

Kypsiä munasoluja alkumunarakkuloista in vitro – lähitulevaisuuden haaste

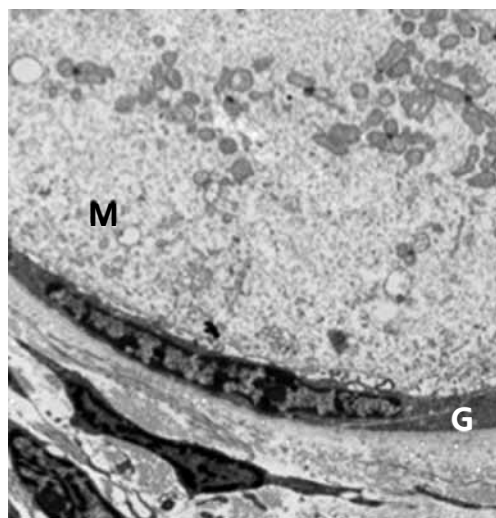
Munasolujen kypsyttäminen in vitro pakastetuna säilytetystä kudoksesta olisi tärkeä hedelmättömyyshoito naisille, joiden munasolut ovat tuhoutuneet syövän hoidon aikana. Jos kudoksessa saattaa olla pahanlaatuisia soluja, sitä ei voida siirtää takaisin naiseen. Riskin ajatellaan olevan suuri esimerkiksi leukemiassa, joka on tavallisin pahanlaatuinen tauti nuorilla tytöillä. Nykyään onnistutaan viljelemään miltei täysikokoisia munasoluja, kun viljelmästä poistetaan munarakkuloiden kasvua estäviä tekijöitä ja lisätään siihen kasvua sääteleviä kasvutekijöitä ja hormoneja. Munasolujen lopullinen kypsyttäminen ja hedelmöittäminen on vielä kokeilematta. Ennen ensimmäisiä kliinisiä hoitoja on vielä varmistettava, että alkiot ovat normaaleja.

Kypsiin munasolujen saaminen munasarjakudoksesta olisi tärkeää niille naisille, joiden munasarjakudosta on pakastettu ennen syöpähoitoja. Ihmisen munasarjakudosta on pakastettu onnistuneesti vuodesta 1996 lähtien (Hovatta ym. 1996, Newton ym. 1996). Kudoksen säilyminen pakastuksen jälkeen osoitettiin aluksi kudosisviljelmässä (Hovatta ym. 1997) ja siirtämällä sitä sulatuksen jälkeen immuunipuutteisiin hiiriin (Newton ym. 1996, Van den Broecke ym. 2001). Pakastusmenetelmät ovat viime aikoina entisestään parantuneet (Hovatta 2005). Nykyään hyödynnetään kudoksen lasitusta, jossa kylmänsuoja-aineita käytetään niin suurina pitoisuuksina, ettei synny lainkaan jääkiteitä. Kudoksesta jäähtyy lasin kaltaisena massana (KUVA 1).

Ensimmäinen pakastetun munasarjakudoksen siirron jälkeen alkunsa saanut lapsi syntyi vuonna 2004 Belgiassa (Donnez ym. 2004).

Sulatettu kudoksesta oli istutettu takaisin munasarjaan. Takaisinistutuksia on maailmalla tehty arviolta noin sadalle naiselle. Kudoksen takaisinsiirto on tähän mennessä johtanut 19 lapsen syntymään (Donnez ym. 2011). Heistä nuorin syntyi marraskuussa 2011 Kööpenhaminassa saman äidin kolmantena lapsena kymmenen vuotta munasarjakudoksen keräyksen ja kahden takaisinsiirron jälkeen (Claus Yding Andersen, henkilökohtainen tiedonanto). Siirtoja ei ole vielä tehty enempää, koska naiset ovat olleet syövän hoidon aikaan hyvin nuoria, monet vielä prepubertaalisia tyttöjä.

Muita aikuisten naisten hedelmällisyyden säilyttämiseksi käytettäviä hoitoja ovat alkioiden ja munasolujen pakastus (von Wolff ym. 2009, Tinkanen 2011). Niiden avulla on syntynyt paljon lapsia. Alle 14-vuotiaille tytöille nämä hoidot eivät tule kysymykseen.



KUVA 1. Elektronimikroskooppikuva lasittamalla pakastetusta munasarjakudoksesta, jossa näkyy munasolu (M) ja sitä ympäröiviä jyväsoluja (G). Kudoksessa ei ole merkkejä pakastusvaurioista (Sheikhi ym. 2011).

Kypsien munasolujen kasvattaminen viljelmässä ei vielä onnistu ihmisellä. Hiirellä kasvatusta on sitä vastoin tehty jo vuodesta 1996 alkaen (Eppig ja O'Brien 1996, O'Brien ym. 2003), ja menetelmän avulla on syntynyt eläviä terveitä poikasiasia. Ihmisellä kypsien munasolujen kasvattaminen on osoittautunut vaativaksi, mutta menetelmä kehittyi koko ajan.

Ketkä tarvitsevat munasolujen kypsytystä kudoksesta in vitro?

Jos munasarjakudoksessa on pakastuksen aikaan pahanlaatuisia soluja, jo parantunut nainen saattaa sairastua uudestaan kudoksen takaisinsiirron yhteydessä (TAULUKKO 1). Leukemioissa ja non-Hodgkin-lymfoomissa riskin ajatellaan olevan suuri, samoin tietysti munasarjojen pahanlaatuisissa kasvaimissa. Perinnöllistä rintasyöpää sairastavilla esiintyy usein myös munasarjasyöpää. Heitä pidetään suuren riskin ryhmänä munasarjakudoksen siirrossa. Myös paksusuolisyöpää ja eräitä sarkoomia voi esiintyä munasarjoissa. Sen sijaan Hodgkinin lymfoomassa, Ewingin sarkoomassa ja ei-perinnöllisessä rintasyövässä kudoksen siirtoa on pidetty turvallisena. Näiden syöpien etäpesäkkeitä ei ole histologisesti todettu munasarjakudoksessa (Meirow ym. 2008).

Munasarjakudoksessa olevat pahanlaatuiset solut voidaan useimmiten tunnistaa histologisesta leikkeestä eri merkkiaineiden ilmentymisen perusteella. Esimerkiksi leukemiasta parantuneen naisen pakastetusta munasarjakudoksesta voidaan ottaa pieni näyte merkki-geenin ja -proteiinin analyysia varten. Kudoksessa voi silti olla pahanlaatuisia soluja, sillä ne eivät yleensä jakaudu kudokseen tasaisesti. Tästä syystä munasolujen kypsyttäminen viljelmässä ja niiden hedelmöittäminen maljalla koeputkihedelmöityksen tapaan olisi näille naisille turvallisempaa.

Toinen vaihtoehto on antaa naiselle ensin yksi jakso solunsalpaajia ja ottaa munasarjan kuorikerroksen biopsianäytteet sen jälkeen. Kasvamassa olevat munasolut ja myös osa primordiaalisista munasoluista kuitenkin kuolevat solunsalpaajien vaikutuksesta. Suuri osa näistä alkumunarakkuloista on silti vielä

TAULUKKO 1. Pahanlaatuiset taudit, jotka saattavat aiheuttaa syövän uusiutumisen riskin, jos ennen syövän hoitoa pakastettua munasarjakudosta siirretään takaisin.

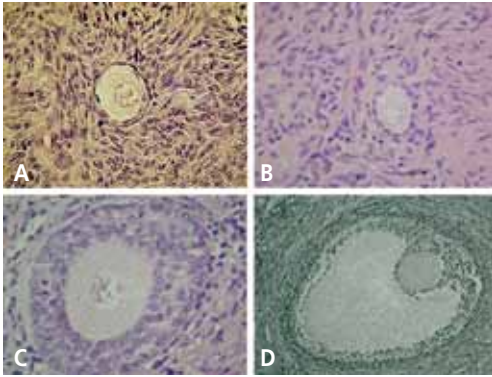
Leukemiat
Non-Hodgkin lymfoma
Munasarjasyöpä
Perinnölliset rintasyövät
Paksusuolisyöpä

tallella tässä vaiheessa. Eri solunsalpaajat vaikuttavat munasoluihin eri tavoin. Kliinisen kokemuksen perusteella alkyloivat aineet ovat haitallisimpia, mutta muillakin lääkkeillä on vaikutusta (Meirow ym. 2008). Yhteispohjoismainen histologinen seurantatutkimus munarakkuloiden määrästä eri solunsalpaajia saaneilla nuorilla naisilla on meneillään.

Munarakkuloiden aktivoiminen ja kasvu

Valtaosa munasoluista on lepotilassa munasarjan kuorikerroksessa noin yhden millimetrin päässä pinnasta (Lass ym. 1997, Schmidt 2003). Sieltä niiden kerääminen pinnallisten kudoksenäytteiden avulla onnistuu hyvin. Normaali tilanteessa ihmisen munasolujen täytyy pysyä lepotilassa tarvittaessa jopa 50 vuotta. Osa niistä aktivoituu koko ajan riippumatta naisen kuukautiskierrosta, raskaudesta tai esimerkiksi ehkäisytablettien käytöstä. Valtaosa aktivoituneista munasoluista päättyi ohjelmoituneeseen kuolemaan eli apoptoosiin. Normaalin kuukautiskierroksen aikana vain yksi munasolu kypsyy täysin ja irtoaa ovulaatioissa. Tämä kypsyminen prosessi on tarkoin säädelty.

Munasolun alkuvaiheen aktivoituminen ei vaadi aivolisäkehormoneja, jotka ovat kuitenkin tärkeässä osassa myöhemmässä munarakkulan kypsymisessä. Jo ensimmäisissä munasarjakudosviljelmissä huomattiin, että suuri osa rakkuloista alkoi kehittyä itsestään viljelmässä, elimistön ulkopuolella (Hovatta ym. 1997). Niistä muodostui primaarisia munarakkuloita, joissa munasolua ympäröivässä yksinkertaisessa jyväsolutkerroksessa solut laajenevat litteistä kuutiomaisiksi (KUVA 2).



KUVA 2. Ihmisen primordiaalfollikkeli (A), primaarifollikkeli (B), sekundaarifollikkeli (C), antraalinen follikkeli (D). Suurennos A–C x 400, D x 100.

Spontaani kehittyminen pitemmälle on kuitenkin hidasta.

Munasolujen aktivoitumista estäviä tekijöitä täytyy olla sekä itse kudoksessa että verenkierrassa. Järjestelmällisen tutkimustyön avulla (TAULUKKO 2) on todettu, että samoin kuin hiirellä (Durlinger ym. 1999) anti-Müller-hormoni (AMH) estää munarakkuloiden aktivoitumista ihmisellä (Carlsson ym. 2006). Kasvutekijät (GDF-9 ja GDF-9B) (KUVA 3) sen sijaan edistävät munarakkuloiden kehitystä (Hreinsson ym. 2003). Follitropiini (FSH) vaikuttaa edullisesti ihmisen munasolujen selviytymiseen ja kehitykseen jo primaarivaiheesta lähtien (Wright ym. 1999). Munasolujen ohjelmoitunutta solukuolemaa voidaan lisäksi ehkäistä syklisen adenosiinimonofosfaatin (cAMP) tai syklisen guanosiinimonofosfaatin (cGMP) lisäämisellä viljelmään (Scott ym. 2004, Zhang ym. 2004).

Kantasolukasvutekijän (stem cell factor, SCF) selviytymistä edistävä vaikutus osoitettiin salpaamalla sen reseptori c-kit. Tällöin mu-

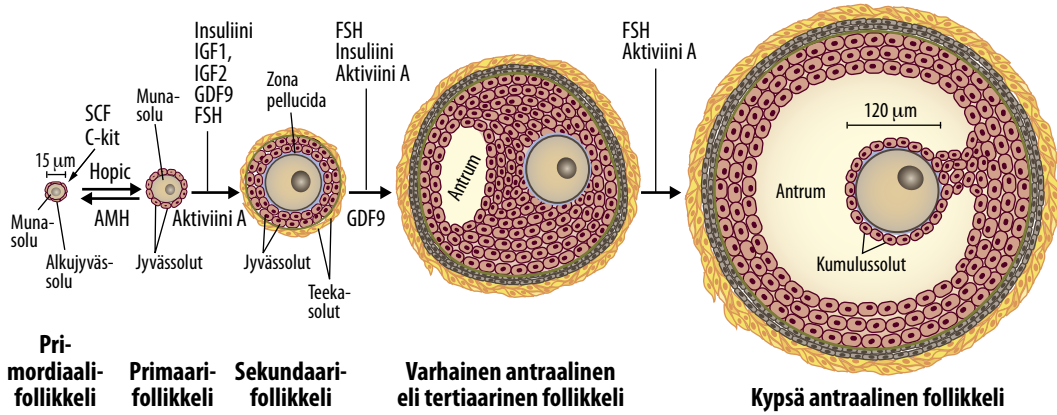
YDINASIAT

- » Munasarjakudosta voidaan pakastaa ennen syöpähoitoja hedelmällisyyden säilyttämiseksi.
- » Prepubertaalisilla tytöillä munasarjakudoksen pakastus on ainoa keino säilyttää hedelmällisyys, mutta menetelmä sopii myös aikuisille naisille.
- » Sulatettu kudos voidaan siirtää takaisin munasarjaan, kun nainen on parantunut taudistaan ja toivoo lasta.
- » Jos on olemassa riski siitä, että munasarjakudos sisältää pahanlaatuisia soluja, kuten leukemiassa, munasolut on kypsyttävä kokonaan viljelmässä.
- » Munasolut kypsyvät kasvamaan lähteneistä alkumunarakkuloista viljelmässä 12 päivässä, kun niiden kasvua estävät tekijät poistetaan.
- » Lopullinen meioottinen kypsyminen ja hedelmöittäminen on vielä tehtävä ennen kuin päästään kliinisiin kokeisiin.

nasolut kuolivat muutamassa päivässä, vaikka SCF:n lisääminen viljelmään ei edistänyt niiden kehitystä (Carlsson ym. 2007). Aktiviini A:n munarakkuloiden hengissä pysymistä auttava vaikutus on osoitettu (Telfer ym. 2011). Telfer työryhmineen myös näytti, että munasarjan sidekudoksen vähentäminen rakkuloiden ympäriltä ennen viljelyä salli paremman kasvun. Tämä johtuu luultavasti sidekudoksen sisältämien kasvua estävien tekijöiden väheneemisestä. Munarakkuloiden eristäminen täysin kudoksesta oli jo aikaisemmin osoittautunut haitalliseksi (Hovatta ym. 1999).

TAULUKKO 2. Munarakkuloiden viljelyssä käytetyt aineet ja niiden pääasiallinen vaikutus (ks. myös KUVA 3).

Follitropiini (FSH)	Edistää kasvua ja kehitystä primaarifollikkelista lähtien
Aktiiviini A	Lisää sekundaarifollikkeleiden selviytymistä
GDF-9	Edistää munarakkuloiden kehitystä ja selviytymistä
Syklinen AMP ja GMP	Estävät solukuolemaa
Cv hopic, pieni synteettinen molekyyli	Estää PTEN:n kasvua jarruttavaa vaikutusta ja edistää kaikkien munarakkuloiden kehitystä ja kasvua



KUVA 3. Kaavio munarakkulaviljelmissä käytettävistä aineista.

Näiden tekijöiden avulla onnistuttiin viljelemään kahden viikon kuluessa säännöllisesti sekundaarisia munarakkuloita ja satunnaisesti myös tertiaarisia eli antraalisia rakkuloita (KUVA 2). Pitemmälle ei päästy edes kahdeksan viikon viljelmissä (Carlsson ym. 2006a). Munasolut olivat kuitenkin vielä liian kehittymättömiä hedelmöitettäväksi. Pitkissä viljelmissä jatkuvasti etenevä solukuolema oli lisäksi iso ongelma. Työssä päästiin eteenpäin, kun poistogeenisiä hiiriä tutkimalla saatiin ratkaisevaa uutta tietoa munarakkuloiden kehityksen molekylaarisesta säätelystä. Fosfatidyylinoisotoli-3-kinaasin (PI3K) säätelyreitti osoittautui ratkaisevan tärkeäksi. Kun vastasyntyneiltä hiiriltä poistettiin mahdollisesti tämän säätelyreitin tärkein estäjä, fosfataasin ja tensiinin homologi, joka puuttuu kromosomissa 10 (PTEN), hiirten kaikki munarakkulat aktivoituivat samanaikaisesti kasvuun. Ne kehittyivät ja siten hävisivät (Reddy ym. 2008). Hiirten munasarjojen toiminta loppui hyvin varhain. Saman säätelyreitin muilla tekijöillä on myös tärkeä osuus munarakkuloiden aktivaatiossa (Adhikari ja Liu 2009).

PTEN:n pienimolekyylisestä estäjää (hopic) lisättiin viljelmiin ja sen pitoisuus optimoitiin. Saatiin säännöllisesti antraalisia munarakkuloita, joissa on lähes täysikokoiset (läpimitta noin 100 µm) munasolut (Hovatta, julkaisematon havainto). Tämä voitiin tehdä 12 päivässä, mikä on täsmälleen sama aika, jossa hiiren munasarjoista on viljelmässä saatu kypsiä

hedelmöitymiskykyisiä munasoluja (Eppig ja O'Brien 1996, Eppig ym. 2003). Ihmisen munasolu kypsyy siis samassa ajassa kuin hiiren, kun jarruttavat tekijät vain poistetaan.

Lopuksi

Käyttämällä samanaikaisesti muita PI3K-reitin kasvua ehkäisevien tekijöiden salpaajia viljelmässä (Adihikari ja Liu 2009) saadaan toivottavasti riittävän kypsiä munasoluja viimeistä viljelyvaihetta eli meioosin induktiota varten. Tätä in vitro -maturaatiota (IVM) käytetään jo kliinisenä hoitona naisilla, joille ei haluta antaa hormonihoitoa tavanomaisen koeputkihedelmöityksen tapaan (Suikkari ym. 2001, Hreinsson ym. 2003). Tällä menetelmällä on syntynyt maailmanlaajuisesti parituhatta lasta. Kun saadaan kypsiä ensimmäisen meioosin metafaasissa II olevia munasoluja, päästään toiminnallisiin kokeisiin eli munasolujen hedelmöittämiseen. Siihen on Karoliinisessa instituutissa Tukholman alueellisen eettisen lautakunnan lupa. Toisin kuin Suomessa, Ruotsin laki sallii hedelmöittämisen tutkimustyössä. Ruotsissa voidaan siis varmistaa mikrosiru- ja sekvensointimentelmillä, että alkioiden epigeneettiset kehitystapahtumat ovat sujuneet normaalisti. Sen jälkeen on ensimmäisten kliinisten tutkimusten eli alkionsiirtojen vuoro.

Ihmisen munasolujen kypsyttäminen viljelmässä alkumunarakkuloista on ollut pitkä ja vaativa prosessi. Nyt näyttää kuitenkin sel-

välttä, että maali lähestyy. Olemme saamassa turvallisen keinon kaikkien syöpähoitoihin joutuvien tyttöjen hedelmällisyyden säilyttämiseksi. Menetelmää voidaan ehkä tulevai-

suudessa soveltaa muissakin tilanteissa, joissa munasolujen kypsyttäminen naisen hormoni-hoidolla ei ole turvallista. ■

OUTI HOVATTA, professori

Karoliininen instituutti, Tukholma
ja Laboratorio Ovumia, Tampere

SIDONNAISUUDET

Apuraha (Stockholms läns Landsting och Karolinska Institutet, Vetenskapsrådet)

KIRJALLISUUTTA

- Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev* 2009;30:438–64.
- Carlsson IB, Laitinen MP, Louhio H, ym. Kit ligand and c-kit are expressed during early human ovarian folliculogenesis and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. *Reproduction* 2006(a);131:641–9.
- Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APN, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod* 2006(b);21:2223–7.
- Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, ym. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405–10.
- Donnez J, Silber S, Andersen CY, ym. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births. *Ann Med* 2011;43:437–50.
- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, ym. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;140:5789–96.
- Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996;54:197–207.
- Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2005;10:729–34.
- Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Winston RML. Extracellular matrix improves the survival of human ovarian fresh and frozen-thawed primordial and primary follicles in long-term culture. *Hum Reprod* 1997;12:1032–6.
- Hovatta O, Silye R, Krausz T, ym. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 1996;11:1268–72.
- Hovatta O, Wright C, Krausz T, Hardy K, Winston RML. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture. Effect of partial isolation. *Hum Reprod* 1999;14:2519–24.
- Hreinsson J, Scott J, Swahn ML, Rasmussen C, Hsueh A, Hovatta O. Growth development promoting growth factor 9 (GDF 9) promotes the growth and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocr Metab* 2002;87:316–21.
- Hreinsson J, Suikkari AM, Rosenlund B, ym. Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in a clinical in-vitro maturation programme: a randomised study. *Hum Reprod* 2003;18:2131–36.
- Lass A, Silye R, Abrams DC, ym. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum Reprod* 1997;12:1028–31.
- Meirou D, Hardan I, Dor J, ym. Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. *Hum Reprod* 2008;23:1007–13.
- Newton H, Aubard Y, Rutherford A, ym. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996;11:1487–91.
- O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod* 2003;68:1682–6.
- Reddy P, Liu L, Adhikari D, ym. Oocytes-specific deletion of Pten causes premature activation the primordial follicle pool. *Science* 2008;319:611–3.
- Schmidt KL, Byskov AG, Nyboe Andersen A, ym. Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. *Hum Reprod* 2003;18:1158–64.
- Scott JE, Zhang P, Hovatta O. Benefits of 8-bromo-guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) in human ovarian cortical tissue culture. *Reprod Biomed Online* 2004;8:319–24.
- Sheikh M, Hultenby K, Niklasson B, Lundqvist M, Hovatta O. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2011;26:594–603.
- Smitz J, Stouffer RL, Telfer EE, ym. Current achievements and future research directions in in-vitro ovarian follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update* 2010;16:395–414.
- Suikkari AM, Tulppala M, Tuuri T, Hovatta O, Barnes F. In vitro maturation of human oocytes from in vivo primed small follicles for intracytoplasmic sperm injection and frozen-thawed embryo transfer. *Hum Reprod* 2000;15:747–51.
- Telfer EE, McLaughlin M. In vitro development of ovarian follicles. *Semin Reprod Med* 2011;29:15–23.
- Tinkanen H. Hedelmällisyyden säilyttäminen syövän hoitojen yhteydessä. *Duodecim* 2011;127:480–5.
- Van den Broecke R, Van der Elst J, Liu J, Hovatta O, Dhont M. The female-to-male transsexual patient: a source for human ovarian cortical tissue for experimental use. *Hum Reprod* 2001;16:145–7.
- von Wolff M, Donnez J, Hovatta O, ym. 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.
- Wright C, Hovatta O, Margara R, ym. Effects of FSH and serum substitution on the in vitro growth and development of early human follicles. *Hum Reprod* 1999;14:1555–62.
- Zhang P, Louhio H, Tuuri T, ym. Effect of cyclic adenosine 3', 5' -monophosphate on survival and development of early human ovarian follicles in long-term culture. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:301–6.

Summary

Mature eggs from primordial follicles in vitro – a challenge in the near future

In vitro maturation of eggs from frozen-preserved tissue would be an important infertility therapy for women, whose eggs have been destroyed during cancer treatment. If there is a risk of presence of malignant cells in the tissue, it cannot be transferred back to the woman. Almost full-sized eggs are obtained in ovarian tissue culture by abolishing inhibition of the activation of ovarian follicles and by adding growth-regulating growth factors and hormones. Their final maturation in the subsequent culture and fertilization will hopefully be successful in the near future.