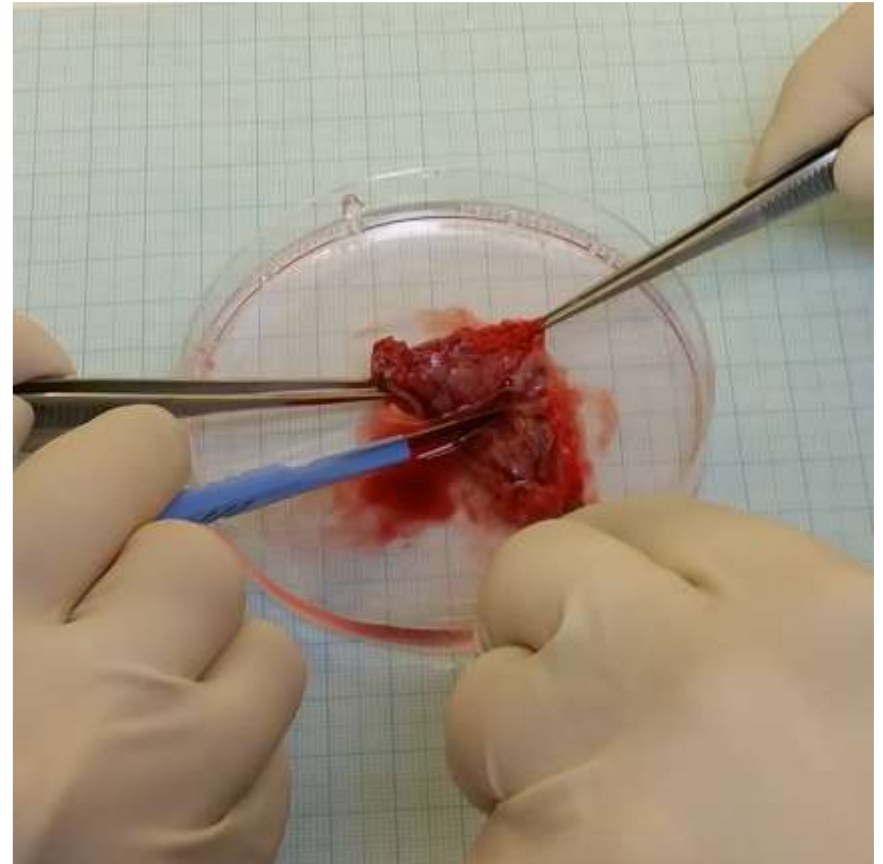
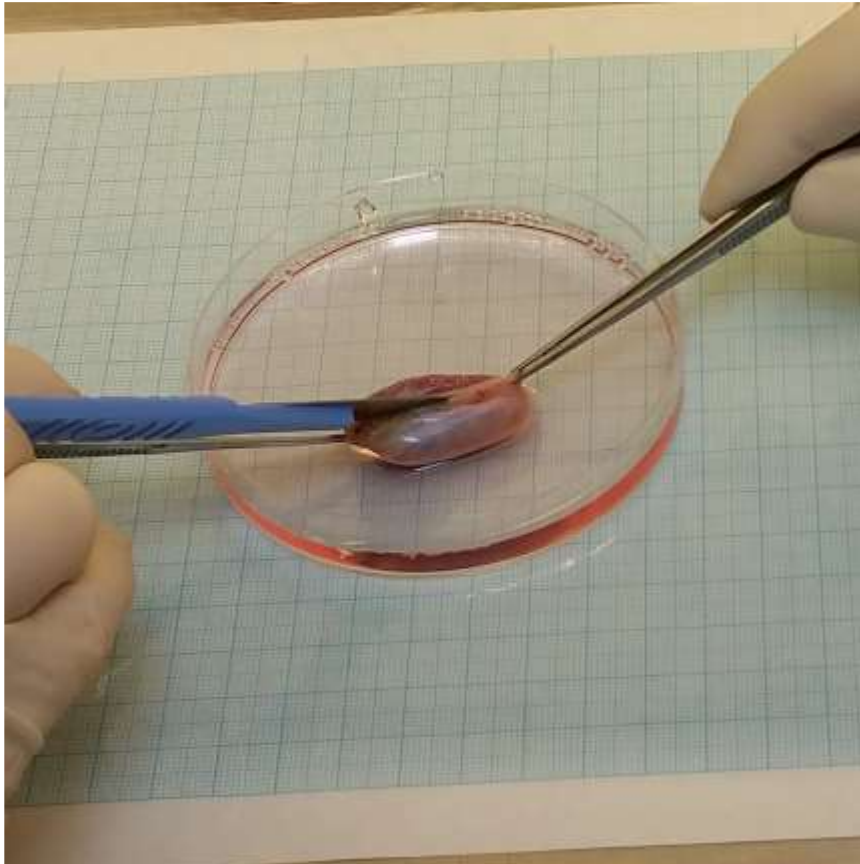
Ontvangst ovarium en isolatie cortex



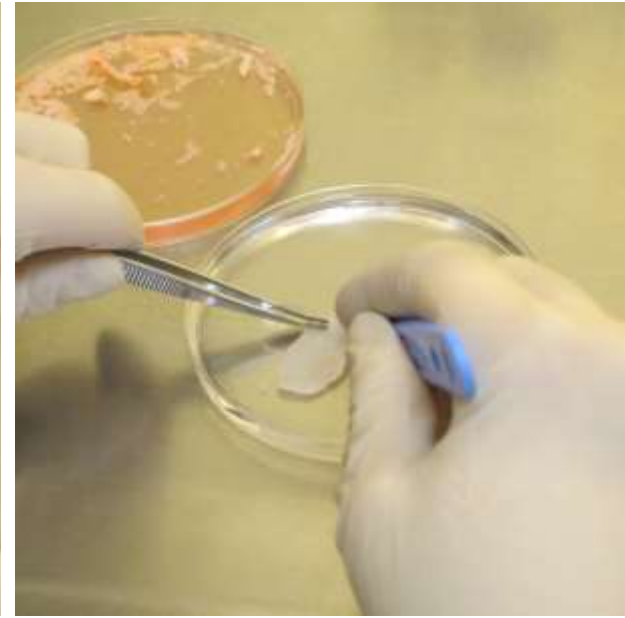
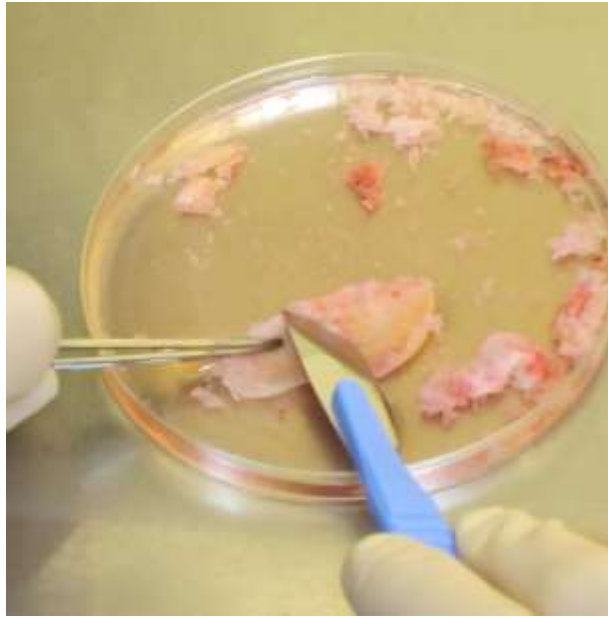
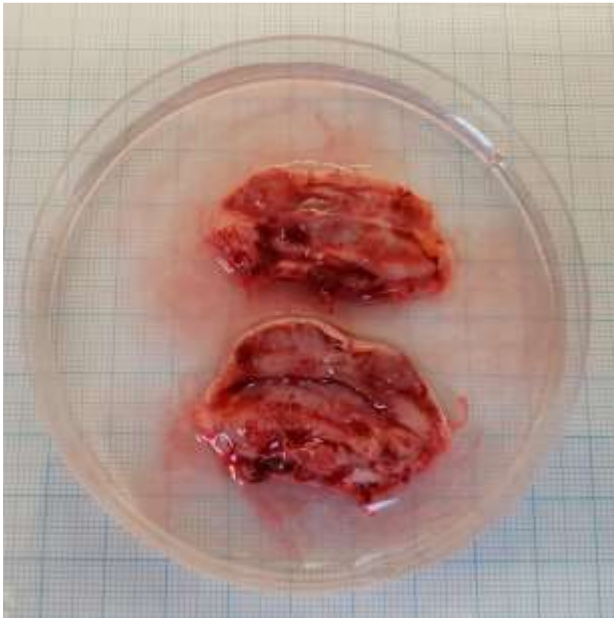
Isolatie van de cortex



Isolatie van de cortex (1)



Isolatie van de cortex (2)



Isolatie van de cortex (3)



Invriesprocedure (1)



Binnen 30 minuten

25 minuten incubatie



Na 30 minuten in Planer

Invriesprocedure (2)

- Invriesprogramma:
 - -2 graden Celsius per minuut naar -9 graden Celsius
 - handmatig seeden
 - -0,3 graden Celsius per minuut naar -40 graden Celsius
 - -10 graden Celsius per minuut naar -140 graden Celsius
 - Vloeibare stikstof (-196 graden Celsius)
- Invriesmedium:
 - 1,5 mol/l ethyleen glycol
 - 0,1 mol/l sucrose
 - 10 mg/l HSA



Hoe verder?

- Kinderwens
- Leeftijd < 45 jaar
- POI of hypergonadotrope oligo-amenorroe: verwaarloosbare kans op een spontane zwangerschap
- Ziektevrije periode van ten minste één jaar na laatste therapie bij bewezen complete remissie met goede levensverwachting
- Afstemming met behandelend oncologisch specialist
- Metastaseringsrisico?
 - Proefontdooiing: stukje cortex wordt onderzocht door een patholoog
- Ontdooiemedium
 - Steriliteitscontrole en endotoxinebepaling
- Informed consent voor de transplantatie van gecryopreserveerd ovariumweefsel en de follow-up van patiënte en eventuele kinderen, i.v.m. *experimentele* behandeling

Orthotope of heterotope autotransplantatie?

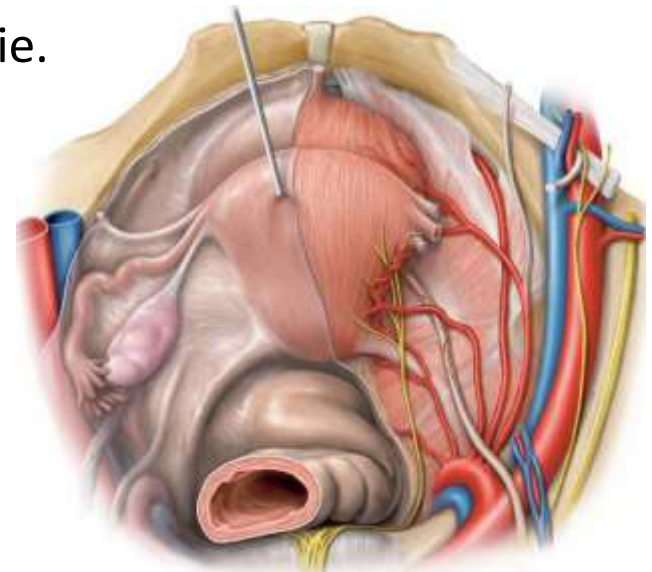
Orthotoop: spontane zwangerschapskans

- Achtergebleven ovarium
- Peritoneale 'pockets' in bekken

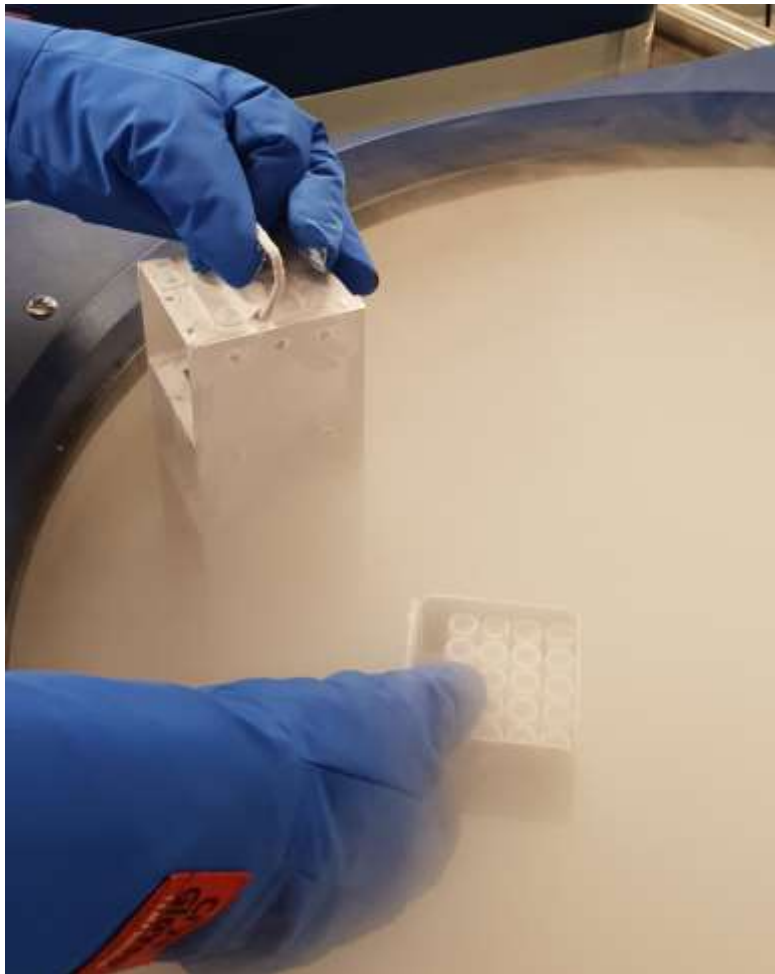
Heterotoop: IVF/ICSI behandeling

- Subcutaan in de onderarm
- Subperitoneaal
- Buikholte

Meeste successen met orthotope autotransplantatie.



Vorbereiding op het laboratorium



Ontdooien labprocedure



Ontdooi medium I: 0.75 M Ethyleen glycol en 0.25 M sucrose in PBS (10 min)

Ontdooi medium II: 0.25 M sucrose in PBS (10 min)

Ontdooi medium III: PBS spoelen

In PBS in steriel potje gemarkeerd met aantal chips naar OK

Totale tijd 30 min

Resultaat: eerste baby na transplantatie

10 november 2015: eerste baby geboren in Nederland na ovariumcryopreservatie



Results

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
Disease	Breast cancer	Breast cancer	Hodgkin lymphoma	Non-Hodgkin lymphoma	Hodgkin lymphoma	Breast cancer	Ewing sarcoma
Age at ovarian tissue cryopreservation	26	32	29	32	22	28	20
Age at first transplantation	31	35	39	39	26	38	27
Age at second transplantation	32			40			
Transplantation sites	Ovary	Ovary and peritoneal	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary
Transplanted ovarian chips (n)	10 11	4	7	6 8	12	5	6
Time to restoration of menstrual cycle (months)	3.7	6.0	Not restored	3.4	2.1	3.0	2.0
Duration of ovarian function (months)	Ongoing (36.5)	Ongoing (46.0)	-	Ongoing (48.4)	Ongoing (66.5)	Ongoing (15)	Ongoing (2,5)
Pregnancy (n)	1	2	-	-	3	1	-
Time to livebirth since transplantation (years)	3	1 and 3			3 and 5	1	
Fertility techniques	None	IVF None	-	-	IVF None	-	None
Pregnancy outcomes	1 live birth	2 live births	-	-	1 miscarriage 2 live births	1 livebirth	

Results LUMC and **Review Gellert 2018**

	no of patients	mean age (years)	range (years)	mean number of years from CP-OTT	range from CP-OTT (years)	mean number of years from OTT-livebirth	range from OTT-livebirth
cryopres	97	23	10-35	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
first OTT	7	33.8	27-39	6.7	3-11	2	1-3
second OTT	2	36	32-40				
first OTT	318	33.5	13-47	4.4	0.3-13.9		
second OTT	39	33.9	25-42	6.1	2.0-14.5		
third OTT	3	33.7	26-39	10.2	6.6-12.5		

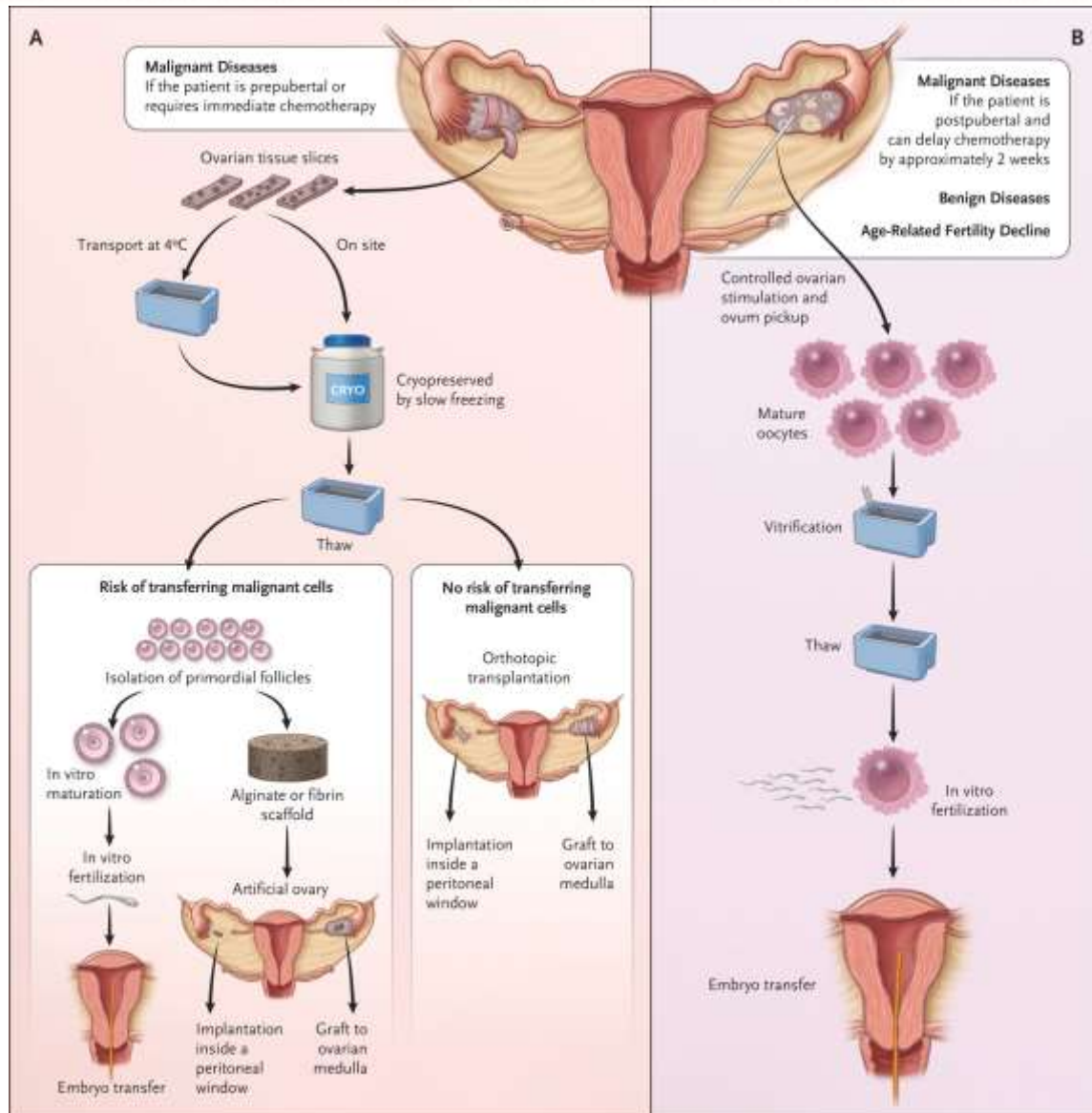
* OTT: Ovarian Tissue Transplantation

Follow up

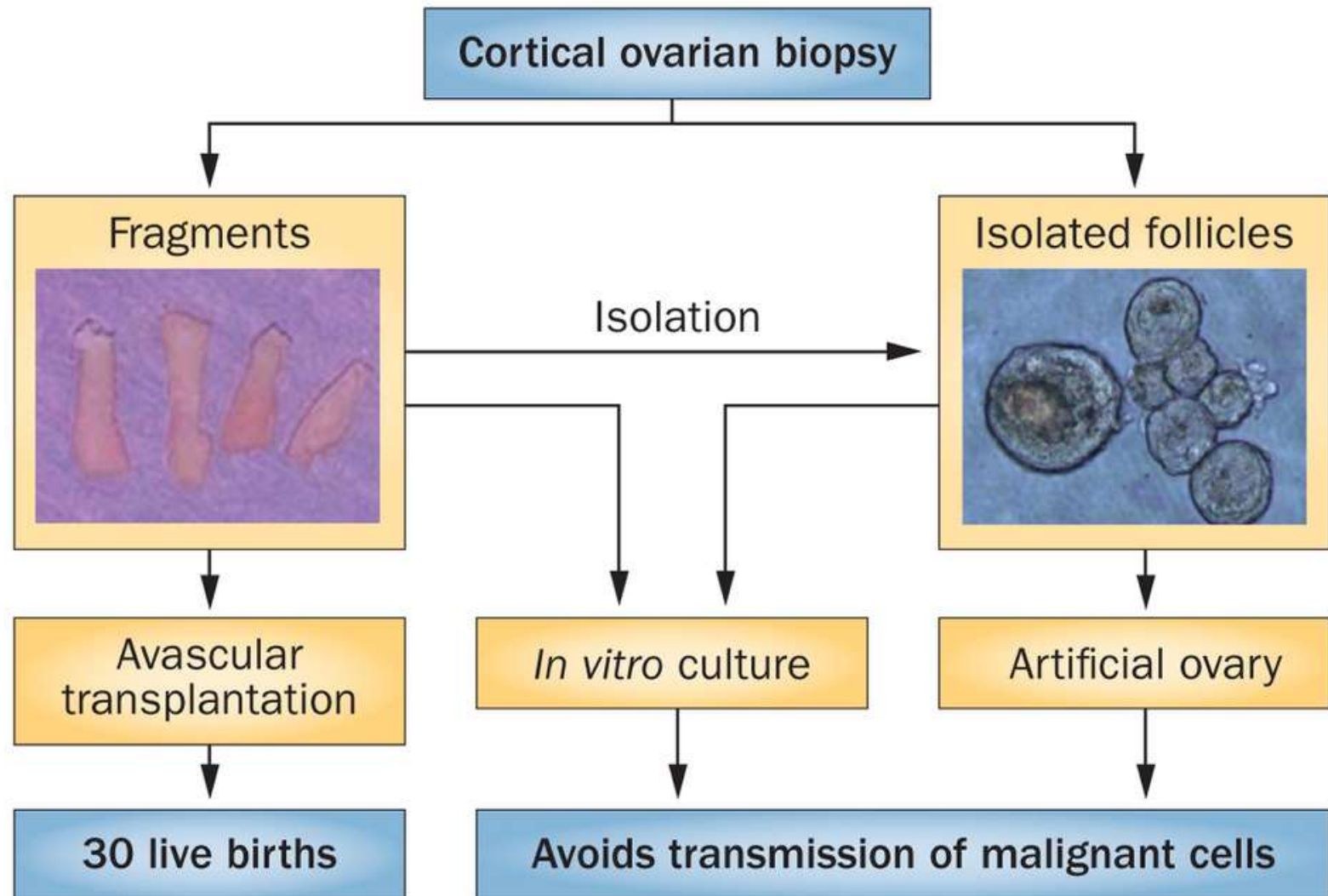
- 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children
(AK Jensen, e.a. *J Assist Reprod Genet* 2017)
- Eén vermelding van herintroductie van maligniteit na na OTT (Granulosaceltumor, Stern et al 2014)

Wat zijn de mogelijkheden voor vrouwen met een (hoger) risico op aanwezigheid van tumorcellen in het ovariumweefsel?

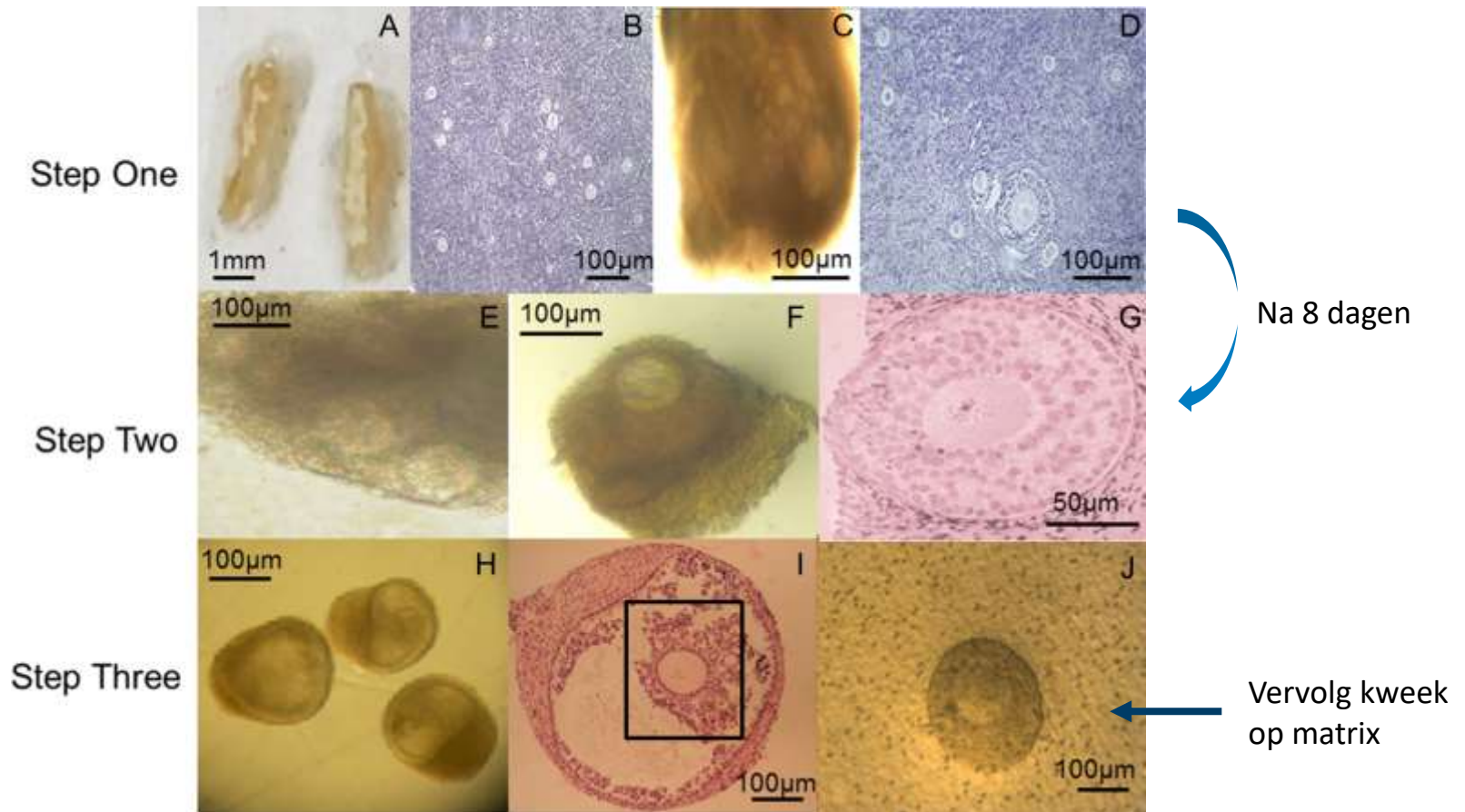
Alternatief 1: ontwikkelen follikel kweekstelsel



Alternatief 1: ontwikkelen follikel kweekstelsel



1A) Resultaat van 10 jaar onderzoek

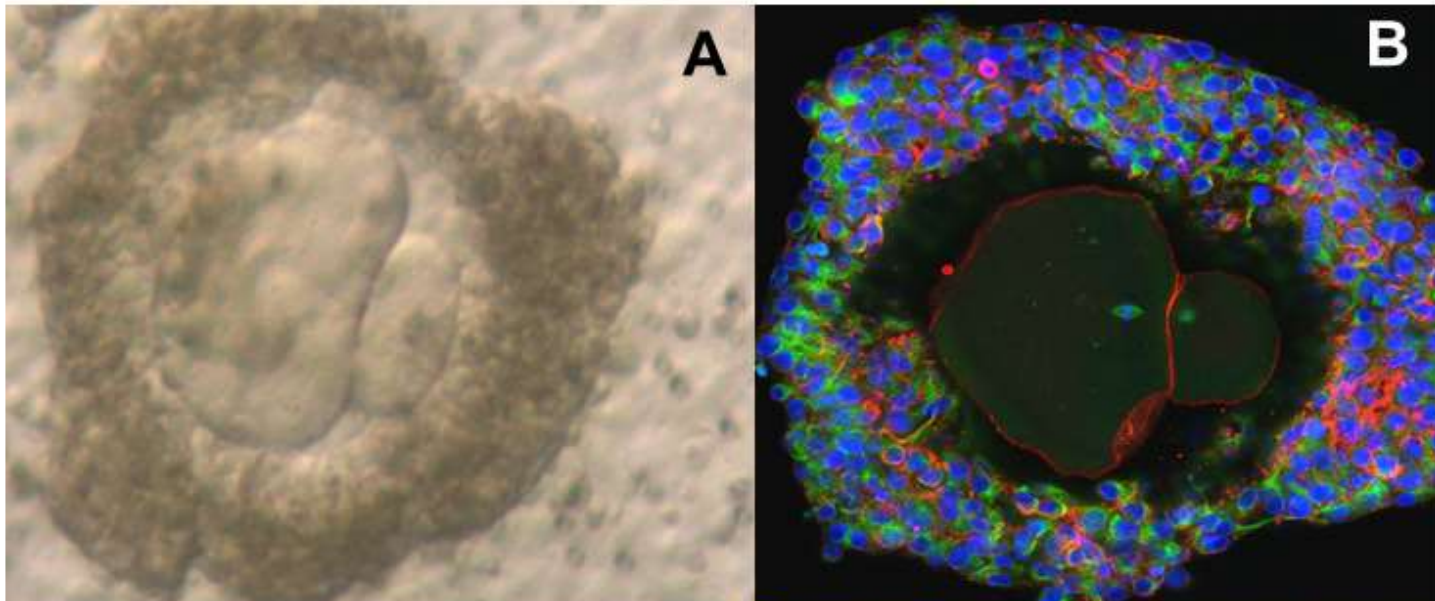


From: Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system

Mol Hum Reprod. 2018;24(3):135-142.

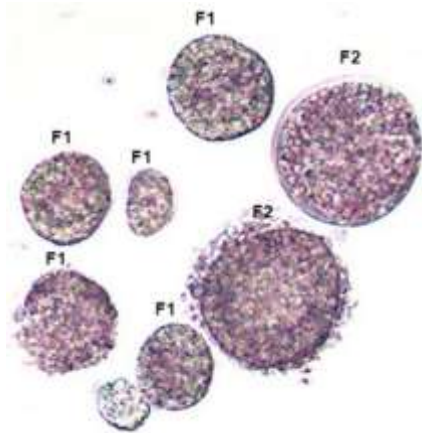
Resultaat van 10 jaar onderzoek

Rijpe humane eicellen vertonen grote polar bodies

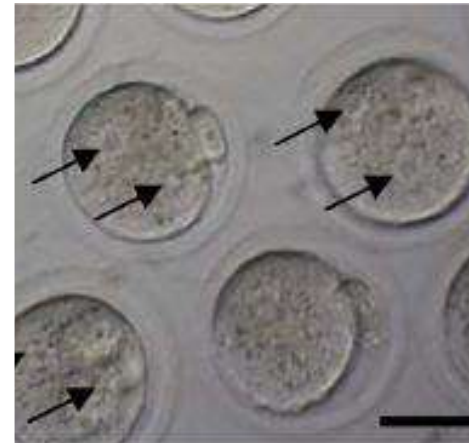
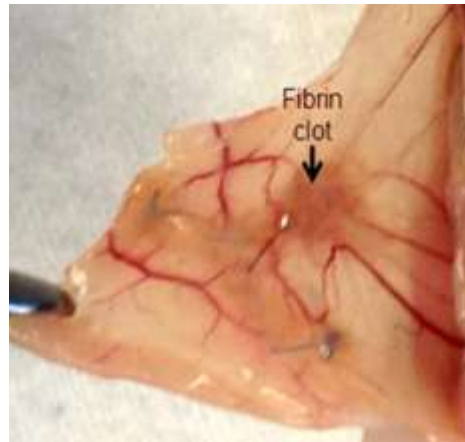


1B: In vivo kweekstelsel

In muizen autologe transplantatie van geïsoleerde preantrale follikels ingekapseld in een fibrine matrix



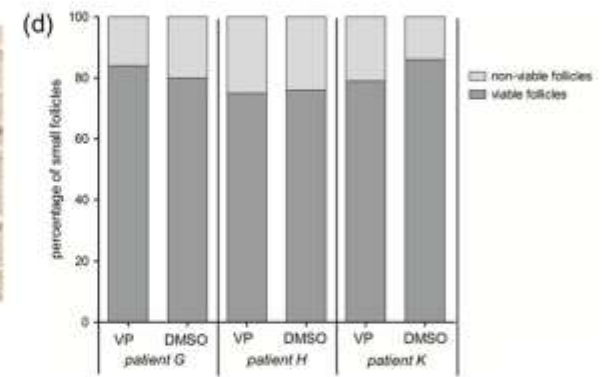
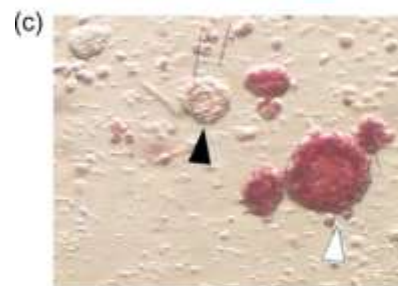
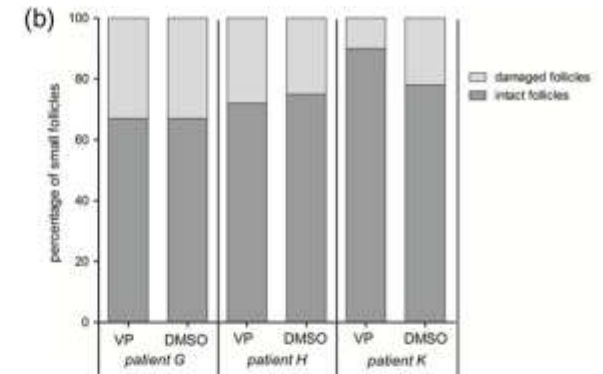
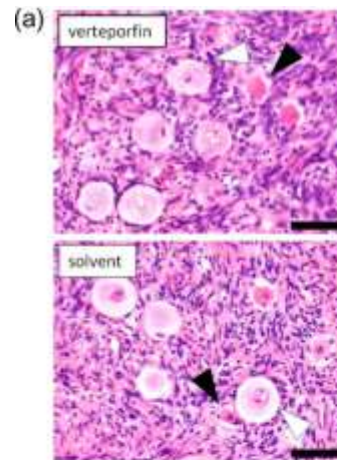
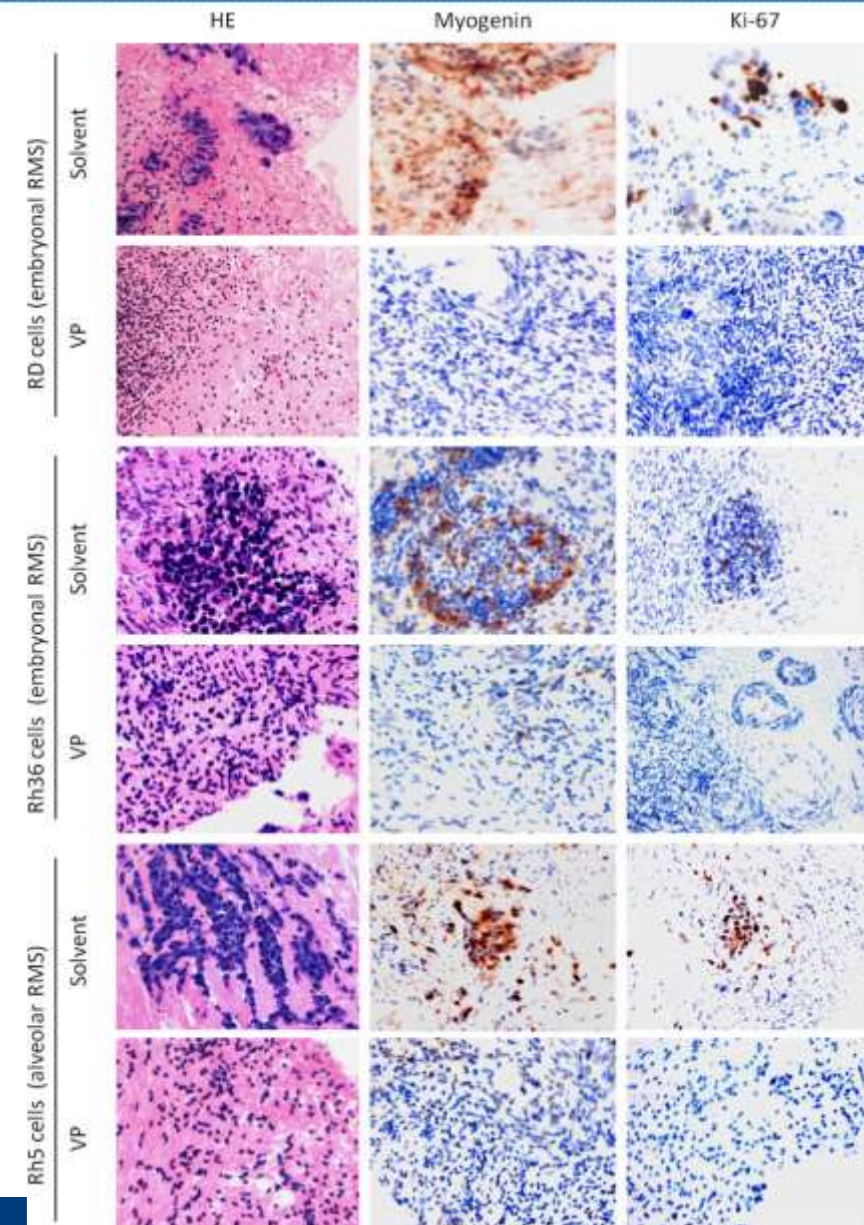
Luyckx et al., Fertil Steril 2014



Higuchi CM et al., PLoS One 2015

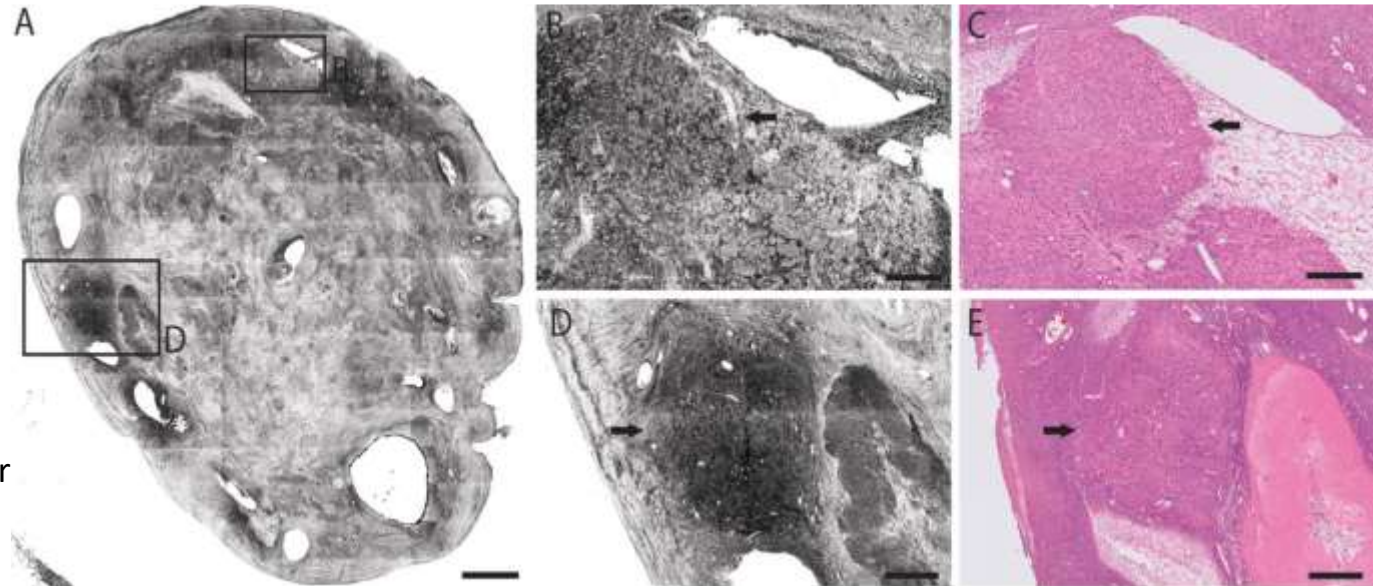


Alternatief 2: zuiveren van ovarium chips



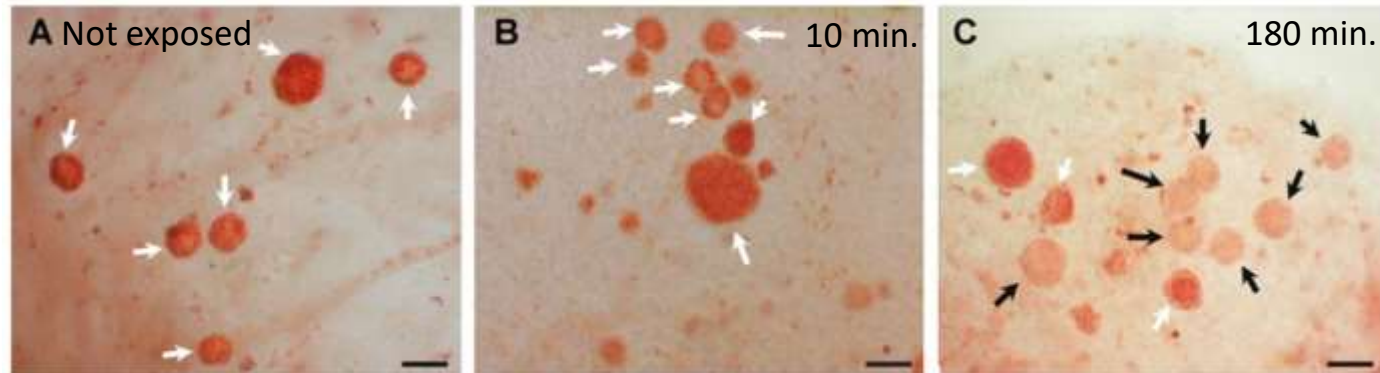
Alternatief 3: Beoordelen ovarium chips op metastases voorafgaand aan invriesprocedure

Full-field optische coherentietomografie



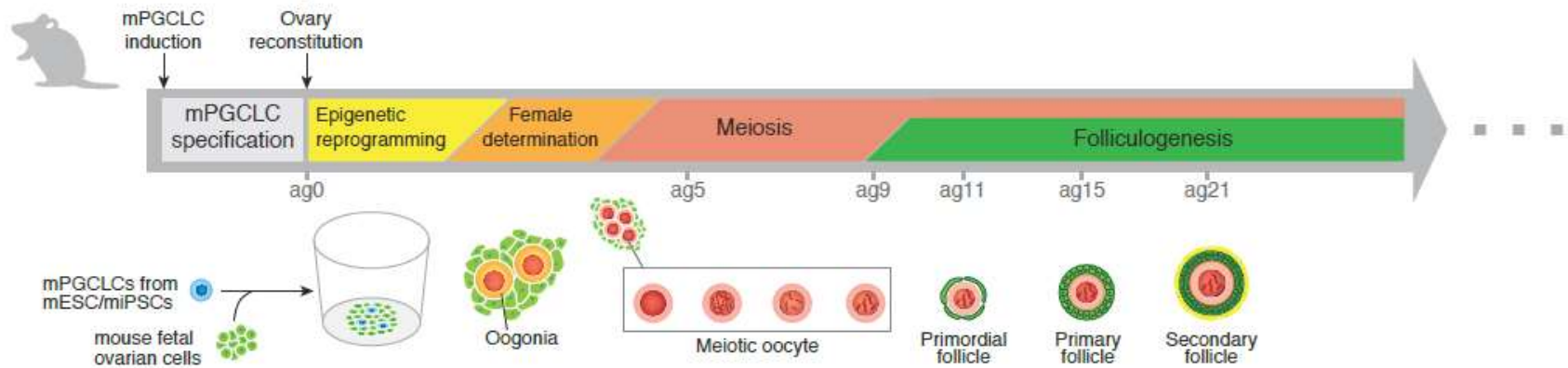
Bereik 100 μm 2-zijdig

Primordiale follikels zichtbaar

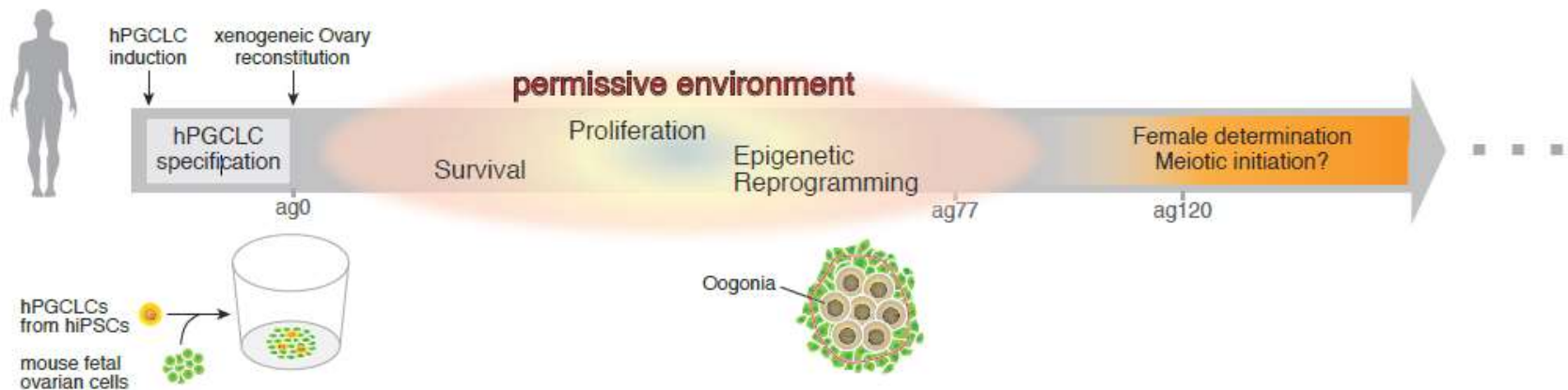


Alternatief 4: humane oogonia uit iPSC's

Mouse-Mouse rOvary



Human-Mouse xenogeneic rOvary



iPSC's: induced pluripotent stem cells

Alternatief 5: IVM gematureerde eicellen uit medulla/inner-cortex

Voordelen:

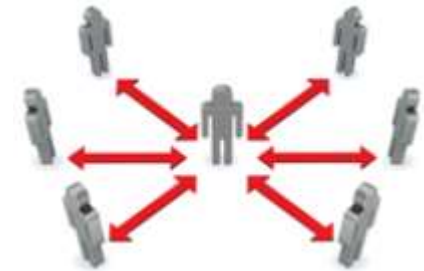
- Meest kansrijk op korte termijn, zie resultaat UZB
- Geen risico op metastase
- Ook geen autotransplantatie nodig als metastase risico klein is

Nadeel: alleen van toepassing voor vrouwen met een cyclus



Take home messages

- Gevalideerde procedure voor ovarium cryopreservatie is erg belangrijk voor succes
- Zeer hoogtechnologisch specialistische behandeling: zorg centraal houden
- Veel verschillende disciplines, dus van essentieel belang zijn goede
 - Logistiek
 - én
 - Communicatie
- Samenwerking op het gebied van onderzoek



Bedankt voor uw aandacht

Met dank aan:

IVF laboratorium LUMC

Afdeling anatomie en embryologie

Afdeling gynaecologie

Verwijzers en patiënten

