

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.796>

<http://orcid.org/0000-0002-1882-8637>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Monika Grubliauskaitė

Reprodukinių audinių transplantacijos *in vivo* ir brandinimo *in vitro* modelių kūrimas

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija (N 010)

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2019–2025 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre ir Nacionalinio vėžio instituto Biobanke.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (sutarties nr. D-19-0874), Nacionalinio vėžio instituto mokslo fondas ir Europos Sąjungos 2014-2020 metų mokslinių tyrimų ir inovacijų finansavimo programos „Horizontas 2020“ pagal “Mokslinių tyrimų ir švietimo bendradarbiavimo projektas, siekiant pagerinti vaikų, sergančių piktybiniais navikais, išgyvenamumą Lietuvoje (TREL)“ projektas (projekto nr. 952438).

Mokslinė vadovė – dr. Živilė Gudlevičienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

(Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

Prof. dr. Mindaugas Kliučinskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

Doc. dr. Jan Aleksander Kraško (Nacionalinis vėžio institutas, gamtos mokslai, biologija – N 010),

Doc. dr. Aušra Sasnauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

Prof. dr. Vytautė Starkuvienė-Erfle (Heidelbergo universitetas, Vokietija, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Disertacijos ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. rugpjūčio 28 d. 10:00 val., Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 223 4419; el. paštas info@gmc.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir Vilniaus universiteto interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.796>

<http://orcid.org/0000-0002-1882-8637>

VILNIUS UNIVERSITY

Monika Grubliauskaitė

Development of Reproductive Tissue Transplantation *In Vivo* and Maturation *In Vitro* Methods

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2019 and 2025 at Vilnius University Life Sciences Center and Biobank of National Cancer Institute.

The research was supported by Research Council of Lithuania PhD scholarship (Agreement no. D-19-0874), National Cancer Institute science funds and EU-funded Horizon 2020 Framework Programme (H2020-2014-2020) project “Twinning in Research and Education to improve survival in childhood solid tumours in Lithuania (TREL)” (Project no. 952438).

Academic Supervisor – Dr. Živilė Gudlevičienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).
(Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Rūta Navakauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Prof. Dr. Mindaugas Kliučinskas (Lithuanian University of Health Sciences, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Assoc. Prof. Dr. Jan Aleksander Kraško (National Cancer Institute, Natural Sciences, Biology – N 010),

Doc. Dr. Aušra Sasnauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Prof. Dr. Vytautė Starkuvienė-Erfle (Heidelberg University, Germany, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 10 a.m. on 28th of August 2025 in Auditorium R401 of the Life Science Centre of Vilnius University.

Address: Saulėtekis Ave. 7, Vilnius, Lithuania

Tel. +370 5 223 4419; e-mail: info@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS	7
IVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1 Kiaušidės audinio sandaros dinamika ir priešvėžinio gydymo poveikis	15
1.2. Vėžiu sergančių mergaičių ir moterų vaisingumo išsaugojimo galimybės	18
1.2.1. Embrionų ir subrendusių kiaušialąsčių užšaldymas.....	20
1.2.2. Kiaušidės audinio užšaldymas	21
1.2.3. Kiaušidės audinio retransplantacijos saugumas	24
1.3. Tyrimai, naudojant kiaušidės audinį	26
1.3.1. Užšaldymo poveikis kiaušidės audiniui	26
1.3.2. Kiaušidės audinio pažaidos ir folikulų aktyvacija transplantacijos metu	28
1.3.3. Kiaušialąsčių brandinimas <i>in vitro</i>	30
1.4. Kiaušidės audinio užšaldymo, vaisingumo išsaugojimo tikslais, tyrimų situacija Lietuvoje	35
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	37
2.1. Reagentai, priemonės, aparatūra ir programinė įranga	37
2.2. Biomedicininio tyrimų etikos komiteto ir Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimai	39
2.3. Tiriamoji medžiaga	40
2.4. Tyrimo dizainas.....	40
2.5. Metodai	41
2.5.1. Kiaušidės audinių užšaldymas lėto šaldymo metodu.....	41
2.5.2. Kiaušidės audinių greitas atšildymas	41
2.5.3. Kiaušidės audinio paruošimas transplantacijai ir aktyvacija <i>in vitro</i> ..	42
2.5.4. Steroidogenezės ir citotoksiškumo auginimo terpėse įvertinimas	43
2.5.5. Kiaušidės audinio ksenotransplantacija	43
2.5.6. Kiaušidės audinio histologinis ir imunohistocheminis ištyrimai	45
2.5.7. Visuminės RNR išskyrimas	47
2.5.8. Kopijinės DNR sintezė, panaudojant RNR matricą.....	47
2.5.9. Tikro laiko PGR	47
2.5.10. miRNR taikinių paieška ir jų signalinių kelių praturtinimo analizė .	49
2.5.11. Folikulų išskyrimas iš kiaušidės audinio.....	49
2.5.12. Kiaušidės audinio stromos ląstelių išskyrimas ir auginimas <i>in vitro</i>	49
2.5.13. Folikulų gyvybingumo vertinimas	50
2.5.14. Dirbtinės kiaušidės konstravimas – folikulų inkapsuliacija į alginato lašelius ir brandinimas <i>in vitro</i>	51

2.5.15. Folikulų klasifikacija pagal dydį.....	52
2.5.16. Steroidogenezės dirbtinių kiaušidžių auginimo terpėse įvertinimas.....	52
2.5.17. Šiaurės-Baltijos regiono šalių vaikų onkologijos centrų apklausa.....	52
2.5.18. Statistinė duomenų analizė.....	53
3. REZULTATAI.....	54
3.1. Atšildytų kiaušidės audinių įvertinimas.....	54
3.1.1. Struktūros įvertinimas.....	54
3.1.2. Audinio gyvybingumo, prigijimo ir piktybinių transformacijų įvertinimas.....	56
3.1.3. MiRNR raiškos įvertinimas ir analizė.....	57
3.2.1. <i>In vitro</i> aktyvacijos sukulto audinių citotoksiškumo ir steroidogenezės atnaujinimo įvertinimas.....	62
3.2.2. Kiaušidės audinio <i>in vitro</i> aktyvacijos prieš ksenotransplantaciją poveikis revaskuliarizacijai.....	64
3.2.3. Kiaušidės audinio <i>in vitro</i> aktyvacijos prieš ksenotransplantaciją poveikis genų, susijusių su folikulogeneze, audinio vientisumo išlaikymu ir pažaidomis, raiškai.....	67
3.3. Dirbtinės kiaušidės modelių konstravimas <i>in vitro</i>	71
3.3.1. Užmazginių ir pirminių folikulų išskyrimas bei inkapsuliacija į alginato lašelius.....	71
3.3.2. Folikulų gyvybingumo įvertinimas dirbtinės kiaušidės modeliuose.....	72
3.3.3. Folikulų vystymosi įvertinimas dirbtinės kiaušidės modeliuose.....	73
3.4. Šiaurės ir Baltijos šalių vaikų vaisingumo išsaugojimo situacijos įvertinimas.....	76
3.4.1. Vaisingumo išsaugojimo ir konsultavimo gairės.....	77
3.4.2. Berniukų ir mergaičių vaisingumo išsaugojimo strategijos.....	80
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	83
IŠVADOS.....	96
REKOMENDACIJOS.....	98
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	99
PRIEDAI.....	125
SUMMARY.....	140
PADĖKA.....	167
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....	168
GYVENIMO APRAŠAS.....	171

SANTRUMPOS

α -SMA – alfa lygiųjų raumenų aktinas (angl. *Alfa Smooth Muscle Actin*)
Akt – baltymų kinazė B (angl. *protein kinase B*)
AMH – Antimiulerinis hormonas
ANGPT – angiopoetinas
bFGF – bazinis fibroblastų augimo veiksnys (angl. *basic fibroblast growth factor*)
CASP3 – kaspazė 3
CED – ciklofosfamido ekvivalentinė dozė
CYP19 – citochromo P450 aromatazė
COLL – kolagenas
Ct – amplifikacijos ciklas, kurio metu PGR kreivė kerta foninės fluorescencijos slenkstį
CTGF – jungiamojo audinio augimo veiksnys (angl. *connective tissue growth factor*)
d0 / d7 – nulinė / septinta *in vitro* eksperimento diena
DMSO – dimetilsulfoksidas
DPBS – *Dulbecco* buferinis druskų tirpalas (angl. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*)
EGF – epidermio augimo veiksnys (angl. *epidermal growth factor*)
EPO – eritropoetinas
FBS – fetalinis veršelio serumas (angl. *fetal bovine serum*)
FN – fibronektinas
FOXL2 – transkripcijos veiksnys forkhead box L2
FoxO – *forkhead box* baltymas O (angl. *forkhead box O*)
FSH – folikulus stimuliuojantis hormonas
G-CSF – granulocitų kolonijas stimuliuojantis veiksnys (angl. *granulocyte colony-stimulating factor*)
GDF9 – augimo diferenciacijos veiksnys 9 (angl. *growth differentiation factor 9*)
GL – grūdėtosios ląstelės (angl. *granulosa cells*)
GnAH – gonadotropiną atpalaiduojantis hormonas
HIF1 – hipoksijos sukeltas veiksnys 1 (angl. *hypoxia-inducible factor 1*)
HMG – žmogaus menopauzinis gonadotropinas (angl. *human menopausal gonadotropin*)
HKLT – hematopoetinių kamieninių ląstelių transplantacija (angl. *hematopoietic stem cell transplantation*)
HRP – krienų peroksidazė (angl. *horseradish peroxidase*)

IGF1 – į insuliną panašus augimo veiksnys (angl. *insulin-like growth factor I*)
IKR – interkvartilinis regionas
IVF – *in vitro* apvaisinimas (angl. *in vitro fertilization*)
IVM – *in vitro* brandinimas (angl. *in vitro maturation*)
JAV – Jungtinės Amerikos Valstijos
KA – kiaušidės audiniai
kaSL – kiaušidės audinio stromos ląstelės
KEGG – Kioto genų ir genomo enciklopedija (angl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)
LDH – laktato dehidrogenazė
LH – liuteinizuojantis hormonas
LOX – lisiloksidazė
MOPS – 3-(N-morfolino) propano sulfoninė rūgštis
NAC – N-acetilcisteinas
NOPHO – Šiaurės šalių pediatriinės hematologijos ir onkologijos draugija (angl. *Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology*)
NVI – Nacionalinis vėžio institutas
OT – optinis tankis
PI3K – fosfatidilinositolio-3-kinazė (angl. *phosphatidylinositol-3-kinase*)
PJS – paaugliai ir jauni suaugusieji
PRDX – peroksireduksinas
ROS – reaktyvios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*)
SCF – kamieninių ląstelių veiksnys (angl. *stem cell factor*)
SEM – standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)
SN – standartinis nuokrypis
SOD – superoksido dismutazė
TBS – TRIS druskos buferis
TL – teka ląstelės (angl. *theca cells*)
VEGF – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (angl. *vascular endothelial growth factor*)
VU GMC – Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras
VULSK – Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos
ŽSA – žmogaus serumo albuminas

IVADAS

Jauno amžiaus asmenų, sergančiųjų onkologinėmis ligomis, palaipsniui vis daugėja nuo 1950-ųjų. Kasmet pasaulyje, manoma, yra diagnozuojama apie 1,300,000 naujų atvejų paauglių ir suaugusiųjų iki 39-ių metų asmenų (Hughes *et al.*, 2024), kurių net 85 % išgyvena (Keegan *et al.*, 2024). Vėžiu sergančių asmenų gydymui gali būti naudojami medikamentinis, spindulinis ir chirurginis metodai, kaulų čiulpų transplantacija (Kim *et al.*, 2018), tačiau toks gydymas dažnai pažeidžia ar sunaikina ne tik vėžines, bet ir sveikų audinių ląsteles. Dėka naujausių vėžio gydymo būdų, šių pacientų išgyvenamumas ilgėja (Silber *et al.*, 2016; Gertosio *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018), bet dažnai dėl chemoterapijos ar radiacijos poveikio lieka pažeisti reprodukciniai audiniai (Gertosio *et al.*, 2018), todėl asmenys, jauname amžiuje persirgę vėžiu, dažnai tampa dalinai ar visiškai nevaisingi (Stukaite-Ruibiene *et al.*, 2021), o dėl nuolatinės psichologinės įtampos ir nepilnavertiškumo jausmo, blogėja jų gyvenimo kokybė (Logan *et al.*, 2019). Prieš skiriant gonadotoksinį gydymą, svarbu informuoti pacientus ar jų tėvus apie vėžio terapijos pasekmes vaisingumui, kad jie galėtų priimti savarankiškus sprendimus dėl savo ar savo vaikų reprodukcinės sveikatos ateityje (Sullivan-Pyke *et al.*, 2018; Anazodo *et al.*, 2019; Zobielaite *et al.*, 2022). Konsultacijų metu, kartu su reprodukcinės medicinos specialistais, turėtų būti aptartos bei rekomenduojamos vaisingumą išsaugančios technologijos (Oktay *et al.*, 2018; Logan *et al.*, 2019).

Pasaulyje yra patvirtinti ir rekomenduojami skirtingi vaisingumo išsaugojimo metodai, priklausomai nuo paciento amžiaus, ligos tipo ir jos atsinaujinimo tikimybės (Gertosio *et al.*, 2018). Lytinės brandos nesulaukusioms pacientėms, yra taikomas lytinių liaukų ekranavimas ar jų transpozicija (Oktay *et al.*, 2018). Lytinės brandos sulaukusioms pacientėms taikomas kiaušialąsčių arba embrionų užšaldymas. Tačiau šie metodai reikalauja vėžio gydymo atidėjimo bent keletui savaičių, kol bus subrandintos kiaušialąstės hormoninės stimuliacijos metu. Taip pat stimuliacija hormonais galima tik esant tam tikroms vėžio lokalizacijoms (Muñoz *et al.*, 2016). Nors kiaušidžių audinio (KA) užšaldymas, kuris nereikalauja gydymo atidėjimo, lytinės brandos sulaukusioms pacientėms taikomas beveik visame pasaulyje ir yra patvirtinta vaisingumo išsaugojimo technologija (*Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine*, 2019), tais pačiais metais Lietuvoje tik pradėti pirmieji eksperimentiniai tyrimai su užšaldytu KA (Gudlevičienė *et al.*, 2020). Lytinės brandos nesulaukusioms pacientėms KA užšaldymo taikymas vaisingumo išsaugojimo tikslais yra eksperimentinėje stadijoje visame pasaulyje (Mulder *et al.*, 2021).

Pirmasis užšaldyto moters KA transplantacijos eksperimentas atliktas daugiau nei prieš du dešimtmečius (Oktay *et al.*, 2000). KA retransplantacija remisijos periodu yra taikoma daugelyje pasaulio šalių moterims, sergančioms solidiniais navikais, pavyzdžiui, krūties vėžiu (Bastings *et al.*, 2013). Įrodyta, kad sergant šios lokalizacijos vėžiu, rizika kartu retransplantuoti navikines ląsteles yra vidutinė (Grubliauskaitė *et al.*, 2023a), tad būtina nustatyti patikimus žymenis, leidžiančius įvertinti piktybinių ląstelių buvimą audinyje. Hematologinių navikų atveju piktybinės ląstelės dar lengviau gali infiltruoti reprodukcinį audinį, todėl retransplantacija pasižymi didele rizika sukelti ligos recidyvą (*Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine*, 2019; Grubliauskaitė *et al.*, 2023a). Šioms pacientėms retransplantacija nėra rekomenduojama, tad joms ateityje galėtų būti taikomos eksperimentinėje stadijoje esančios atšildyto audinio ar jo komponentų brandinimas *in vitro* (angl. *in vitro maturation*, IVM) pavieniui ar dirbtinės kiaušidės modeliuose (Muñoz *et al.*, 2016; Oktay *et al.*, 2018).

Aktualumas

2020 metais Europos Komitetas paskelbė „Europos Horizonte“ misijas, kurių viena – misija VĖŽYS. Europos kovos su vėžiu plano tikslas – iki 2030 metų išgelbėti daugiau nei 3 milijonus vėžiu sergančių žmonių, prailginti jų gyvenimo trukmę ir pagerinti šių asmenų gyvenimo kokybę (<https://europoshorizontas.lt/>). Gyvenimo kokybės gerinimas numatomas ne tik ligos eigoje, bet ir pasiekus remisiją, tad neatsiejamai vienas iš gyvenimo kokybės rodiklių yra reprodukcinis potencialas – vaisingumas. Išgyvenusieji susiduria su gyvenimo kokybės sumažėjimu tiek fiziologinėje, socialinėje, psichologinėje ir dvasinėje gerovėse, kurioms, jau seniai įrodyta, vaisingumas, bendra fizinė būklė, viltis sukurti šeimą ir romantiniai santykiai daro įtaką (Muñoz *et al.*, 2008). Tačiau pacientų ar nepilnamečių vaikų tėvų apklausų rezultatai rodo, jog jie nėra pakankamai konsultuojami apie vaisingumo išsaugojimo galimybes bei jie susiduria su žinių trūkumu (Omani-Samani *et al.*, 2021; Zobielaite *et al.*, 2022). Harmonizuotų vaisingumo išsaugojimo gairių, apimančių konsultavimą, nevaisingumo rizikos stratifikavimą ir vaisingumo išsaugojimo metodų rekomendacijas, įtraukimas į klinikinę praktiką, galėtų išspręsti ne tik šias problemas, bet ir palengvinti gydytojams tenkančią konsultacijų naštą (Mulder *et al.*, 2021, Asadi-Azarbajani *et al.*, 2024).

Nustačius vėžio diagnozę, vaisingumo išsaugojimas tampa opi problema – laiko stoka prieš pradedant gonadotoksinį gydymą ir rizika susijusi su hormonine stimuliacija, o ir stimuliacijos metu subrandintos

kiaušialąstės nėra tokios atsparios žemai temperatūrai (Gertosio *et al.*, 2018). Kita galima vaisingumo išsaugojimo strategija – embrionų užšaldymas, tačiau vaisingumo išsaugojimas aktualus ir jaunos moterims, paauglėms bei mergaitėms, kurios dažnai dar neturi gyvenimo partnerio (Okta *et al.*, 2018). Mokslininkų darbai leidžia teigti, kad reprodukcinio audinio užšaldymas gali padėti išspręsti šią problemą. Audinys gali būti paimamas tos pačios operacijos, kai yra šalinamas navikas, metu. Užšaldomas KA su jame esančiais nesubrendusiais folikulais ir kiaušialąstėmis, todėl nėra reikalinga papildoma stimuliacija hormonais ir neprarandamas gydymui svarbus laikas (Muñoz *et al.*, 2016). Taip pat, nebrandžios kiaušialąstės audinyje yra atsparesnės žemos temperatūros poveikiui. Esant poreikiui, audinys gali būti atšildytas ir retransplantuotas atgal į organizmą arba panaudotas folikulų išskyrimui ir dirbtinių kiaušidžių konstravimui ar brandinimui *in vitro*. Norint taikyti naujausias vaisingumo išsaugojimo strategijas, reikia optimizuoti transplantacijos bei folikulų išskyrimo protokolus, gilinti folikulų vystymosi bei kiaušidėje vykstančių procesų supratimą. Nors procedūrų eiga aiški, klausimų dėl saugumo yra dar daug, o jų sprendimui jungiasi viso pasaulio reprodukcinės krypties tyrėjai.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas: išvystyti saugias vaisingumo atkūrimo strategijas vertinant reprodukcinį audinių transplantacijos *in vivo*, aktyvacijos *in vitro* ir dirbtinių kiaušidžių konstravimo modelius.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti reprodukcinį audinių, užšaldytų ir saugotų ilgiau nei 5 metus, gebėjimą išlaikyti jų gyvybingumą bei struktūros vientisumą atliekant ksenotransplantacijos ir molekulinis tyrimus;
2. Nustatyti *in vitro* ir kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A bei antioksidanto rutino derinio poveikį kiaušidės audinių ksenotransplantacijai ir genų, susijusių su audinio vientisumu, folikulogeneze bei pažaidomis, raiškos pokyčiams;
3. Konstruojant skirtingus dirbtinės kiaušidės modelius, įvertinti žemos vystymosi stadijos (užuomazginių ir tarpinių) folikulų aktyvacijos ir brendimo iki aukštesnės stadijos folikulų potencialą kultūroje *in vitro*;
4. Atlikus apklausą įvertinti vaisingumo priežiūrą ir išsaugojimo metodų taikymą Šiaurės ir Baltijos šalių regione vėžiu sergantiems pacientams iki ir po lytinės brandos.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Šio darbo naujumas apima reprodukcinių audinių šaldymo, transplantacijos, molekulinį tyrimų, lytinių ląstelių brandinimo *in vitro* ir dirbtinės kiaušidės konstravimo biotechnologijų vystymą bei įdiegimą Lietuvoje. Taip pat, papildomai šio darbo metu buvo įvertinta ir apibendrinta gairių bei taikomų vaisingumo išsaugojimo strategijų situacija Šiaurės ir Baltijos šalių onkologijos centruose.

Šio doktorantūros darbo rėmuose buvo atliekamas biomedicininis tyrimas, kurio metu buvo tikrinamas lėto KA šaldymo protokolas, kuris, pagal literatūrą ir pirmuosius audinio šaldymo tyrimus 2014 metų pradžioje, gali išsaugoti audinio gyvybingumą. Todėl šio tyrimo tikslas buvo įvertinti pirmą kartą Lietuvoje surinktų, lėtai užšaldytų / greitai atšildytų žmogaus KA, skirtų ateities retransplantacijai, gyvybingumą, bendrą kokybę ir saugumą, taikant šiuolaikinius biotechnologinių tyrimų metodus. Mūsų rezultatai parodė, kad lėtas užšaldymas yra efektyvus būdas šaldyti KA, kuris nesukelia žalingų audinio pažeidimų. Parodėme, kad 5-ių savaičių audinio ksenotransplantacijos tyrimas su imunodeficitinėmis pelėmis galėtų būti pakeistas laikui neimliais histologiniais, imunohistocheminiais ar molekuliniais tyrimais. Nėgana to, atlikti molekuliniai miRNR raiškos tyrimai, leido nustatyti krūties navikinio audinio miRNR raiškos profilį (identifikuotos miRNR, iš *Human Breast Cancer miScript miRNA* PGR gardelių, kurių raiškos padidėjimas ar sumažėjimas būdingas tik krūties navikiniam audiniui), kuriuo remiantis būtų galima daryti prielaidas ar KA, paimtas iš krūties vėžiu sergančios moters, yra saugus retransplantacijai. Nors papildomi patikrinimo tyrimai dar reikalingi siekiant įrodyti šio metodo patikimumą, taikant šį miRNR raiškos profilį išanalizuoti didesnę skaičių navikinių krūties bei KA audinių, pradiniai rezultatai rodo, toks metodas galėtų būti sėkmingai taikomas klinikinėje praktikoje ateityje prieš KA retransplantaciją.

Taip pat, mūsų atlikto tyrimo metu pirmą kartą išmėgintas žmogaus KA *in vitro* aktyvavimas, praturtinant mitybinę terpę VEGF-A veiksmu ir antioksidantu rutinu, prieš ksenotransplantaciją, siekiant pagerinti audinių revaskuliarizacijos procesą, sumažinti audinio struktūrinius pakitimus bei oksidacinio streso sukeltas pažeidimus ir išsaugoti kuo daugiau užuomazginių ir besivystančių folikulų. Tačiau pradiniai rezultatai parodė, jog šių komponentų pridėjimas neturėjo reikšmingos įtakos ilgalaikiai ksenotransplantacijai.

KA šaldymas ir retransplantacija remisijos metu nėra taikomi pacientams, kurioms nustatyta didelė navikinių ląstelių metastazavimo rizika, dėl galimybės sukelti ligos atsinaujinimą. Viena iš galimų strategijų šiai problemai spręsti – dirbtinės kiaušidės konstravimas, t.y. panaudojus pradinės

vystymosi stadijos folikulus, išskirtus iš užšaldyto KA, somatines KA ląsteles ir karkasą, sukonstruoti 3D struktūras. Šio tyrimo metu gauti rezultatai parodė, kad net somatinių menopauzinio KA ląstelių įtraukimas konstruojant dirbtinę kiaušidę turėjo teigiamą poveikį užuomazginių ir tarpinių folikulų augimui, kokybei, vystymuisi ir bręstančių folikulų hormonų sekrecijai kultūroje *in vitro*. Tokie sėkmingi užuomazginių folikulų aktyvacijos ir subrandinimo iki antrinių folikulų rezultatai, publikuoti pirmą kartą, rodo, kad metodas gali būti efektyvus tobulinant pagalbinio apvaisinimo technologijas ir vaisingumo išsaugojimo strategijas onkologinėms pacientėms.

Atlikus KA užšaldymo ir atšildymo, KA ksenotransplantacijos tyrimus, folikulų brandinimo *in vitro* eksperimentus ir įvertinus šių procedūrų saugumą, patikimumą bei galimas rizikas, bus paruoštos technologijos, kurios leis pradėti naują reprodukcinių audinių regeneracinės medicinos sritį Lietuvoje. Šiuo metu lėto KA užšaldymo technologija jau taikoma net tik Nacionaliniame vėžio centre, bet ir Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose onkologinių pacienčių vaisingumo išsaugojimui. Patvirtinus saugias KA lėto užšaldymo / greito atšildymo ir retransplantacijos technologijas, bus pasiektas ir kitas svarbus tikslas – pradėtos rengti vaisingumo išsaugojimo gairės, atitinkančios tarptautines rekomendacijas, kurios bus taikomos visoje Lietuvoje. Atliktas Šiaurės-Baltijos regiono vaikų onkologijos centrų apklausos tyrimas atskleidė, jog ne tik kad ne visos šalys turėjo vaisingumo išsaugojimo nacionalines gaires (tarp jų ir Lietuva) 2022 metais, bet ir poreikį atnaujinti turimas rekomendacijas tose šalyse, kuriose nacionalinės gairės yra patvirtintos, siekiant standartizuoti vaisingumo priežiūrą ir pacientų gyvenimo kokybės gerinimą regione.

Šio darbo rezultatai suteikia ne tik teorinių įžvalgų, bet ir praktinių įrodymų lėto KA užšaldymo metodo pritaikomumui klinikinėje praktikoje. Didžiausia šio darbo nauda – pradėtas šios technologijos taikymas vaikams ir paauglėms mergaitėms iki lytinės brandos, kurių onkologinių ligų gydymas yra ypač agresyvus, o lytinės ląstelės jų organizme dar nesubrendusios.

Ateityje KA užšaldymo, ilgalaikio saugojimo, retransplantacijos ir lytinių ląstelių brandinimo technologijomis *in vitro* galėtų būti panaudojamos ne tik vėžiu sergantiems, bet ir sudėtingas traumas (pavyzdžiui, stuburo) patyrusiems asmenims bei asmenims, kurie nori susilaukti vaikų vyresniame amžiuje ar nutolinti menopauzę.

GINAMIEJI TEIGINIAI

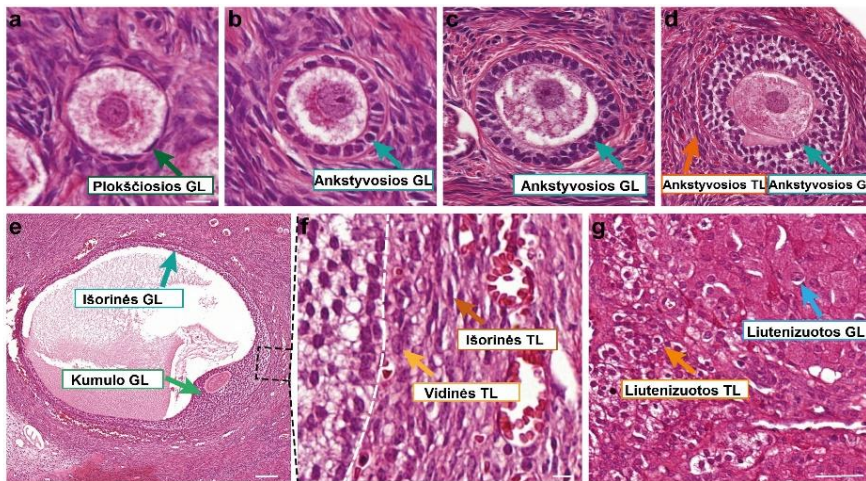
1. Kiaušidės audinio lėtas užšaldymas ir ilgalaikis saugojimas žemoje temperatūroje yra efektyvi strategija reprodukcinio amžiaus onkologinių pacienčių vaisingumui išsaugojimui.
2. *In vitro* kiaušidės audinio aktyvacija (standartinės mitybinės terpės sudėties praturtinimas augimo veiksnio VEGF-A ir antioksidanto rutino deriniu) prieš ksenotransplantaciją, pagerina audinio revaskuliarizacijos procesus, sumažina audinio struktūrinius pokyčius bei oksidacinio streso sukeltas pažeidas, išsaugodamas daugiau užuomazginių ir besivystančių folikulų.
3. Kiaušidės audinio stromos ląstelių įtraukimas į dirbtinės kiaušidės modelį, padeda subrandinti pradinės vystymosi stadijos folikulus iki antrinių folikulų, išaugant jų gyvybingumą, kokybę ir funkcijas *in vitro*.
4. Šiaurės šalių pediatriinės hematologijos ir onkologijos draugijos narių vaisingumo išsaugojimo atrankos kriterijai ir konsultavimas onkologijos centruose skiriasi, priklausomai nuo paciento amžiaus, brandos, planuojamo taikyti gydymo bei vaisingumo išsaugojimo metodo.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Kiaušidės audinio sandaros dinamika ir priešvėžinio gydymo poveikis

Moters vaisingumas yra neatsiejamas nuo normaliai funkcionuojančių kiaušidžių ir jose esančių kiaušialąsčių. Subrendusios moters kiaušidės yra sudėtingas ir dinamiškas organas, sudarytas iš daugybės ląstelių tipų, kurios užtikrina kiaušidėse homeostazę, hormonų gamybą ir kiaušialąsčių brendimą. Kiaušidės audinį galima suskirstyti į išorinę – žievinę – bei vidinę – šerdinę – dalis. Kiekviena jų sudaryta iš skirtingų stromos ląstelių tipų, tačiau pagrindinis skirtumas yra tai, jog žieviniame sluoksnyje (~ 1 mm nuo išorinės zonos) išsidėstę ramybės būsenoje esantys folikulai, o šerdyje dominuoja kraujagyslės ir bręstantys folikulai (Wagner *et al.*, 2020).

Moteriškos lyties embriono vystymosi metu, lytinės ląstelės dauginasi ir 20-ą gestacijos savaitę pasiekia didžiausią skaičių (6–7 milijonus). Dėl atrezijos, šis skaičius mažėja iki 1 milijono ramybės būsenoje esančių folikulų gimimo metu ir iki 400 000 sulaukus lytinės brandos. Toks baigtinis folikulų skaičius yra apibrėžiamas kaip kiaušidžių rezervas, kuris ir toliau mažėja kiekvieno menstruacinio ciklo metu, iki kol pasiekama menopauzė (Wallace *et al.*, 2010).

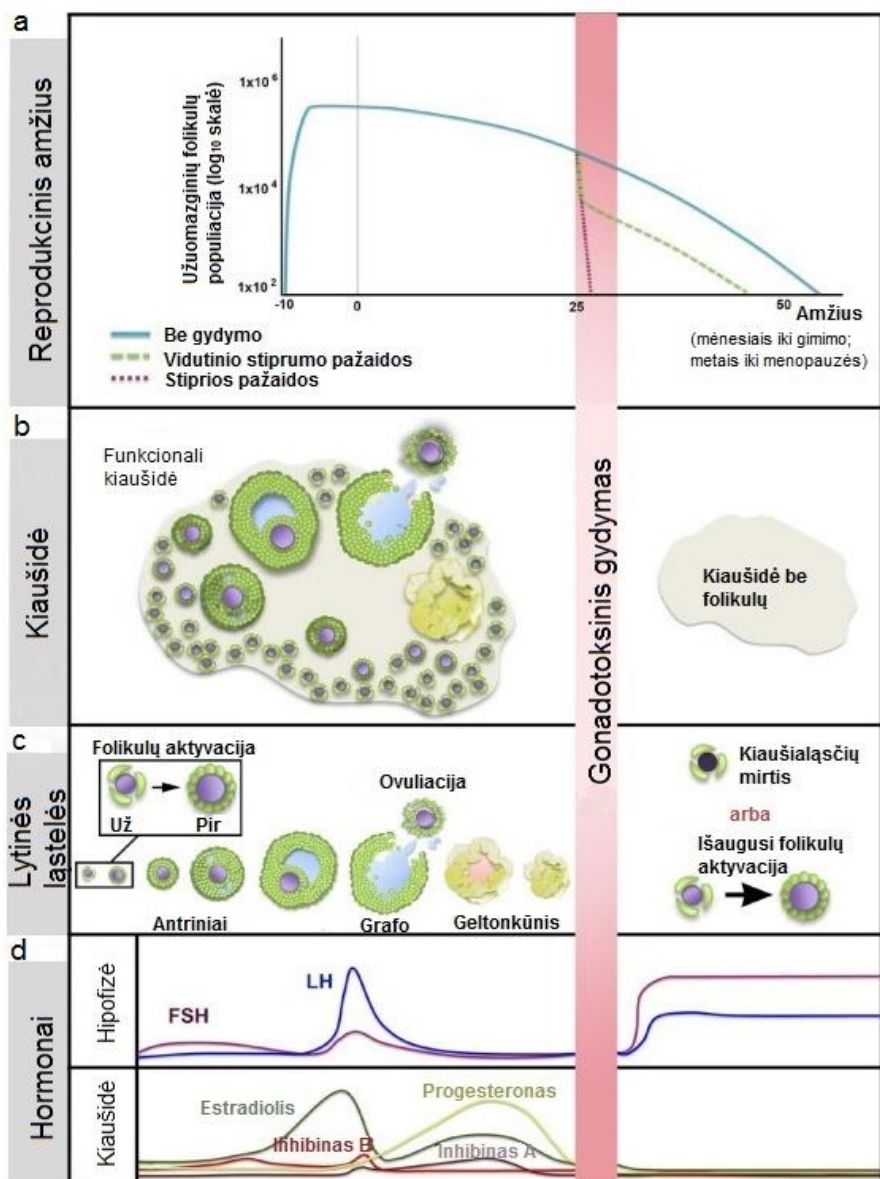


1.1 pav. Žmogaus folikulų brendimo stadijos. **(a)** užuomazginis folikulas su plokščiomis GL; **(b)** pirminis folikulas su užuomazginėmis GL; **(c)** ankstyvasis antrinis folikulas su užuomazginėmis GL; **(d)** vėlyvasis antrinis folikulas su ankstyvosiomis TL ir GL; **(e)** Grafo folikulas su diferencijavusiomis GL; **(f)** Grafo folikulo diferencijavusios TL; **(g)** geltonkūnis su skirtingais TL ir GL tipais. Mastelis a-d/f, e ir g yra 10 µm, 100 µm ir 50 µm, atitinkamai. GL – grūdėtosios ląstelės, TL – teka ląstelės. Adaptuota pagal Fan ir Chuva de Sousa Lopes, 2021. Licencija CC-BY 4.0.

Ramybės būsenoje esantys folikulai yra užuomazginiai folikulai, sudaryti iš kiaušialąstės, kuri apsupta plokščiųjų grūdėtųjų ląstelių (GL) (1.1 pav., a), ir tarpiniai folikulai, kurie turi bent vieną plokščiąją GL diferencijavusią į kuboidinę ankstyvąją GL. Kai visos folikulo plokščiosios GL diferencijuoją į ankstyvasias GL, toks folikulas tampa augančiu pirminiu folikulu (1.1 pav., b), kuris iš KA žievinės dalies juda link mažiau tankios šerdinės dalies (Wagner *et al.*, 2020). Antriniam folikului būdinga keli sluoksniai ankstyvųjų GL, išsidėsčiusių aplink kiaušialąstę, bei aplinkui besitelkiančios ankstyvosios teka ląstelės (TL) (1.1 pav., c-d). Toks folikulas auga toliau ir, suformavęs antrinę pūslelę su diferencijavusiomis išorinėmis ir kumuluso GL (1.1 pav., e) bei išorinėmis ir vidinėmis TL (1.1 pav., f), yra vadinamas Grafo folikulu, kuris pasiruošęs ovuliacijai. Po ovuliacijos, Grafo folikulas tampa geltonkūniu, kurį sudaro liutenizuotos GL ir TL (1.1 pav., g) (Fan ir Chuva de Sousa Lopes, 2021).

Chemoterapija ir spindulinis gydymas pasižymi gonadotoksiniais poveikiais, dėl ko pažeidžiamos kiaušidžių audinio funkcijos. Chemoterapijos rūšis, režimas bei dozė yra labai svarbūs vertinant šį poveikį kiaušidės audiniui (Fleischer *et al.*, 2011). Kuo jis stipresnis, tuo didesnė priešlaikinio kiaušidžių rezervo išsekimo tikimybė (1.2 pav., a–c) (Kim *et al.*, 2016a). Nėgana to, folikulai pasižymi ir endokrine funkcija, kuri priklauso nuo ciklinio kiaušialąsčių brendimo (Kim *et al.*, 2016a). Bręstantys folikulai sintetina hormonus, kurie yra būtini ne tik kiaušialąsčių brendimui ir vaisingumui, bet ir endokrinei sistemai (1.2 pav., d). Atsiradęs estrogenų nepakankamumas dėl kiaušidžių funkcijos sutrikimo turi neigiamą poveikį gyvenimo kokybei, kaulų funkcijai, širdies ir kraujagyslių bei neurologinėi sistemoms, todėl, norint palaikyti visapusišką moters sveikatą ir sumažinti ilgalaikio chemoterapinio pažeidimo poveikį, būtina išsaugoti kiaušidžių rezervą ir jo funkciją (1.2 pav.) (Gargus *et al.*, 2018).

Išaiškintas ne vienas mechanizmas kaip chemoterapiniai vaistai veikia įvairios brandumo stadijos folikulus, pradedant išaugusia aktyvacija, atrezija, apoptoze, baigiant uždegiminiais ir vaskuliarizacijos procesais (Morgan *et al.*, 2012; Spears *et al.*, 2019). Dėl tankaus žievinio audinio ir negausaus jame esančių kraujagyslių tinklo, ramybės būsenoje esančius folikulus pasiekia žemesnė chemoterapinių vaistų koncentracija difuzijos būdu nei šerdinį sluoksnį su aktyviai augančiais folikulais ir gerai išsivysčiusiu kraujagyslių tinklu. Nors tiesioginis atrezijos ir apoptozės mastas nėra tiksliai žinomas, nustatytas ne vienas su apoptoze susijęs veiksnys, turintis įtakos folikulų rezervo reguliavimui (Nguyen *et al.*, 2018). Taip pat, priešvėžinio gydymo metu sukelta amenorėja yra antrinis padarinys dėl bręstančių folikulų praradimo.



1.2 pav. Gonadotoksinio gydymo pasekmės reprodukcinio amžiaus moterims. **(a)** užuomazginių folikulų populiacija – kiaušidės rezervas – gali būti apibūdintas paraboline kreive, kai užuomazginių folikulų aktyvacija arba mirtis vyksta progresyviai su kiekvienu menstruaciniu ciklu; **(b–d)** kiekvieno ciklo metu folikulų brendimas palaiko normalų hormonų balansą. Gonadotoksinis gydymas (rožinė juosta) sukelia staigų užuomazginių folikulų skaičiaus sumažėjimą **(a–c)**, dėl ko įvyksta priešlaikinis kiaušidžių išsekimas. Kiaušidės rezervo sunaikinimas sutrikdo normalią endokrininės sistemos veiklą ir hormonų gamybą **(d)**, dėl ko sukeliamas hormonų disbalansas, panašus į vykstantį menopauzės metu. Už – užuomazginiai, Pir – pirminiai folikulai. Adaptuota pagal Kim *et al.*, 2016a. Licencija CC BY-NC 4.0.

Didžioji dalis folikulų tampa atreziniais vienoje ar kitoje brendimo stadijoje dėl aktyviai besidalijančių GL aplinkui kiaušialąstę, kurios yra ypač jautrios pažaidoms ir chemoterapiniams vaistams – taip sukeliamas tiesioginė bręstančių folikulų apoptozė (1.2 pav., b). Bręstančių folikulų žūtis sukelia netiesioginę užuomazginių folikulų aktyvaciją (1.2 pav., c) dėl sumažėjusios Antimiulerinio hormono (AMH) sekrecijos iš bręstančių folikulų, dėl ko normaliomis sąlygomis palaikomi užuomazginiai folikulai ramybės būsenoje. Taip sukeliamas bendras kiaušidės rezervo sumažėjimas, sutrumpinamas reprodukcinio amžiaus laikotarpis (1.2 pav., a).

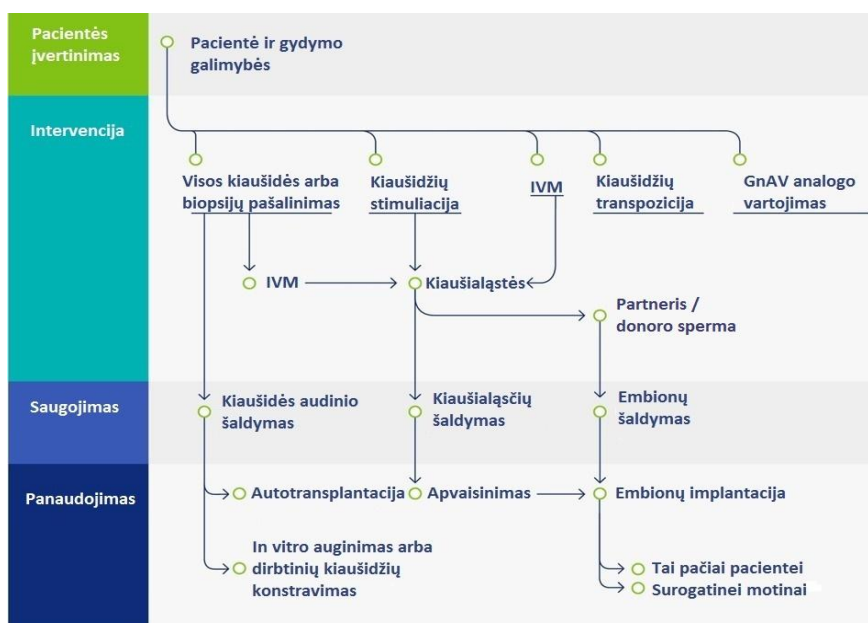
Sumažėjęs kiaušidžių rezervas gali pasireikšti iškart po gydymo kaip nuolatinė amenorėja arba pasireikšti vėliau nevaisingumo ar priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo požymiais. Be to, gonadotoksinis poveikis pasireiškia ir struktūriniais pokyčiais kiaušidžių stromoje bei kraujagyslių tinkle. Sveikoje kiaušidės žievinėje dalyje yra aptinkamos šešios pagrindinės ląstelių populiacijos: kiaušialąstės, grūdėtosios, stromos, imuninės sistemos, perivaskulinės ir endotelinės (Wagner *et al.*, 2020). Menopauzės sulaukusių moterų kiaušidės audinys sudarytas iš endotelininių, limfinių endotelininių, perivaskulinių, lygiųjų raumenų bei stromos ląstelių (Lengyel *et al.*, 2022) ir pasižymi uždegiminiu aplinka, kuri nėra tinkama folikulogenezės palaikymui (Ansere *et al.*, 2021; Ouni *et al.*, 2022). Tyrimai su kiaušidės audiniu po chemoterapinio gydymo atskleidė sukeltą fibrozę bei kraujagyslių pažaidas stromos audinyje, dėl ko pasireiškė audinio išemija, kuri dar stipriau prisideda prie bendro folikulų išsekimo ir hormonų disbalanso (1.2 pav., d) (Meirow *et al.*, 2010; Morgan *et al.*, 2012; Hickman *et al.*, 2016).

Moters vaisingumas priklauso nuo kiaušidžių struktūros ir jose esančio folikulų rezervo, kuris ne tik lemia reprodukcinį potencialą, bet ir hormoninę pusiausvyrą. Dauguma vėžio gydymo metodų pasižymi žalingu poveikiu reprodukciniams audiniams dėl ko mažėja kiaušidžių rezervas, sutrinka hormonų gamyba ir gali pasireikšti priešlaikinis kiaušidžių funkcijos nepakankamumas, todėl svarbu ieškoti būdų, kaip apsaugoti KA gydymo metu.

1.2. Vėžiu sergančių mergaičių ir moterų vaisingumo išsaugojimo galimybės

Daugybė jaunų moterų ir mergaičių, kurioms buvo diagnozuotas vėžys, jau galėjo pasinaudoti vaisingumo išsaugojimo galimybe dėka pagalbinių reprodukcinių technologijų (angl. *assisted reproductive technologies*) ir vaisingumo išsaugojimo strategijų evoliucijos. Daugumos vaisingumo išsaugojimo strategijų, tokių kaip embrionų, neapvaisintų subrendusių

kiaušialąsčių ar kiaušidės audinio biopsijų užšaldymas su retransplantacija bei kiaušidžių transpozicija, saugumas yra patvirtintos moksliniais tyrimais ir taikomos daugelio šalių klinikinėje praktikoje, o kiaušidžių funkcijos slopinimas, KA ar nesubrendusių kiaušialąsčių *in vitro* brandinimas (angl. *in vitro maturation*, IVM), dirbtinės kiaušidės kūrimas bei jos transplantacija, dar vis išlieka iki klinikinių ar klinikinių tyrimų stadijoje (*Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine*, 2019, *The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation et al*, 2020) (1.3 pav.). Dauguma vaisingumo išsaugojimo prieš vėžio gydymą technologijų yra saugios ir, dažniausiai, nereikalaujančios ilgalaikio gydymo atidėjimo, ypač, jeigu pacientės nedelsiant yra nukreipiamos vaisingumo specialisto konsultacijai dar iki sudarant vėžio gydymo planą.



1.3 pav. Vaisingumo išsaugojimo galimybių schema. GnRH – gonadotropiną atpalaiduojantis hormonas (angl. *gonadotropin releasing hormone*), IVM – *in vitro* brandinimas (angl. *in vitro maturation*). Adaptuota pagal *The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation et al*, 2020. Licencija CC BY-NC 4.0.

Nepaisant to, nemažai pacienčių ir jų šeimos narių onkologinės ligos diagnozės metu negauna informacijos apie galimą neigiamą vėžio gydymo įtaką vaisingumui ir jo išsaugojimo galimybes (Rosen *et al.*, 2009; Anazodo *et al.*, 2018). Tyrimai rodo, jog sveikatos priežiūros specialistai susiduria su sunkumais konsultuodami pacientus, kurie susiduria su įvairaus laipsnio vaisingumo sutrikimais (Goossens *et al.*, 2015; Covelli *et al.*, 2019) ir dažnai galimą nevaisingumą laiko ne tokiau svarbiu klausimu lyginant su anksti

pradėtu vėžio gydymu (Covelli *et al.*, 2019). Daugelis nacionalinių ir tarptautinių gairių rekomenduoja vos tik nustatčius vėžio diagnozę, pacientus ar jų tėvus lygiagrečiai informuoti apie vaisingumo išsaugojimą, tačiau tokių paslaugų teikimas ir vaisingumo išsaugojimo technologijų prieinamumas įvairiose šalyse labai skiriasi (Terenziani *et al.*, 2014; Asadi-Azarbajani *et al.*, 2024).

1.2.1. Embrionų ir subrendusių kiaušialąsčių užšaldymas

Embrionų užšaldymas yra seniausias klinikinėje praktikoje taikomas vaisingumo išsaugojimo metodas. Jo metu subrendusi kiaušialąstė yra apvaisinama *in vitro* (angl. *in vitro fertilization*, IVF) ir užšaldoma iki panaudojimo. Nors šis metodas yra plačiai taikomas visame pasaulyje jau nuo 1980 metų (Trounson ir Mohr, 1983) ir žinomas šio metodas efektyvumas, vis dėlto jis turi ir trūkumų (Demeestere, 2020). Pirmiausia, moteris turi turėti partnerį arba pasinaudoti donoro sperma, kad galėtų būti sukurti embrionai. Nėgana to, embrionai, sukurti su partnerio genetinė medžiaga, teisiškai priklauso ir jam, tad kyla etinių problemų, jeigu pora išsiskiria, o moteris pareiškia norą susilaukti vaikų. Taip pat, IVF ir embrionų užšaldymas reikalauja 2–4 savaitžių gydymo atidėjimo, kurio metu specialiais hormoniniais medikamentais atliekama kontroliuojama kiaušidžių stimuliacija, siekiant subrandinti kuo daugiau kiaušialąsčių apvaisinimui. Tokia procedūra yra kontraindikacija pacientėms, sergančioms nuo estrogenų priklausomais navikais bei kurioms gydymas negali būti atidėtas (Brancati *et al.*, 2021). Iki šiol nėra pakankamai duomenų apie nėštumo bei gimstamumo rodiklius po užšaldyto / atšildyto embriono panaudojimo remisijoje esančių moterų populiacijoje, tačiau turinčių vaisingumo sutrikimų, iki 35 metų moterų populiacijoje gimstamumas po embriono perkėlimo ~ 44 % (*Society for Assisted Reproductive Technology*, 2021). Šis vaisingumo išsaugojimo metodas nėra taikomas mergaitėms ar paauglėms (Brancati *et al.*, 2021).

Tad kaip alternatyva embrionų užšaldymui, buvo pradėtos vystyti subrendusių kiaušialąsčių šaldymo technologijos. Nuo 2013 metų šis metodas nebelaikomas eksperimentiniu ir tapo standartine procedūra IVF laboratorijose, suteikiančia moteriai platesnį sprendimų priėmimo spektrą ir autonomiją (*Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology*, 2013). Taip pat, pradėjus naudoti vitrifikaciją – *ultra* greitą užšaldymo metodą, kiaušialąsčių užšaldymo technologija tapo dar sėkmingesnė (Rienzi *et al.*, 2017). Šio vaisingumo išsaugojimo metodo trūkumai tokie patys kaip ir išvardinti aukščiau (Brancati *et al.*, 2021). Abu vaisingumo išsaugojimo metodai

rekomenduojami moterims, kurioms mažiau nei 40 metų. Pavyzdžiui, po kiaušidžių stimuliacijos, jaunesnei nei 26 metų moteriai, vidutiniškai surenkama $15,4 \pm 8,8$ subrendusių kiaušialąsčių, o iš 36–40 metų amžiaus – $9,9 \pm 8,0$ (von Wolff *et al.*, 2018). To paties tyrimo metu buvo nustatyta, kad surenkamų kiaušialąsčių skaičius nepriklauso nuo naviko tipo, išskyrus kiaušidžių vėžio atvejį, kai šis skaičius buvo reikšmingai mažesnis ($7,3 \pm 8,3$, $p < 0,05$). Tuo pačiu metu kita tyrėjų grupė parodė, kad po persirgtos onkologinės ligos remisijoje esančių pacienčių kiaušialąsčių apvaisinimo ir embrionų implantacijos dažniai yra reikšmingai mažesni, dėl ko buvo stebimas ir žemesnis gimdymo dažnis po IVF (42 %) palyginus su onkologine liga nesirgusiomis moterims (69 %) (Cobo *et al.*, 2018). Nors matoma, jog šios abi vaisingumo išsaugojimo strategijos yra veiksmingos, jos nėra tinkamos visų amžiaus pacienčių grupėms, o onkologinėmis ligomis sergančių moterų IVF rezultatai yra prastesni, todėl joms būtina ieškoti kitų vaisingumo išsaugojimo metodų.

1.2.2. Kiaušidės audinio užšaldymas

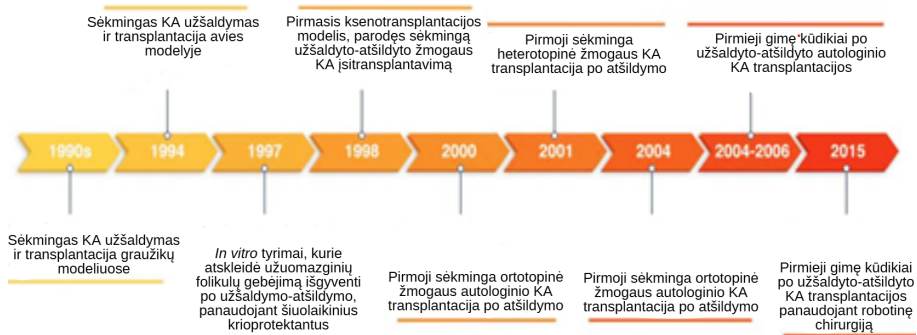
Pirmoji sėkminga atšildyto autologinio KA retransplantacija buvo atlikta 1999 metais (Oktay ir Karlikaya, 2000), tačiau vaisingumo atkūrimo KA retransplantacijos būdu koncepcija buvo pradėta vystyti jau 19 amžiaus pabaigoje, o 1906 metais atlikta pirmoji alogeninė KA transplantacija (Morris, 1907). Šis atvejis atvėrė eksperimentavimo su KA pradžią dar prieš pradėdant KA užšaldymo / atšildymo technologijų erą.

Siekiant įtvirtinti KA retransplantaciją kaip vieną iš vaisingumo išsaugojimo ir atkūrimo technologijų, turėjo būti atlikta daugybė mokslinių tyrimų su gyvūnais (1.4 pav.) (Marin *et al.*, 2020). Iki pat 1970 metų vienintelis naudojamas krioprotektorius buvo glicerolis, kuris neužtikrina žmogaus užuomazginių folikulų išsaugojimo po atšildymo (gyvybingumas siekė ~ 10 %), ir tik atradus efektyvesnius krioprotektorius, tokius kaip propandiolis, etilenglikolis ar dimetilsulfoksidas (DMSO), pademonstravusius didesnę užuomazginių folikulų gyvybingumo išsaugojimą (44–84 %), buvo atvertos durys pažangių KA užšaldymo technologijų plėtrai (Newton *et al.*, 1996).

Paskutiniojo 20 amžiaus dešimtmečio tyrimų pažanga lėmė tai, kad nuo 2000 metų buvo pradėtos alogeninės ir autologinės žmogaus KA transplantacijos (1.4 pav.). Atnaujinus autologinius retransplantacijos tyrimus su graužikais, panaudojant su moderniais krioprotektoriais užšaldytus / atšildytus KA, buvo atkurtas ne tik gyvūnų vaisingumas, bet ir endokrininės sistemos funkcijos (Harp *et al.*, 1994). Tačiau graužikai nėra tinkamiausias

modelis norint atkurti žmogaus kiaušidės charakteristikas, tad stambesni laboratoriniai gyvūnai – avys – buvo sėkmingai panaudoti retransplantacijos tyrimuose su užšaldytu / atšildytu KA. Jų metu buvo pastebėta transplantato spontaninė revaskuliarizacija, funkcionalių folikulų brendimas bei pirmieji nėštumai (Gosden *et al.*, 1994).

Po sėkmingų tyrimų su laboratoriniais gyvūnais ir jų audiniais, Oktay su bendraautoriais atliko pirmuosius ksenotransplantacijos tyrimus – žmogaus KA transplantavo į imunodeficitines peles – taip atnaujindami folikulų augimą transplantate bei estradiolio gamybą (Oktay *et al.*, 1998, Oktay *et al.*, 2000). Paskatinti puikių rezultatų, 2000 metais buvo pranešta ir apie pirmąją sėkmingą ortotopinę žmogaus autologinio KA retransplantaciją po atšildymo moteriai, kuriai buvo pašalintos kiaušidės ir kiaušintakiai (Oktay ir Karlikaya, 2000). Tačiau ne visada galima transplantuoti KA į tą pačią kiaušidės vietą, todėl buvo pradėtos vystyti retransplantacijos technologijos į heterotopines vietas, tokias kaip dilbio ar apatinės pilvo sienos poodžius, kurių metu taip pat buvo atkurta endokrininės sistemos veikla, folikulų vystymasis, atlikta kiaušialąsčių punkcija bei sukurtas pirmasis embrionas (Oktay *et al.*, 2001, Oktay *et al.*, 2004). Tuo pačiu metu (2004–2005 metais) buvo paskelbta apie pirmuosius gimusius kūdikius po lėto užšaldymo / greito atšildyto autologinio KA retransplantacijos (Donnez *et al.*, 2004, Meirow *et al.*, 2005).



1.4 pav. Kiaušidės audinio užšaldymo, atšildymo ir transplantacijos technologijų evoliucija. Adaptuota pagal Marin *et al.*, 2020. KA – kiaušidės audinys. Licencijos nr. 1610243-1.

KA užšaldymas yra vienintelė vaisingumo išsaugojimo technologija, kuri gali būti taikoma brandos nesulaukusioms pacientėms ir pacientėms, kurioms, dėl agresyvios piktybinės ligos, gonadotoksinis gydymas negali būti atidėtas. Be to, tai yra vienintelis vaisingumo išsaugojimo metodas, kurio dėka atkurama ne tik normali kiaušidžių funkcija, bet ir endokrininės sistemos veikla (Donnez ir Dolmans, 2013, Spears *et al.*, 2019, Khattak *et al.*, 2022).

Nors Europos žemyne yra 24-ios šalys, kurios turi KA biobankus (Bilić *et al.*, 2021) ir taiko praktikoje šią vaisingumo išsaugojimo strategiją, atrankos kriterijai nėra vieningi tarp pasaulio šalių ir specialistų asociacijų (Backhus *et al.*, 2007, Loren *et al.*, 2013, Wallace *et al.*, 2014, Ruan, 2018, Yasmin *et al.*, 2018, von Wolff *et al.*, 2019, *The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation et al.*, 2020). Apibendrinti pagrindiniai kriterijai yra: pacientė gauna didelių dozių chemoterapiją, dėl kurios atsiranda didelė (> 50 %) priešlaikinio kiaušidžių išsekimo rizika; maža rizika metastazėms į kiaušides; realus išgyvenamumas daugiau nei 5 metai ir pacientės yra jaunesnės nei 35 metų, tačiau kai kurios šalys ar specialistų asociacijos šį amžių yra pavėlinusios. Amerikos Reprodukcinės Medicinos Asociacija 2019 metais pripažino KA užšaldymą kaip nebe eksperimentinę procedūrą (*Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine*, 2019), nors daugelis pasaulio šalių, taikančių šią technologiją, nepanaikino tokio statuso. Taip pat ši vaisingumo išsaugojimo strategija gali būti taikoma dar trims moterų grupėms: 1) moterims, kurioms taikomas gonadotoksinis gydymas ne dėl piktybinės ligos ar ligos, kuriai būdingas priešlaikinis kiaušidžių išsekimas, pvz.: Turnerio sindromas; 2) translyčiams vyrams; 3) moterims, kurios dėl socialinių priežasčių nori vyresniame amžiuje susilaukti vaikų (*The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation et al.*, 2020, Bilić *et al.*, 2021).

Remiantis 2022 metais atlikta metaanalize, pasaulyje yra mažiausiai 735 moterys, kurioms atlikta atšildyto KA retransplantacija (Khattak *et al.*, 2022). Daugiau nei 70 % atvejų buvo sėkmingai atkurtas menstruacinis ciklas bei endokrininės sistemos veikla, o bendras nėštumo rodiklis siekė 37 %. Šiuo metu pasaulyje turėtų būti jau daugiau nei 200 kūdikių, gimusių po atšildyto KA retransplantacijos, tačiau tai rodo tik 28 % bendrą šios procedūros efektyvumą (Khattak *et al.*, 2022). Reiktų akcentuoti, jog pirmasis gimęs kūdikis po vitrifikuoto KA retransplantacijos Europoje buvo 2024 metais (Sanger *et al.*, 2024); iki tol buvo pranešta apie dar 4 sėkmingus nėštumus Japonijoje bei JAV (Suzuki *et al.*, 2015; Silber *et al.*, 2018). Užšaldyto / atšildyto KA transplantatų gyvybingumas – gebėjimas atkurti endokrininę funkciją ir brandinti gyvybingas kiaušialąstes – gali tęstis nuo kelių mėnesių iki daugiau nei 7 metų (Khattak *et al.*, 2022), o ilgiausiai kiaušidės veiklą atkūrę transplantatai (pakartojant retransplantacijos procedūrą) galėjo funkcionuoti daugiau nei dešimtmetį (Donnez ir Dolmans, 2015, Jensen *et al.*, 2015). Naujausiais duomenimis, yra atlikta 1019 KA užšaldymo procedūrų vėžiu sergančioms jaunesnėms nei 21 metai merginoms, iš kurių – net 289-ios yra jaunesnės nei 13 metų mergaitės. Aštuoniolikai iš jų, pasiekus pilnametystę, buvo retransplantuoti KA, dėl ko 17-ai (94 %) iš jų atkurta

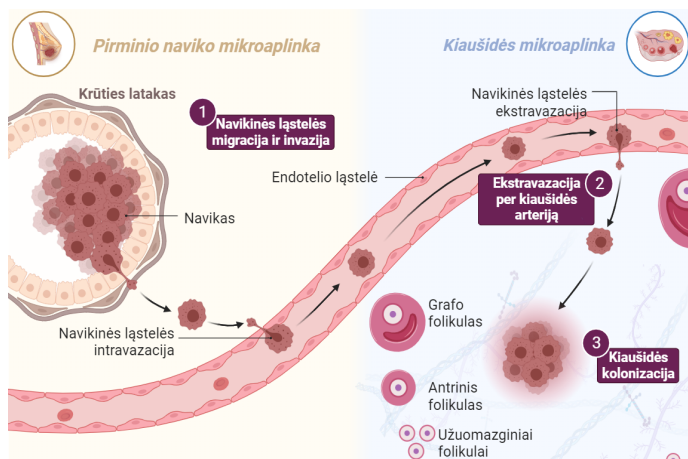
natūrali endokrininės sistemos veikla, bei paskelbta apie 9 gimusius kūdikius (Corkum *et al.*, 2019). Įprastai lytinei brandai sukelti naudojamas medikamentinis gydymas, bet yra aprašyti atvejai, kai jai sukelti buvo panaudota KA retransplantacija (Poirot *et al.*, 2012, Ernst *et al.*, 2013), tačiau endokrinologai šios alternatyvos nerekomenduoja (von Wolff *et al.*, 2016).

KA užšaldymas ir retransplantacija yra išskirtinė vaisingumo išsaugojimo strategija, galinti atkurti tiek reprodukcinę, tiek hormoninę KA funkciją. Nors ši technologija vis dar tobulinama, jos taikymas sparčiai plečiasi, o jau pasiekti rezultatai – menstruacijų ir endokrininės funkcijos atkūrimas bei nuolat augantis gimusių vaikų skaičius – yra daug žadantys sėkmės rodikliai.

1.2.3. Kiaušidės audinio retransplantacijos saugumas

Viena pagrindinių problemų, kodėl KA retransplantacija nėra paplitusi visame pasaulyje ir taikoma klinikinėje praktikoje, yra potenciali galimybė retransplantuoti metastazavusias navikines ląsteles kartu su atšildytu KA.

Siekiant, kad būtų užtikrintas KA retransplantacijos saugumas, būtina įvertinti vėžio metastazavimo į kiaušides riziką ir galimą piktybinių ląstelių aptikimą užšaldytame audinyje (1.5 pav.). Yra atlikta daugybė *in vitro* tyrimų, kurie, panaudoję pacientui pritaikytus nustatymo metodus (angl. *a patient tailor-made approach*), ieško specifinių molekulinį naviko žymenų KA. Šie metodai apima tiek imunohistologinį bei molekulinį, panaudojant tikro laiko PGR, FISH ar daugiaspalvę tėkmės citometriją, ištyrimus, tiek ksenotransplantaciją į imunodeficitines peles norint nustatyti išgyvenusių navikinių ląstelių gebėjimą sukelti piktybinės ligos atsinaujinimą (Hoekman *et al.*, 2015; Shapira *et al.*, 2018; Gudlevičienė *et al.*, 2020; Grubliauskaitė *et al.*, 2023a). Pavyzdžiui, baltymo Ki-67 raiška stebima visose ląstelių ciklo G1, S, G2, M stadijose, išskyrus G0 – ramybės būsenoje – ir yra susijusi su ląstelių proliferacija. Nustatyta, jog didelė Ki-67 baltymo raiška (> 10 %) gali parodyti piktybinių ląsteliųankaupą (Soliman *et al.*, 2016). PGR tyrimai leidžia nustatyti genų ar miRNR raiškos pokyčius, kurie gali nurodyti piktybinių ląstelių buvimą audinyje taip pat. Tačiau taikant šiuos metodus tiriami KA yra sunaikinami, o gauti rezultatai negali būti akiai pritaikomi retransplantuojamiems kiaušidės žievės fragmentams. Net nenustačius piktybinių ląstelių, dėl mėginio atrankos šališkumo, likusiuose užšaldytuose KA gali būti mikrometastazių (Diaz-Garcia *et al.*, 2019). Todėl yra reikalingos naujos strategijos kaip saugiai panaudoti užšaldytą KA vaisingumo atkūrimo tikslais remisijoje esančioms moterims, ypač toms, kurios turi didelę metastazių išplitimo į kiaušides riziką.



1.5 pav. Kiaušidės audinio infiltracija navikinėmis ląstelėmis. (1) navikinė ląstelė atsiskiria nuo pirminio naviko, pavyzdžiui, krūties, ir migruoja per kraujotakos sistemą; (2) navikinė ląstelė patenka į kiaušidės audinį; (3) navikinė ląstelė dalijasi ir kolonizuoja audinį. Paveikslas sukurtas naudojantis BioRender.com.

Kiekvienas vėžio tipas yra įvertinamas atskirai ir priskiriamas mažai (< 0,2 %), vidutinei (0,2–11 %) arba didelei (> 11 %) metastazių išplitimo į kiaušidės rizikai (Grubliauskaitė *et al.*, 2023a). Rizikos yra įvertinamos pagal tai, kiek procentų atvejų, atliekant KA analizę prieš užšaldymą arba retransplantaciją, yra nustatomi naviko žymenys. Naujausioje literatūros apžvalgoje atskleista, kad rizika skiriasi priklausomai nuo amžiaus (moterų ar mergaičių / paauglių iki 18 metų) ir vėžio tipo (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Vėžio žymenų aptikimo rizika kiaušidės audinyje skirtingo amžiaus pacientėms. Pagal Grubliauskaitė *et al.*, 2023a.

Rizika	Vėžio tipai suaugusiųjų grupėje	Vėžio tipai amžiaus grupėje iki 18 metų
Didelė > 11 %	Leukemija, Berkito limfoma, neuroblastoma	Juingo sarkoma, ūminė limfoblastinė leukemija, ūminė ir lėtinė mieloidinė leukemijos
Vidutinė 0,2–11 %	Gimdos adenokarcinoma, krūties vėžys (infiltruojantis lobulinis subtipas, IV stadija), Juingo sarkoma, ne Hodžkino limfoma, storosios žarnos vėžys	
Maža < 0,2 %	Likę vėžio tipai	Osteosarkoma, rabdomiosarkoma, sinovinė sarkoma, skaidriųjų ląstelių sarkoma, Berkito limfoma, jaunatvinė mielomonocitinė leukemija, centrinės nervų sistemos navikai

Abiejose amžiaus grupėse stebimas hematologinių navikų dominavimas didelės metastazavimo rizikos grupėje. Tačiau amžiaus grupėje iki 18 metų – centrinės nervų sistemos navikai, kartu su neuroblastoma, ir minkštųjų audinių sarkomomis, priskiriamos tik mažai rizikai, todėl būtina atlikti didesnės pacientų imties tyrimus skirtingų kategorijų patvirtinimui. Svarbu paminėti, kad 2018 metų pasaulio duomenimis yra užregistruoti tik 9 atvejai, kai liga atsinaujino po atliktos KA retransplantacijos, tačiau nei vienas iš jų nebuvo tiesiogiai sukeltas transplantato (Gellert *et al.*, 2018).

Šis rizikos įvertinimas parodo, kokios vaisingumo atkūrimo strategijos galėtų būti taikomos kiekvienos rizikos grupės pacientėms. Pavyzdžiui, pacientės, kurioms nustatyta maža metastazių išplitimo į kiaušidės rizika, daugiausiai naudos gautų iš KA retransplantacijos (1.2.2 poskyris), o esant didelei metastazių rizikai – dirbtinės kiaušidės konstravimo, audinio *in vitro* brandinimo ar navikinių ląstelių naikinimo *ex vivo* technologijos, kurios bus aptartos 1.2.4 poskyryje.

1.3. Tyrimai, naudojant kiaušidės audinį

Siekiant išplėsti vaisingumo išsaugojimo strategijų spektrą, kuriamos naujos *in vitro* technologijos (*The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation et al.*, 2020), susijusios su KA retransplantacija pacientei, pavyzdžiui: visos kiaušidės retransplantacija po užšaldymo ar KA fragmentų panaudojimas retransplantacijos optimizavimo procedūroms, tokioms kaip *in vitro* audinio aktyvacija, išemijos mažinimas skatinant revaskuliarizacijos procesus, dirbtinių kiaušidžių, su išskirtais iš KA folikulais, konstravimas ar išskirtų iš KA ląstelių persodinimas į gonadotoksinio gydymo pažeistą kiaušidę. Kita mokslinių tyrimų kryptis skirta technologijoms, kurioms nereikalinga retransplantacija, viskas atliekama *in vitro* sąlygomis, pavyzdžiui: kiaušialąsčių brandinimas KA kultūroje, užuomazginių folikulų brandinimas iki kiaušialąsčių ar KA somatinių ląstelių, indukuotų pluripotentinių ląstelių ar mezenchiminių kamieninių ląstelių diferenciacijai iki kiaušialąsčių, tačiau pastarosios technologijos nebus aptariamoms toliau.

1.3.1. Užšaldymo poveikis kiaušidės audiniui

Šiuo metu pagrindiniai KA šaldymo būdai išlieka lėtas (angl. *slow-freezing*) ir *ultra* greitas – vitrifikacija. Kaip jau aptarta anksčiau, ši vaisingumo išsaugojimo technologija nereikalauja gonadotoksinio gydymo atidėjimo, gali būti taikoma pacientėms, kurioms diagnozuoti hormonams jautrūs navikai ir taip pat gali būti taikoma lytinės brandos nesulaukusioms pacientėms. Po

5 metų remisijos galima retransplantuoti KA atgal, tačiau dažnai šis periodas iš tiesų būna ilgesnis dėl pačių pacienčių pasirinkimo (Macklon *et al.*, 2014). Ypač šis periodas prailgėja jaunoms mergaitėms, kurios KA užšaldymo metu buvo dar nesulaukusios lytinės brandos.

Yra atlikti tyrimai, parodantys, kad net 18 metų lėtai užšaldyti KA išlaiko puikią audinio kokybę po atšildymo (Fabbri *et al.*, 2016a). Šio tyrimo metu buvo vertinamas KA visapusiškai – atlikta histologinė, ultrastruktūrinė ir imunohistologinė analizės, DNR fragmentacijos, panaudojant TUNEL metodą, ir stromos ląstelių *in vitro* gyvybingumo, panaudojant fluorescencinius kalceino ir etidžio homodimero dažus, tyrimai. Histologinė analizė pademonstravo geros morfologijos kiaušialąstes, GL ir stromos ląsteles. Taip pat buvo identifikuotos aktyviai proliferuojančios kiaušialąstės ir GL (Ki-67 baltymo raiškos analizė), kas parodo, jog atšildytas audinys geba išlaikyti aukštą folikulo ląstelių dalijimosi potencialą. GL ir stromos ląstelės pasižymėjo didele antiapoptotinio BCL-2 baltymo raiška ir mažu DNR trūkių turinčių ląstelių skaičiumi, rodančiu gerą atšildyto audinio kokybę (Fabbri *et al.*, 2016a). Ta pati tyrėjų grupė atliko kitą tyrimą, lygindami lėto užšaldymo / greito atšildymo ir vitrifikacijos / atšildymo protokolų poveikį KA (Fabbri *et al.*, 2016b). Jų gauti rezultatai patvirtino lėto užšaldymo protokolo pranašumą įvertinant audinio bei folikulų morfologines ir ultrastruktūrines savybes, mitochondrijų aktyvumą panaudojant šviesinę, elektronų transmisijos bei konfokalinę mikroskopijas. Tokią gautą išvadą patvirtina ir anksčiau atliktas tyrimas (Oktem *et al.*, 2011), kurio metu buvo parodytas lėto užšaldymo / greito atšildymo protokolo pranašumas išlaikant didesnę skaičių užuomazginių folikulų ($p < 0,001$) ir didesnę hormonų sekreciją ($p < 0,05$) *in vitro* kultūroje. Taip pat, vitrifikuotų audinių folikulų ultrastruktūrinė analizė atskleidė padidėjusį kiaušialąsčių skaičių su netaisyklingos formos mitochondrijomis, sutankėjusiu chromatinu bei išretėjusia citoplazma (Fabbri *et al.*, 2016b). Tačiau publikuotoje meta-analizėje, kurioje lyginti lėto užšaldymo bei vitrifikacijos protokolai, atskleista, jog vitrifikacija išlaiko reikšmingai didesnę nepažeistų stromos ląstelių dalį, bet kitų histologinių privalumų lyginant su įprastiniu lėto užšaldymo metodu nebuvo nustatyta (Behl *et al.*, 2023). Dėl mažesnės vitrifikacijos kainos ir laiko sąnaudų, iki šiol yra bandoma atrasti efektyvesnių šio metodo protokolų. Neseniai paskelbtuose tyrimuose buvo aprašytas protokolas, kurio efektyvumas yra labai panašus į lėto šaldymo (Schallmoser *et al.*, 2023a; Schallmoser *et al.*, 2023b). Parodyta, jog, po atšildymo ir *in vitro* kultivavimo, folikulų gyvybingumas, angiogeninių veiksnių sekrecija ir apoptozės mastas lyginant abu protokolus statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Tačiau, patikimiausias būdas, įrodantis KA gyvybingumą ir funkcijų atkūrimą po atšildymo, yra

transplantacijos tyrimas. Ksenotransplantacijos tyrimai su žmogaus KA parodė, jog po vitrifikacijos sukelia didesnio masto folikulų atrezija ir ląstelių apoptozę lyginant su lėtu užšaldymu (Rahimi *et al.*, 2010). Po dešimtmečio atliktas palyginamasis lėto užšaldymo ir vitrifikacijos tyrimas patvirtino Rahimi su bendraautoriais gautus rezultatus bei papildė juos parodant geresnį kraujagyslių tinklo atkūrimą (CD31 baltymo raiškos analizė), mažesnę folikulų morfologinę deformaciją ir jų aktyvaciją (Ki-67 baltymo raiškos analizė) lėtai užšaldytuose ir ksenotransplantuotuose KA (Lee *et al.*, 2019).

Nors vitrifikacija yra greitesnis ir ekonomiškai efektyvesnis KA šaldymo metodas, moksliniai tyrimai rodo, jog lėtas užšaldymas yra efektyvesnis, išsaugant KA struktūrą, gyvybingumą ir funkcionalumą, todėl yra laikomas pagrindiniu šaldymo metodu daugumoje pasaulio šalių. Anksčiau aprašyti gimusių vaikų skaičiai po KA autotransplantacijos, patvirtina šiuo metu lėto užšaldymo protokolo pranašumą klinikinėje praktikoje.

1.3.2. Kiaušidės audinio pažeidos ir folikulų aktyvacija transplantacijos metu

Po atšildymo, reprodukciniai audiniai gali būti retransplantuojami atgal tik toms pacientėms, kurioms, nustatyta maža metastazių išplitimo į kiaušides rizika. Tačiau retransplantacijos metu vyksta ne vienas neigiamai veikiantis audinį procesas, pvz. hipoksija, oksidacinis stresas, ramybės būsenoje esančių folikulų aktyvacija ir bręstančių folikulų žūtis. Žievinio audinio fragmentai yra retransplantuojami be kraujagyslių anastomozės. Įrodyta, kad 5–7 dienomis po retransplantacijos yra stebima hipoksija, kuri su laiku mažėja, ir 10 dieną stabilizuojasi, todėl manoma, šiuo metu vyksta aktyvi revaskuliarizacija dėl deguonies trūkumo (van Eyck *et al.*, 2009). Naujų kraujagyslių susidarymas vyksta ne tik iš atšildytame / retransplantuotame audinyje esančių kraujagyslių, bet ir iš paties organizmo aplinkinių audinių. Panaudojant pelės modelius, atskleista, jog šeimininko kraujagyslių invazija į retransplantuotus KA fragmentus prasideda 3–5 dienomis po transplantacijos ir pilnai sukuria naujus kraujagyslių tinklus tarp transplantato ir šeimininko per 10 dienų (van Eyck *et al.*, 2010), o tai koreliuoja su prieš tai įrodytu hipoksijos proceso sumažėjimu. Pagrindinis atsako į hipoksiją reguliatorius yra hipoksijos sukeltas veiksnys 1 (angl. *hypoxia-inducible factor 1*, HIF1), kuris gali skatinti angiogenezę didinant proangiogeninių augimo veiksnių, tokių kaip kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) sintezę. VEGF taip pat yra ir vienas pagrindinių GL proliferacijos reguliatorių hipoksinėmis sąlygomis, kuris gali skatinti užuomazginių folikulų išgyvenamumą (Shiratsuki *et al.*, 2016; Masciangelo

et al., 2020). Tačiau, priklausomai nuo hipoksijos trukmės, gali būti sukeltos negrįžtamos ląstelių pažaidos, dėl kurių aktyvuojama kaspazių kaskada ir ląstelių apoptozė (Hetz, 2012). Toks audinio atsakas į išeminių sąlygų sukeltas pažaidas yra bimodalinis – aktyvuojantis apsaugos mechanizmus arba ląstelių žūtį.

Atkūrus kraujagyslių veiklą, išeminis audinys pradeda gauti deguonies, tačiau tai sukelia reaktyvių deguonies formų (angl. *reactive oxygen species*, ROS) kaupimąsi ir tolesnes audinio pažaidas. ROS yra signalinės molekulės, kurios dalyvauja GL veikloje ir kiaušialąsčių brendimo procese. GL, dėka superoksido dismutazės (SOD) ir katalazės, gali aktyviai palaikyti ROS koncentraciją žemiau jų antioksidacinio potencialo, nedarydamos žalos folikulų vystymuisi (Akino *et al.*, 2018). Šie fermentai paprastai nėra aptinkami užuomazginiuose ar pirminiuose folikuluose, tačiau aptinkami antriniuose ir Grafo folikuluose. Įrodyta, jog ksenotransplantuotame žmogaus KA, ROS kiekis lėtai didėja ir pasiekia aukščiausią vertę 10-ą potransplantacinę dieną, kuris atitinka revaskuliarizacijos periodą (Cacciottola *et al.*, 2018). Antrasis ROS kiekio išaugimas stebimas 18-tą potransplantacinę dieną, kuris parodo pilną kraujotakos ir aerobinio metabolizmo atkūrimą.

Matome, po KA transplantacijos, audinys patiria daugybę stresinių sąlygų, tačiau visu potransplantaciniu periodu yra prarandama net iki 80 % ramybės būsenoje esančių folikulų (Gavish *et al.*, 2018). Tiek ROS, tiek audinio fragmentacija prieš užšaldymą ar retransplantaciją, daro tam didžiulę įtaką, aktyvuodami efektorines molekules, tokias kaip FoxO (*forkhead* dėžutės baltymas O, angl. *forkhead box O*) (Grosbois ir Demeestere, 2018) ar jungiamojo audinio augimo veiksnį (angl. *connective tissue growth factor*, CTGF) (de Roo *et al.*, 2020), kurios sukelia folikulų augimą ir GL proliferaciją (Masciangelo *et al.*, 2020). Neseniai išspausdinta sisteminė apžvalga atskleidė, jog ne viena tyrėjų grupių yra bandžiusios sumažinti folikulų aktyvacijos ir žūties mastą bei pagerinti jų išgyvenamumą skatinant kraujotakos atkūrimą, taip sumažinant hipoksijos ir oksidacinio streso poveikį kuo ankstyvesniame potransplantaciniame periode su įvairiais augimo veiksniais (baziniu fibroblastų augimo veiksmiu (angl. *basic fibroblast growth factor*, bFbF), kraujagyslių endotelio augimo veiksmiu (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), angiopoetinu, granulocitų kolonijas stimuliuojančiu veiksmiu (angl. *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF)), hormonais (AMH, folikulus stimuliuojančiu hormonu (angl. *follicle stimulating hormone*, FSH), žmogaus menopauziniu gonadotropinu (angl. *human menopausal gonadotropin*, HMG)), antioksidantais (eritropoetinu, vitaminu E, melatoninu, N-acetilcisteinu (NAC)) ar ląstelėmis

(mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis, iš riebalinio audinio išskirtomis kamieninėmis ląstelėmis) (Cacciottola *et al.*, 2021). Šie veiksniai gali būti pridedami įvairiais būdais – inkapsuliuojant į hidrogelių karkasą kartu su KA prieš transplantaciją, inkubuojant KA *in vitro* kultūroje prieš transplantaciją, atliekant šeiminkui injekcijas prieš ar po transplantacijos.

Apibendrinant, KA retransplantacijos metu patiria hipoksiją, oksidacinį stresą, folikulų žūtį, todėl efektyvus kraujotakos atkūrimas yra kritiškai svarbus. Nors tyrimai atskleidė įvairių priedų įtraukimo potencialiai teigiamą įtaką mažinant audinio pažeidimą ir išsaugant folikulus, iki šiol nėra išskirtos vienos technologijos, kuri būtų ženkliai pranašesnė už kitas.

1.3.3. Kiaušialąsčių brandinimas *in vitro*

Šioje dalyje bus aptartos trys *in vitro* brandinimo (IVM) strategijos – nesubrendusių kiaušialąsčių brandinimas jas surenkant po minimalios kiaušidžių stimuliacijos arba be jos, nesubrendusių kiaušialąsčių išskyrimas *ex vivo* prieš užšaldant KA bei dirbtinės kiaušidės konstravimas (1.7 pav.). Nors šios technologijos yra dar tik tyrimų stadijoje, jos galėtų būti taikomos visoms pacientėms, nepaisant jų lytinės brandos (Mahajan, 2015; Fisch ir Abir, 2018; *The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation et al.*, 2020).

Kaip jau minėta anksčiau, kiaušidžių stimuliacija hormonais gali būti kontraindikacija tam tikrais vėžio atvejais, todėl nesubrendusių kiaušialąsčių iš mažų Grafo folikulų surinkimas yra viena iš vaisingumo išsaugojimo strategijų tokioms pacientėms. Nesubrendusios kiaušialąstės gali būti surenkamos transvaginaliniu būdu arba *ex vivo* iš KA, kuris užšaldomas taip pat vaisingumo atkūrimo tikslais. Tačiau šioms strategijoms vis dar trūksta techninių, efektyvumo ir saugumo įrodymų.

Vienas pirmųjų preliminarinių tyrimų, kurių metu nesubrendusios kiaušialąstės buvo surenkamos iš KA fragmentų *ex vivo*, skirtų užšaldymui vaisingumo išsaugojimo tikslais, išspausdintas dar 2008 metais (Huang *et al.*, 2008). Vėliau, šią strategiją taikant vis daugiau vaisingumo centrų, buvo pademonstruota, kad net lengvos hormonų stimuliacijos metu, iš vėžiu sergančių pacienčių surinktų nesubrendusių kiaušialąsčių subbrandinimo rodiklis siekė daugiau nei 50 % (Hourvitz *et al.*, 2015). Šios *in vitro* subbrandintos kiaušialąstės buvo vitrifikuotos ir užšaldytos lygiagrečiai su KA. Neseniai vienos vaisingumo klinikos Prancūzijoje atlikto tyrimo metu buvo atskleista, jog ir be hormoninės stimuliacijos iš KA galima surinkti nemažą nesubrendusių kiaušialąsčių skaičių brandinimui *in vitro* (Nogueira *et al.*, 2023). Taip pat, buvo parodyta, jog po IVM, daugiausiai subrendusių ir

užšaldytų kiaušialąsčių buvo gauta būtent *ex vivo* iš nestimuliuotų KA grupės nei pacientėms gaunant vieną GnRH antagonisto dozę ar po hormoninės kiaušidžių stimuliacijos ($7,6 \pm 5,7$ vs $4,6 \pm 4,9$ vs $6,8 \pm 4,6$, atitinkamai, $p < 0,01$).

Tokia vaisingumo išsaugojimo strategija galėtų būti taikoma jaunoms merginoms ir lytinės brandos nesulaukusioms mergaitėms, kurioms nustatyta didelė metastazių išplitimo į kiaušides rizika (1.1 lentelė). Tyrimai rodo, kad iš lytinės brandos nesulaukusių pacienčių, jaunų merginų ir moterų nesubrendusių kiaušialąsčių IVM išeigos yra skirtingos (Abir *et al.*, 2016; Fasano *et al.*, 2017; Ito *et al.*, 2023). Nors iš lytinės brandos nesulaukusių pacienčių *ex vivo* iš KA buvo galima išskirti reikšmingai daugiau nesubrendusių kiaušialąsčių nei iš moterų ($11,5 \pm 8,0$ vs $3,8 \pm 4,2$, atitinkamai, $p < 0,001$), didesnis jų skaičius buvo atretiški ($35,5$ % vs $17,1$ %, atitinkamai, $p < 0,001$) ir mažesnis skaičius kiaušialąsčių buvo subrandintas *in vitro* ($10,3$ % vs $28,1$ %, atitinkamai, $p = 0,002$) (Fasano *et al.*, 2017). To paties tyrimo metu patvirtinta, jog iš jaunesnių nei 5 metai pacienčių išskirtos kiaušialąstės nėra kokybiškos, todėl tokio amžiaus mergaitėms IVM neturėtų būti taikomas kartu su KA užšaldymu. Vieno naujausių tyrimo metu buvo atskleista, kad iš lytinės brandos sulaukusių pacienčių *ex vivo* iš KA buvo išskirtas reikšmingai didesnis skaičius nesubrendusių kiaušialąsčių ($7,32 \pm 7,24$ vs $2,78 \pm 5,24$, atitinkamai, $p < 0,05$) bei šios kiaušialąstės pasižymėjo aukštesniu subrandinimo *in vitro* dažniu ($15,0$ % $\pm$ $18,4$ % vs $5,40$ % $\pm$ $15,5$ %, atitinkamai, $p = 0,03$) lyginant su lytinės brandos nesulaukusiomis pacientėmis (Ito *et al.*, 2023).

Pasaulyje yra aprašyti gimusių vaikų atvejai moterims, kurių kiaušialąstės buvo apvaisintos po IVM procedūros (Segers *et al.*, 2020; Nogueira *et al.*, 2023), tačiau dar nėra publikuotų duomenų apie sėkmingus nėštumus, kai kiaušialąstės buvo išskirtos ir subrandintos *in vitro* iš mergaičių. Nors matome, kad jauname amžiuje, ypač iki lytinės brandos, *ex vivo* surenkamų kiaušialąsčių skaičius ir gyvybingumas skiriasi tarp skirtingų mokslinių grupių publikuojamų rezultatų, tačiau vis dar nėra žinoma apie jų panaudojimą pagalbiniam apvaisinimui. Tolesni tyrimai turėtų būti vykdomi kiaušialąsčių brandinimo *in vivo* aktyvacijos, svarbiausių šio proceso reguliatorių atradimo ir IVM efektyvumo gerinimo kryptimis.

Tačiau yra mokslininkų, kurie bando subrandinti kiaušialąstes *in vitro* iš užuomazginių folikulų (Telfer *et al.*, 2008; McLaughlin *et al.*, 2018). Telfer su kolegomis (2008) taikė dviejų etapų sistemą, kurios metu užuomazginiai folikulai yra aktyvuojami KA fragmentuose *in vitro* ir auginami iki antrinio / ankstyvojo Grafo folikulo stadijos, tuomet yra išskiriami iš audinio ir brandinami *in vitro* pavieniui, papildžius terpę aktyvinu A.



1.7 pav. Vaisingumo išsaugojimo strategijos taikant *in vitro* brandinimą. Iš kiaušidės audinio išskiriami užuomazginiai folikulai, kurie gali būti subrandinami *in vitro*, apvaisinami *in vitro* ir perkelti į gimdą įsitvirtinimui arba gali būti inkapsuliuojami į biopolimerinį karkasą ir retransplantuojami atgal į kiaušidę ar pilvaplėvę. Adaptuota pagal Dolmans *et al.*, 2021. Licencijos nr. 6027561277084.

Tačiau pirmasis sėkmingas bandymas subrandinti iš užuomazginių folikulų II metafazės kiaušialąstės įvyko tik po dešimtmečio, sukūrus daugiaetapę sistemą (McLaughlin *et al.*, 2018). Šios sistemos pirmieji du žingsniai nesiskiria nuo publikuotų Telfer *et al.* Trečiasis etapas – išskiriamos nesubrendusios kiaušialąstės, su aplinkinėmis ląstelėmis, iš ankstyvųjų Grafo folikulų ir auginama iki kol kiaušialąstės pasiekia $> 100 \mu\text{m}$ diametro dydį. Paskutiniame etape yra atliekama šios kiaušialąstės IVM. Tačiau tokių II metafazės kiaušialąsčių išeiga tik $\sim 10 \%$, jos pasižymėjo nenormaliai dideliais poliniais kūnais ir mažesniu kumuluso ląstelių augimu palyginus su *in vivo* subrendusiomis kiaušialąstėmis. Taip pat, nėra žinomas tokių kiaušialąsčių tolesnio vystymosi potencialas (McLaughlin *et al.*, 2018).

Paskutinė aptariama brandinimo *in vitro* strategija – audinių inžinerija. Svarbiausi žingsniai šiai technologijai sėkmingai sukurti yra folikulų išskyrimas iš KA, navikinių ląstelių eliminavimo užtikrinimas ir folikulų inkapsuliacija į 3-dimensijų (3D) kultūrą (1.7 pav.) (Dolmans *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022). 3D folikulų kultūra – tai iš biopolimerų sukurtas karkasas, kurio pagrindinis tikslas palaikyti folikulų sferinę struktūrą. Idealiu atveju, tokia 3D kultūra, kitaip vadinama dirbtine kiaušide, turėtų turėti KA ląstelių

arba užląstelinio matrikso, kurie galėtų užtikrinti tarpusavio sąveikas su folikulais.

Nepažeistų ir gyvybingų folikulų išskyrimas nuo KA stromos ląstelių nėra paprasta procedūra. Žmogaus kiaušidės žievinis audinys, kuriame yra užuomazginiai bei pirminiai folikulai, yra pluoštinis, todėl reikėjo atrasti metodiką, kuri leistų juos išskirti nepažeistus. Mechaninio ir fermentinio išskyrimo metodų taikymas kartu pademonstravo didžiausią efektyvumą išgaunant didelį skaičių bei aukštos kokybės folikulų tiek iš suaugusių, tiek iš lytinės brandos nesulaukusių pacienčių KA (Chiti *et al.*, 2017; Mouloungui *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022). Tačiau, norint sumažinti tikimybę dirbtinę kiaušidę užkrėsti navikinėmis ląstelėmis, mokslininkai sukūrė unikalią techniką: 3 kartų folikulų suspensijos praplovimą nuo stromos ląstelių ar dirbtinai piktybinėmis ląstelėmis užkrėstų suspensijų (Soares *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2017; Mouloungui *et al.*, 2018). Visų šių tyrimų metu buvo praplauta daugiau nei 4140 folikulų ir tik vienoje folikulų suspensijoje buvo aptikta > 20 leukemijos ląstelių (ląstelių skaičius, potencialiai galintis sukelti ligos atsinaujinimą (Campana *et al.*, 1999), o tai ypač suteikia vilties pacienčių, sergančių leukemija, vaisingumo atkūrimui.

Kadangi funkcionali dirbtinė kiaušidė turėtų atkurti tiek vaisingumą, tiek endokrininės sistemos veiklą, buvo sukurtas ne vienas prototipas, galintis palaikyti folikulų ir embrionų vystymąsi, hormonų gamybą bei palikuonių atsivedimą modeliuose su pelėmis (Kniazeva *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016b; Rios *et al.*, 2018). Būtų galima manyti, kad šiuos prototipus galima pritaikyti žmonių folikulų inkapsuliacijai, tačiau reikia nepamiršti, kad pelių ir žmonių kiaušidžių mikroarchitektūra, struktūra ir folikulų dydžiai labai skiriasi. Pavyzdžiui, pelės folikulo tūrio pokytis brendimo metu nuo antrinio folikulo stadijos (120 μm) iki priešovuliacinio Grafo folikulo (400 μm) yra 37 kartai, tačiau žmogaus folikulo pokyčiai yra drastiškesni – padidėja bent 4,7 milijonus kartų vystantis nuo antrinio folikulo stadijos (120 μm) iki priešovuliacinio folikulo (20 mm) (Smith *et al.*, 2010). Tai reiškia, kad gali skirtis ir keliama reikalavimai karkasui, reikalingam žmogaus dirbtinei kiaušidei sukonstruoti.

Toks folikulo vystymasis stipriai priklauso ir nuo aplinkos. Folikulogenezės metu somatinės KA ląstelės sąveikauja su kiaušialąstėmis (Simon *et al.*, 2020). Tam, kad įvyktų užuomazginio folikulo aktyvacija, grūdėtosios ląstelės aplink kiaušialąstę turi pradėti dalintis, o šalia esančios somatinės audinio stromos ląstelės turi diferencijuoti į teka ląsteles, kurios būtinos tiek estrogeno sintezei, tiek struktūros palaikymui (Dolmans ir Amorim, 2019; Simon *et al.*, 2020; Vlieghe *et al.*, 2023). Be šių ląstelių, kiaušidės žievinį audinį sudaro įvairių ląstelių populiacijos, tokios kaip

stromos, imuninės sistemos, perivaskuliarinės bei endotelio ląstelės (Wagner *et al.*, 2020). Tyrimų su pelės žemesnės nei antrinės stadijos folikulais metu buvo įrodyta reikšminga *in vitro* kultūros praturtinimo tekos ląstelėmis bei makrofagais (Tingen *et al.*, 2011), pelės embriono fibroblastais (Tagler *et al.*, 2012), pelės riebalinio audinio kamieninėmis ląstelėmis (Green *et al.*, 2019) ar žmogaus dermos fibroblastais (Wu *et al.*, 2021) įtaka folikulų išgyvenamumui bei augimui. Taip pat, *in vitro* kultūros papildymas pilvaplevės mezotelio kamieninėmis ląstelėmis pademonstravo teigiamą poveikį pelės folikulų augimui, estradiolio gamybai bei gyvybingumui trumpalaikės *in vitro* kultūros metu (Sarabadani *et al.*, 2021). Tokie rezultatai suteikia pagrindą vystyti tolesniems tyrimams su žmogaus pradinių vystymosi stadijų folikulais.

Dirbtinei kiaušidei konstruoti naudojamas karkasas turėtų būti biosuderinamas, minimaliai sukeliantis arba visai nesukeliantis uždegiminio atsako, leidžiantis vykti neoangiogenezei ir suyrantis po transplantacijos, kad nesutrikdytų tolesnio folikulų augimo bei jų migracijos (Dadashzadeh *et al.*, 2021). Nors yra platus biopolimerų pasirinkimo spektras, išsirinkti tinkamiausią nėra paprasta. Tyrimai su gyvūnais parodė daug žadančių rezultatų tiriant tiek natūralius, tiek sintetinius biopolimerus. Natūralūs naudojami biopolimerai: kolagenas, fibrinas, plazmos krešuliai, alginatas ar nuląstelintas kiaušidės užląstelinis matiksas yra geresni dėl juose natūraliai esančių ląstelių adhezijos molekulių, lengvesnės migracijos ir komunikacijos. Didžioji dalis tyrimų yra vykdomi su aukštesnės vystymosi stadijos folikulais. Pavyzdžiui, alginato hidrogeliuose buvo sėkmingai subrandinti pelių, primatų ir žmogaus antriniai folikulai iki antralinių (Tagler *et al.*, 2011). Tačiau buvo gautų ir kontraversiškų žmogaus užuomazginių bei pirminių folikulų brandinimo biopolimeriniuose karkasuose rezultatai, nes folikulai neauga pavieniui *in vitro* kultūroje. Jeigu 1999 metais buvo pademonstruota, jog šių folikulų 24 val. *in vitro* kultūra kolageno, užląstelinio matrikso ar poli-L-lizino karkasuose sukėlė folikulų atreziją (Abir *et al.*, 1999), tai tik po 15-ios metų pavyko parodyti, kad folikulai geba augti ir išgyventi *in vitro* kultūroje po inkapsuliacijos alginato hidrogeliuose (Camboni *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). Nors atliekant kitus tyrimus su žmogaus užuomazginiais folikulais bei alginatu buvo gauti priešingi rezultatai – arba nebuvo parodytas teigiamas poveikis folikulų vystymuisi (Hornick *et al.*, 2012), arba folikulai neišgyveno net trijų dienų tokioje *in vitro* kultūroje (Laronda *et al.*, 2014). Sintetiniai biopolimerai – polietileno glikolis ir jo dariniai, polikaprolaktonas – pasižymi geresnėmis mechaninėmis savybėmis, lengvesniu paruošimu ir geresnėmis modifikavimo galimybėmis (Amorim ir Shikanov, 2016; Dadashzadeh *et al.*, 2021). Būtina paminėti ir naujausių technologijų, konstruojant dirbtines

kiaušides, tokių kaip 3D spausdinimas, mikroskysčių technologijos ar organų auginimas ant mikrolustų, tačiau jos yra tik pradėtos tyrinėti (Dadashzadeh *et al.*, 2021).

Taigi, audinių inžinerijos ir *in vitro* brandinimo tyrimų pažanga atvėrė dar vieną vaisingumo išsaugojimo strategiją visoms pacientėms. Norint šią technologiją taikyti moterims, reikalinga optimizuoti ir standartizuoti protokolus, gerinti vaskuliarizacijos atkūrimo, folikulų išskyrimo iš audinio metodikas bei toliau gilinti supratimą (žinias) apie folikulogenezę ir metabolinius kiaušidės procesus.

1.4. Kiaušidės audinio užšaldymo, vaisingumo išsaugojimo tikslais, tyrimų situacija Lietuvoje

Lietuvoje 2014 metais Nacionaliniame vėžio institute (NVI) pradėtas biomedicininis tyrimas „Onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimo programa” (leidimo nr. 158200-14-743-260), kurio tikslas – plėtoti reprodukcinių audinių užšaldymo, atšildymo bei retransplantacijos technologijas. Šio tyrimo metu iš 50 reprodukcinio amžiaus onkologinių pacientų – vyrų ar moterų, kurie sutiko dalyvauti biomedicininame tyrime ir pasirašė Asmens informavimo ir Informuoto asmens sutikimo formas – buvo paimti ir užšaldyti reprodukciniai audiniai tolesniems moksliniams tyrimams atlikti (Gudlevičienė *et al.*, 2014).

Priėmus Pagalbinio apvaisinimo įstatymą, 2017 metais Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VULSK) Santaros vaisingumo centras tapo pirmąja gydymo įstaiga, pradėjusi veiklą pagal naują pagalbinio apvaisinimo ir lytinių ląstelių banko licenciją. Šiame centre onkologiniams pacientams galima saugoti sukurtus embrionus, lytines ląsteles ar reprodukcinius audinius, taip pat pritaikyti įvairias vaisingumą saugančias strategijas (Žilinskas *et al.*, 2016; <https://www.hotc.lt/>). Šis doktorantūros darbas yra dalis NVI vykdomos vaisingumo išsaugojimo programos ir VULSK vykdyto Horizonte 2020/EU4Health programos mokslinių tyrimų ir švietimo bendradarbiavimo projekto (TREL, projekto nr. 952438), skirto pagerinti vaikų, sergančių piktybiniais navikais, išgyvenamumą Lietuvoje, dalis.

Lietuvoje 2019 metais buvo atliktas pirmasis lėtai užšaldytų / greitai atšildytų KA ir ksenotransplantavimo į imunodeficitines peles eksperimentas (Gudlevičienė *et al.*, 2020). Gauti rezultatai parodė, kad tiek atšildytas audinys, tiek audinys po ksenotransplantacijos (35 d. *in vivo* tyrimas) nepasižymėjo struktūriniais pokyčiais, audinio degradavimo elementais ar piktybinių ląstelių proliferacija (Ki-67 žymens ekspresija < 5 %). Dėka

įrodyto audinių prigijimo po ksenotransplantacijos ir gyvybingumo išsaugojimo po lėto užšaldymo, 2022 metais VULSK Vaikų onkohematologijos centras su disertacijos autore TREL projekto metu inicijavo Pagalbinio apvaisinimo įstatymo pataisą, kurioje pašalintas amžiaus limitas reprodukcinį audinių užšaldymui vaisingumo išsaugojimo tikslais jaunesniems nei 14 metų asmenims.

Naujausi eksperimentiniai tyrimai su KA, susiję su vaisingumo išsaugojimu onkologiniams pacientams Lietuvoje, yra šio doktorantūros darbo rezultatai (Gudlevičienė *et al.*, 2020; Grubliauskaitė *et al.*, 2023b), o naujausios apklausos apie vaisingumo išsaugojimą, taikomas gaires ir reprodukcinę sveikatą atliktos tiek šio doktorantūros darbo metu bendradarbiaujant su Šiaurės šalių pediatriinės hematologijos ir onkologijos draugija (angl. *Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology*, NOPHO) (Grubliauskaite *et al.*, 2025), tiek TREL projekto kolegų (Stukaite-Ruibiene *et al.*, 2021; Stukaite-Ruibiene *et al.*, 2023).

Nors Lietuva nėra lyderė diegiant naujausias technologijas ir taikant jas klinikinėje praktikoje, tačiau pastaraisiais metais stebimas didžiulis progresas stengiantis lygiuotis su didžiausiais Europos ir pasaulio reprodukcijos centrais.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Reagentai, priemonės, aparatūra ir programinė įranga

Naudoti kiaušidės audinio užšaldymui ir atšildymui: M199 *Earl* terpė (*Biochrom*, Vokietija), žmogaus serumo albuminas (ŽSA) (*OctaPharma*, Jungtinė Karalystė), DMSO, *Leibovitz's* terpė (*Thermo Fisher Scientific*, JAV), penicilino/streptomicino/amfotericino B tirpalas (*Lonza*, JAV), vienakartiniai skalpeliai (*Swann-Morton*, Jungtinė Karalystė), kriomėgintuvėliai (*CryoKING*, Vokietija), kontroliuojamo greičio šaldymo dėžutė *CoolCell* (*Corning*, JAV), cukrozė (*Sigma-Aldrich*, JAV); -80 °C temperatūros šaldiklis (*Arctiko*, Danijos Karalystė), -150 °C temperatūros šaldiklis (*PHCbi*, Nyderlandų Karalystė).

Naudoti kiaušidės audinio aktyvacijai *in vitro*: *McCoy's* terpė, VEGF-A 165 (*Thermo Fisher Scientific*, JAV), glutaminas, selenas, askorbo rūgštis, penicilinas G, streptomicinas (*Sigma-Aldrich*, JAV), transferinas (*Roche Diagnostics*, Airija), žmogaus insulinas (*Santa Cruz*, JAV), rutinas (*PhytoLab*, Vokietija), žmogaus folikulus stimuliuojantis hormonas (FSH) (*Merck*, JAV); šildoma vandens vonelė (*Lauda*, Danijos Karalystė), CO₂ inkubatorius (*Nuaire*, Didžioji Britanija).

Naudoti ksenotransplantacijos tyrimams: sterilus graužikų maistas *Teklad Global 19 % Protein Extruded Rodent Diet* (*Envigo*, Jungtinė Karalystė), sterilus kraikas (*Tapvei Estonia OÜ*, Estija), izoflurano dujos, sedatyvi medžiaga *Sedin* (*Vetpharma Animal*, Ispanija), *Oftagel* gelis (*Santen OY*, Japonija), skysti medicininiai klijai *LiquiBand* (*Advanced Medical Solutions*, Jungtinė Karalystė), krūties vėžio ląstelių linija (MCF 7, angl. *Michigan Cancer Foundation* 7) gauta bendradarbiaujant su Biologinių modelių skyriumi (VU GMC); *EZ-SA800* anestezijos sistema (*EZ-Systems*, JAV); imunodeficitinės NMRI-Foxn1^{mut} (angl. *Naval Medical Research Institute*) ir NOD.SCID (angl. *Non-Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficiency*) linijų pelės (*Envigo*, Jungtinė Karalystė).

Naudoti histologiniams ir imunohistocheminiams dažymams: Triton X-100, TRIS druskos buferis (TBS) (*Sigma-Aldrich*, JAV), pirminiai antikūnai prieš Ki-67 (sc-101861) (*Santa Cruz*, JAV), antriniai antikūnai konjuguoti su krienų peroksidaze *EnVision FLEX System HPR*, DAB chromogenas, pirminiai antikūnai prieš Ki-67 (M3064), pirminiai antikūnai prieš α-SMA (klonas 1A4) (*Dako*, JAV), Meyer hematoksilino dažas, eozino Y tirpalas (*Merck*, JAV), *Masson trichromo*, *Fast green* rinkinys (9180A) (*Newcomer Supply*, JAV); mikroskopinis skeneris *Pannoramic P250 Flash III Oyster* su programine įranga *CaseViewer v2.4* (*3DHISTECH Ltd.*, Vengrija),

automatizuota sistema *Roche Ventana Bechmark GX system* (Ventana, JAV), *Olympus BX51* mikroskopas (*Olympus*, Japonija), automatinė sistema *PT Link* (*Agilent Technologies*, JAV), vizualizavimo sistema *Dako Autostainer 48+* (*Dako*, JAV), statistinė programinė įranga *GraphPad Prism v9.1.2* (*GraphPad Software Inc.*, JAV).

Naudoti visuminės RNR išskyrimui ir kokybės patikrinimui: *QIAzol* tirpalas, visuminei RNR išskyrimui ir išgryninimui naudotas komercinis rinkinys *miRNeasy Mini Kit* su *RNase-free DNase Set* (*Qiagen*, Vokietija), komercinis *RNA 6000 Nano LabChip* rinkinys (*Agilent Technologies*, JAV); bioanalizatorius *Agilent 2100* su programine įranga *Agilent Security Pack* (*Agilent Technologies*, JAV), spektrofotometras *NanoDrop One* (*Thermo Fisher Scientific*, JAV).

Naudoti kopijinės DNR sintezės ir tikro laiko PGR (TL-PGR): komerciniai rinkiniai *miScript II RT Kit*, *miScript HiSpec Buffer* ir *miScript SYBR Green PCR Kit*, *Human Breast Cancer miScript miRNA* PGR gardelės (MIHS-109ZA) (*Qiagen*, Vokietija), komercinis rinkinys *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix*, *MicroAmp 96-šulinėlių plokštelė*, *TaqMan™* pradmenys genams *Cd31* (Mm01242576_m1), *Gapdh* / *GAPDH* (Mm99999915_g1 / Hs02786624_g1), *FOXL2* (Hs00846401_s1), *YBX2* (Hs00560265_g1) *CYP19A1* (Hs00903411_m1), *CTGF* (Hs00170014_m1), *LOX* (Hs00942480_m1), *PRDX1* (Hs00602020_mH), *ANGPT2* (Hs00169867_m1), *SOD1* (Hs00533490_m1), *COL6A1* (Hs01095585_m1), *COL18A1* (Hs00181017_m1), *FNI* (Hs01549976_m1), *CASP3* (Hs00234387_m1) (*Thermo Fisher Scientific*, JAV); termocikleris *QuantStudio™ 5* su programine įranga *QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.1* (*Thermo Fisher Scientific*, JAV), *Labcycler* PGR termocikleris (*SensoQuest GmbH*, Vokietija), termocikleris *Rotor-Gene® Q* su programine įranga *miScript miRNA PCR Array Data Analysis* (*Qiagen*, Vokietija), statistinės programinės įrangos *Python v3.12* ir *GraphPad Prism v9.1.2*.

Naudoti dirbtinės kiaušidės konstravimui įvertinti: *Dulbecco* buferinis druskų tirpalas (DPBS, angl. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*), fetalinis veršelio serumas (FBS, angl. *fetal bovine serum*), antibiotikų-antimikotikų mišinys, insulino, transferino ir seleno tirpilas (ITS), kalceino AM ir etidžio homodimero-I *LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit* rinkinys, *DMEM/F12* terpė, piruvo rūgštis (*Thermo Fisher Scientific*, JAV), tripano mėlis, 3-(N-morfolino) propanosulfoninė rūgštis (MOPS), augimo veiksnys GDF-9 (*Sigma-Aldrich*, JAV), augimo veiksniai bFGF, IGF1, EGF, SCF (*PeptoTech EC*, Jungtinė Karalystė), liberazė DH, DNazė (*Roche Diagnostics*, Airija), 70 µm filtras (*PluriSelect Life Science*, Vokietija), 130 µm mikropipetė (*Cook*,

Airija), SLM alginatas (*NovaMatrix*, Norvegija), *Menopur* hormoninis tirpalas (*Ferring*, Švedija); *Bürker* ląstelių skaičiavimo kamera (*VWR*, Belgijos Karalystė), CO₂ inkubatorius (*Nuaire*, Didžioji Britanija), audinių smulkinimo aparatas (*McIlwain Tissue Choper*, Jungtinė Karalystė), stereomikroskopas (*Leica*, Belgijos Karalystė), *LSM 510* konfokalinis mikroskopas (*Zeiss*, Vokietija), šildoma vandens vonelė (*Lauda*, Danijos Karalystė), statistinė programinė įranga *GraphPad Prism v9.1.2*.

Naudoti gyvybingumui ir hormonų sekrecijos įvertinimui: estradiolio kiekio nustatymo rinkinys (ELK1208) (*ELK-Biotechnology*, Kinija), progesterono kiekio nustatymo rinkinys (abx257456) (*Abbexa*, Jungtinė Karalystė), CyQUANT LDH kiekio nustatymo rinkinys (C203000), plokštelių skaitytuvas *Varioskan* su programine įranga *ScanIt Software* (*Thermo Fisher Scientific*, JAV), statistinė programinė įranga *GraphPad Prism v9.1.2*.

2.2. Biomedicininį tyrimų etikos komiteto ir Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimai

Nacionaliniame vėžio institute (NVI) vykdytam biomedicininiam tyrimui „Onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimo programa“ atlikti buvo gautas Vilniaus regioninio biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimas (2014-07-08, Nr. 158200-14-743-260) (P1 pav.). Leidimas rinkti pacienčių biologinę medžiagą ir atlikti tyrimus galiojo iki 2019-12-31. Per šį laikotarpį pacientės buvo kviečiamos dalyvauti tyrime, kurio metu buvo šaldomi onkologinėmis ligomis sergančių moterų kiaušidės audiniai (KA) ir atlikti pirminiai (histologiniai ir imunohistocheminiai) tyrimai. Visos moterys pasirašė Asmens informavimo ir Informuoto asmens sutikimo formas. Vėliau buvo gautas leidimas pratęsti tyrimą iki 2023-12-31 (Papildymas Nr.1, Nr. 2019-LP-53) (P2 pav.) ir per pratęsimo laikotarpį buvo atlikti molekuliniai, modelių su gyvūnais bei kiti *in vitro* tyrimai.

Eksperimentiniams tyrimams su laboratoriniais gyvūnais atlikti projekto partnerio Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro (VU GMC) laboratorijoje buvo gauti du Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimai. Pirmasis gautas 2019-04-23, Nr. G2-107 (P3 pav.) pirmajam ksenotransplantacijos tyrimui atlikti, atšildytų KA gyvybingumui patikrinti. Antrojo ksenotransplantacijos tyrimo metu (2022-06-10 leidimas Nr. G2-214) (P4 pav.) buvo atliktos papildomos manipuliacijos su atšildytais KA.

Kontroliniai krūties audiniai (sveikas bei navikinis) buvo gauti iš NVI Biobanko, pacientėms užpildžius standartizuotą sutikimo Biobankui formą. Sutikimo Biobankui forma patvirtinta Lietuvos bioetikos komiteto,

Valstybinės akreditavimo sveikatos priežiūros veiklai tarnybos ir NVI direktoriaus.

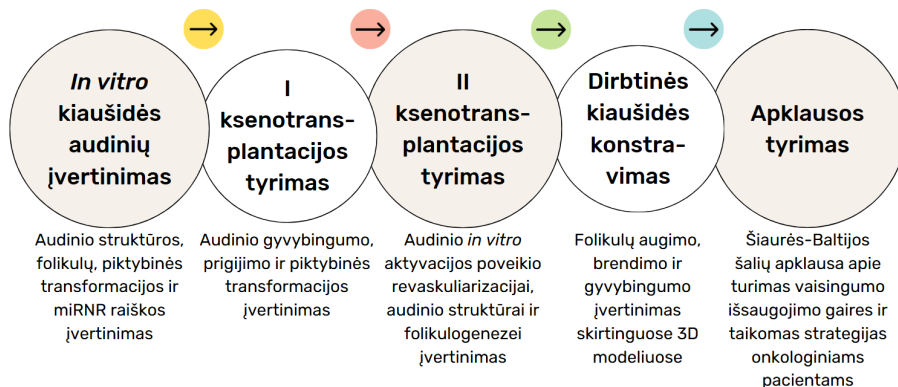
Taip pat darbe buvo panaudoti donoriniai menopauzės sulaukusių moterų KA. Audinių panaudojimui buvo remtasi Liuvono Katalikiškojo universiteto (KLU) tyrimų komiteto (*The Review Board of the Université Catholique de Louvain*) (Belgijos Karalystė) leidimu 2012/23MAR/125.

2.3. Tiriamoji medžiaga

Biomedicininiam tyrimui „Onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimo programa“ iki 2022 metų buvo įtrauktos 36-ios moterys, sergančios onkologine liga. Vidutinis pacienčių amžius buvo 31 ± 5 metai (jauniausia įtraukta pacientė buvo 21-į, vyriausia – 40-iesiems metų). Vėžio lokalizacijos – krūties (22/36), kiaušidžių (6/36), gimdos kaklelio (6/36), tiesiosios žarnos (1/36) ir vulvos (1/36). Buvo įtrauktos 3 pacientės su ribiniais navikais (angl. *bordeline tumors*), o likusios su I-III stadijos bei skirtingo ląstelių diferenciacijos laipsnio (G1 – geros, G2 – vidutinės, G3 – žemos) navikais. Nei vienai įtrauktai pacientei nebuvo nustatytų metastazių į kitus organus. Dešimt jų jau yra mirusių (duomenys patikslinti NVI Vėžio registro duomenų bazėje).

2.4. Tyrimo dizainas

Šis disertacijos darbas gali būti suskirstytas į penkias dalis (2.1 pav.).



2.1 pav. Tyrimo dizainas.

Pirmiausia buvo atlikti eksperimentiniai darbai su biomedicininio tyrimo metu surinktais onkologinių pacienčių KA. Šie tyrimai apėmė lėtai užšaldytų ir greitai atšildytų KA *in vitro* įvertinimą, jų gebėjimą transplantuotis bei juose esančių folikulų panaudojimą dirbtinės kiaušidės konstravimui. Papildomai

buvo atlikta Šiaurės ir Baltijos šalių onkologinių centrų apklausa apie patvirtintas vaisingumo išsaugojimo gaires ir taikomas vaisingumo išsaugojimo strategijas šiose šalyse.

Visi tyrimai buvo atlikti disertacijos autorės, nebent nurodyta kitaip (2.5.3.). Taip pat, antrojo ksenotransplantacijos tyrimo *in vitro* eksperimentai yra V. Prokofjevės magistro baigiamojo darbo dalis.

2.5. Metodai

2.5.1. Kiaušidės audinių užšaldymas lėto šaldymo metodu

Operacijos dieną, buvo paruošti tirpalai lėto šaldymo procedūrai (2.1. lentelė).

2.1 lentelė. Kiaušidės audinio užšaldymui reikalingų tirpalų sudėtys

	Tirpalas 1	Tirpalas 2	Tirpalas 3
M199 <i>Earl</i> terpė	18,5 ml	16,8 ml	24,75 ml
Žmogaus serumo albuminas	1 ml	1 ml	1 ml
DSMO	-	2 ml	3,75 ml
1 % penicilino/ streptomicino/ amfotericino B tirpalas	0,2 ml	0,2 ml	0,3 ml

Minimaliai invazinės procedūros – laparoskopijos – metu paimtas KA buvo nedelsiant įdedamas į transportinį Tirpalą 1 ir ant ledo atnešamas į NVI Biobanko laboratoriją užšaldymo procedūrai. KA šerdinė dalis pašalinama, o žievinė dalis supjaustoma apytiksliai į 0,5 cm × 0,5 cm dydžio gabalėlius, kurie patalpinami į atskirus 2 ml kriomėgintuvėlius su 1 ml Tirpalo 1 ir 1 ml Tirpalo 2. Po 5 min. inkubacijos ant ledo, buvo pašalinama pusė terpių tūrio ir pridedamas toks pat kiekis Tirpalo 2. Po 15 min. inkubacijos ant ledo, pašalinama pusė terpės tūrio ir pridedamas toks pats kiekis Tirpalo 3. Po 15 min. inkubacijos ant ledo, visas terpės tūris pakeičiamas Tirpalu 3 ir kriomėgintuvėliai perkeliama į *CoolCell* šaldymo dėžutę, kurioje temperatūros kritimo greitis 1°C/min. Dėžutė perkeliama į -80 °C temperatūros šaldiklį, o po 24 val. perkeliama į -150 °C temperatūros šaldiklį NVI Biobanke ilgalaikiam saugojimui.

Nuo šiol, kai minima KA, tai yra tik žievinė KA dalis.

2.5.2. Kiaušidės audinių greitas atšildymas

Iki eksperimentų atlikimo, KA buvo saugomi šaldiklyje -150 °C temperatūroje ne trumpiau nei 1 metus. KA atšildymui buvo taikomas greito atšildymo metodas.

Kriomėgintuvėliai su KA gabalėliais buvo išimami iš šaldiklių, patalpinami į ledo vonelę ir nedelsiant atnešami į laboratoriją. Laboratorijoje kriomėgintuvėliai kelioms minutėms buvo panardinami į 37 °C temperatūros vandens vonelę, iki kol turinys atitirpo. Audiniai buvo palaipsniui inkubuojami ant ledo terpėje po 5 min., palaipsniui 3 kartus skiedžiant per pusę (santykiu 1:1) su Tirpalu 1, tokiu būdu laipsniškai mažinant krioprotektorių koncentraciją. Po trijų praskiedimų, KA perkeliama į naują terpę be krioprotektoriaus iki transplantacijos arba į *in vitro* kultūros terpę, aprašytą žemiau – 2.5.4.

2.5.3. Kiaušidės audinio paruošimas transplantacijai ir aktyvacija *in vitro*

Pirmasis ksenotransplantacijos tyrimas: pirmajam ksenotransplantacijos tyrimui naudoti ilgiau nei 5 metus saugoti KA (n = 5), kurie buvo atšildomi panaudojant greitą audinių atšildymo metodą, aprašytą aukščiau. Kontrolei buvo naudojami švieži, tą pačią dieną iš operacinės gauti pacientės 5 KA gabalėliai (n = 1) kurie taip pat supjaustyti į 0,5 cm × 0,5 cm dydžio gabalėlius. Dalis jų lėtai užšaldyti pacientėms vaisingumo išsaugojimo tikslui (2.5.2. poskyris), o neužšaldyti – ksenotransplantacijos tyrimo kontrolei. KA iš NVI Biobanko į eksperimento vietą VU GMC buvo skubiai transportuojami ant ledo terpėje be krioprotektorių.

Prieš antrąjį ksenotransplantacijos tyrimą buvo įvertinta *in vitro* KA gyvybingumas ir aktyvacija – užšaldymo, atšildymo ir *in vitro* kultūros citotoksiškumas (laktato dehidrogenazės (LDH) aktyvumas) audiniui bei steroidogenezės atnaujinimas (hormono progesterono sekrecija). KA (n = 16) buvo atšildyti panaudojus greitą audinių atšildymo metodą. Audiniai buvo padalinti per pusę į 0,25 cm × 0,5 cm dydžio gabalėlius, tokius kokius bus transplantuojami antrojo ksenotransplantacijos tyrimo metu ir padalinami į 4 grupes. KA buvo kultivuojami 72 val. kontrolinėje ir eksperimentinėse terpėse 37 °C temperatūroje, 5 % CO₂ inkubatoriuje. Kontrolinė terpė buvo sudaryta iš McCoy's terpės, papildytos 3 mM glutaminu, 0,1 % ŽSA, 2,5 µg/ml transferinu, 4 ng/ml seleno, 50 µg/ml askorbo rūgštimi, 30 µg/ml penicilino G, 50 µg/ml streptomycinu, 10 ng/ml žmogaus insulino bei 1 ng/ml FSH, eksperimentinės terpės buvo papildomai praturtintos: 50 ng/ml VEGF-A 165 (angl. *vascular endothelial growth factor A*, VEGF-A) arba 1 µg/ml rutino, arba 50 ng/ml VEGF-A ir 1 µg/ml rutino (V+R) kombinacija. Po 36 val. buvo surenkama pusė mitybinės terpės ir užšaldoma -80 °C temperatūros šaldiklyje. Po 72 val. buvo surenkama visa mitybinė terpė ir užšaldoma -80 °C temperatūros šaldiklyje NVI Biobanke.

Antrasis ksenotransplantacijos tyrimas: antrajam ksenotransplantacijos tyrimui buvo atšildyta 10 KA. Audiniai buvo padalinti per pusę į 0,25 cm × 0,5 cm dydžio gabalėlius. Atšildyti KA buvo aktyvuoti 36 val. kontrolinėje ir V+R terpėse 37 °C temperatūroje, 5 % CO₂ inkubatoriuje.

2.5.4. Steroidogenezės ir citotoksiškumo auginimo terpėse įvertinimas

Užšaldytos auginimo terpės *in vitro* kultivuotų KA po 36 val. ir 72 val. (kontrolinė terpė; kontrolinė terpė papildyta VEGF-A; kontrolinė terpė papildyta rutinu; kontrolinė terpė papildyta VEGF-A ir rutinu) buvo atšildomos. Darbai atlikti NVI Biobanke.

Progesterono kiekis buvo nustatomas panaudojant konkuruojantį imunofermentinį tyrimo metodą pagal gamintojo rekomendacijas. Paruošti standartai, eksperimentiniai, kontroliniai mėginiai ir su biotinu konjuguotas reagentas buvo supilstomi į 96-šulinėlių plokštelę, kuri padengta progesterono antigenais. Tuomet buvo pridedama krienų peroksidaze konjuguoto reagento ir inkubuojama 45 min. 37 °C temperatūroje. Praplaunama, įpilama substrato, fermentinės reakcijos įvertinimui, ir inkubuojama 30 min. 37 °C temperatūroje. Fermento-substrato reakcija pabaigiama pridedant rūgšties tirpalo. Sugertis matuojama spektrofotometru ties 450 nm ilgio banga. Nustatymo intervalas nuo 0,31 ng/ml iki 20 ng/ml.

Citotoksiškumui pamatuoti buvo naudojama kolorimetrinė LDH reakcija pagal gamintojo rekomendacijas. Eksperimentiniai, kontroliniai ir LDH max mėginiai buvo supilstomi į 96-šulinėlių plokštelę. Pridedamas reakcijos mišinys ir inkubuojama 30 min. kambario temperatūroje, tamsoje. Reakcija pabaigiama pridedant reakciją stabdančio tirpalo. Sugertis matuojama spektrofotometru ties 490 nm ir 680 nm ilgio bangomis. Citotoksiškumas procentais apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\left(\frac{\text{Eksperimentinis LDH aktyvumas} - \text{Spontaninis LDH aktyvumas}}{\text{LDH max aktyvumas} - \text{Spontaninis LDH aktyvumas}} \right) \times 100 \%$$

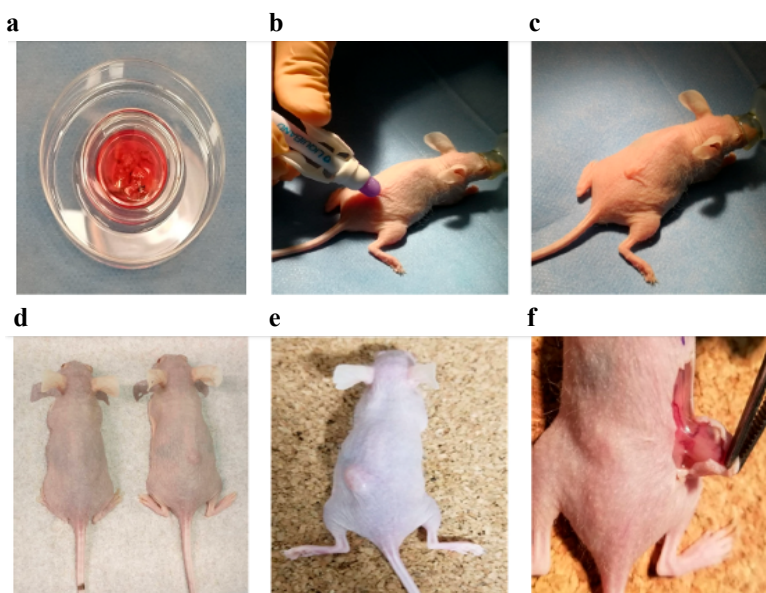
2.5.5. Kiaušidės audinio ksenotransplantacija

Tyrimai su gyvūnais buvo atliekami vadovaujantis 2010/63/ES Direktyva ir Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus įsakymu Nr. B1-866, 31-12-2012. Abu ksenotransplantacijos tyrimai buvo atlikti bandomųjų gyvūnų laboratorijoje (VU GMC).

Pirmasis ksenotransplantacijos tyrimas: trylika moteriškos lyties imunodeficitinių NOD.SCID (angl. *Non-Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficiency*) linijos pelių, 6 savaičių amžiaus, buvo atvežtos iš laboratorinių gyvūnų veisyklos *Envigo* (Jungtinė Karalystė). Pelių

aklimatizacijai buvo skirtos dvi savaitės. Pelės buvo laikomos steriliomis sąlygomis neribotai tiekiant sterilų vandenį bei sterilų *Teklad* maistą.

Ksenotransplantacijos operacija buvo atlikta steriliomis sąlygomis. Prieš ksenotransplantacijos operaciją gyvūnai buvo individualiai anestezuojami 3 % izoflurano dujomis (1000 mg/g) su medicininiu deguonimi 0,6 l/min. naudojant *EZ-SA800* anestezijos sistemą. Į kojos raumenį buvo suleidžiama sedatyvi medžiaga *Sedin* 1 mg/ml. Ksenotransplantacijos procedūra truko 5–10 min. Jau paruoštas KA gabalėlis buvo ksenotransplantuojamas dorsalinėje pelės kūno dalyje šalia stuburo po oda. Žaizda sutepama mediciniais klėjais. Pelių sveikatos būklė buvo stebima kasdien ir registruojama.



2.2 pav. Pirmojo ksenotransplantacijos tyrimo dizainas. **(a)** kiaušidės audiniai paruošti ksenotransplantacijai; **(b)** žaizdos klėjavimas mediciniais klėjais ksenotransplantavus kiaušidės audinį į pelės poodį; **(c)** anestezijos palaikymas ir deguonies tiekimas pelei; **(d)** iš kairės į dešinę – sveika pelė (3-ioji kontrolinė grupė) ir eksperimentinės grupės pelė su kiaušidės audinio transplantatu poodyje po 5 savaitžių; **(e-f)** po 2 savaitžių susiformavęs navikas 2-os kontrolinės grupės pelėje ir įvykusi *de novo* vaskuliarizacija.

Trylika eksperimentui skirtų pelių buvo suskirstytos į keturias grupes: eksperimentinė grupė, kuriai buvo transplantuojami lėtai užšaldyti / greitai atšildyti KA gabalėliai ($n = 5$); 1-oji kontrolinė grupė, kuriai buvo transplantuojami šviežio KA gabalėliai ($n = 5$); 2-oji kontrolinė grupė, kuriai buvo įskiepyta žmogaus krūties vėžio ląstelių linija MCF 7 ($n = 2$) po oda; ir 3-ioji kontrolinė grupė buvo sveikos pelės grupė ($n = 1$), kurioms nebuvo atliekama jokia invazinė procedūra (2.2 pav.).

Ekperimentinėms, 1-os bei 3-ios kontrolinės grupės pelėms eutanazija atlikta cervikalinės dislokacijos būdu 5-os savaitės pabaigoje, o 2-os kontrolinės grupės pelėms eutanazija atlikta po 2-jų savaičių dėl spartaus navikų augimo ir streso požymių elgesyje. Išimti transplantatai bei suformuoti navikai buvo patalpinami į formaliną ir išsiunčiami į UAB Patologijos diagnostika analizei.

Antrasis ksenotransplantacijos tyrimas: 10 moteriškos lyties imunodeficitinių NMRI-Foxn1^{nu} (angl. *Naval Medical Research Institute*) mutantinės linijos pelių, 6 savaičių amžiaus, buvo atvežtos taip pat iš laboratorinių gyvūnų veisyklos *Envigo* (Jungtinė Karalystė). Tolesnė eksperimento eiga buvo analogiška pirmajam ksenotransplantacijos tyrimui su keliomis modifikacijomis. Pelės buvo suskirstytos į dvi grupes po 5 individus, kuriems buvo ksenotransplantuoti 36 val. *in vitro* aktyvuoti KA, aprašyti 2.4.3 skyriuje. Kiekvienai pelei buvo transplantuojami du KA gabalėliai dorsolateraliai iš abiejų stuburo pusių po oda. Pelės buvo stebimos 4 savaites. Išimti transplantatai buvo padalinami į du gabalėlius, vienas patalpinamas į formaliną ir išsiunčiamas į patologijos laboratoriją analizei (1/3 audinio), kitas – užšaldomas genų raiškos tyrimams (2/3 audinio) (saugomi NVI -150 °C temperatūros šaldiklyje).

2.5.6. Kiaušidės audinio histologinis ir imunohistocheminis ištyrimai

Histologiniams ir imunohistocheminiams dažymams KA buvo fiksuojami formaline, įliejami į parafino vaško blokus ir supjaustomi 5 µm storio pjūviais. Dažymai buvo atliekami KLU Reprodukcinės patofiziologijos laboratorijoje (tik užšaldytų / atšildytų KA įvertinimas) disertacijos darbo autorės, o UAB Patologijos diagnostikoje (pirmasis ksenotransplantacijos tyrimas) ir Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filiale Valstybiniame patologijos centre (VULSK VPC, antrasis ksenotransplantacijos tyrimas) atlikta patologų.

Dažymas hematoksilinu ir eozinu (KLU): KA (n = 8) buvo deparafinizuojami ir dehidratuojami. Ląstelių branduoliai buvo dažomi 1 min. *Meyer* hematoksilino dažu, o citoplazma dažoma 5 min. su etanoliniu eozino *Y* tirpalu. Tuomet KA dehidratuojami ir uždengiami dengiamaisiais stikleliais. Histologiniai preparatai buvo skenuojami mikroskopiniu skeneriu *Pannoramic P250 Flash III Oyster* ir analizuojami su *CaseViewer v2.4* programa.

Dažymas prieš Ki-67 (KLU): KA (n = 8) buvo deparafinizuojami ir dehidratuojami. Toliau vykdomas endogeninės peroksidazės blokavimas 30 min. Antigenų išlaisvinimas vykdomas naudojant 0,1 M citrato (pH 6), demineralizuoto vandens ir 20 % *Triton X-100* buferyje 75 min. inkubuojant

98 °C temperatūros vandens vonelėje. Nespecifinių baltymų blokavimas vyko naudojant TBS, normalaus ožkos serumo ir jaučio serumo albumino mišinį, laikoma 30 min. Inkubuojama per naktį 4 °C su pirminiais antikūnais prieš Ki-67 (skiedimas 1:100, sc-101861). Kitą dieną KA pjūviai buvo inkubuojami 1 val. su antriniais antikūnais konjuguotais su krienų peroksidaze *EnVision FLEX System HPR* (skiedimas 1:100) ir 15 min. inkubuojami su DAB chromogenu, nuo kurio tiksliniai antigenai nusidažo ruda spalva. Stikleliai su audinių pjūviais praplaunami nuo substrato, dažomi 10 min. *Meyer* hematoksilinu, praplaunami distiliuotu vandeniu, dehidratuojami ir uždengiami dengiamuoju stikleliu. Preparatai skenuojami mikroskopiniu skeneriu *Pannoramic P250 Flash III Oyster* ir analizuojami su *CaseViewer v2.4* programa. Ki-67 baltymo raiška stebima visose ląstelių ciklo G1, S, G2, M stadijose (išskyrus G0) ir yra susijęs su ląstelių proliferacija. Nustatyta, jog didelė Ki-67 antigeno raiška (> 10 %) signalizuoja apie piktybinių ląstelių proliferacijos aktyvumą (Soliman *et al.*, 2016).

Dažymas *Masson trichromo*, *Fast green* rinkiniu (KLU): KA (n = 8) buvo deparafinizuojami ir dehidratuojami. Ląstelių branduoliai buvo dažomi 10 min. *Meyer* hematoksilino dažų, 5 min. fuksino ir *Ponceau* ksilidino tirpalu (1:2). Tuomet pjūviai veikiami 1 % rūgštiniu vandeniu, dažomi *Fast Green*, distiliuoto vandens ir 10 % SDS 5 min. mišiniu. Nuplaunama 1 % rūgštiniu vandeniu ir distiliuotu vandeniu. Mėginiai dehidratuojami ir uždengiami dengiamuoju stikleliu. Histologiniai preparatai skenuojami mikroskopiniu skeneriu *Pannoramic P250 Flash III Oyster* ir analizuojami su *CaseViewer v2.4* programa.

Dažymas prieš Ki-67 (UAB Patologijos diagnostikoje): KA (n = 10) ir navikas (n = 1) buvo dažomi automatizuotu būdu taikant sistemą *Roche Ventana Benchmark GX system* ir panaudojant pirminius antikūnus prieš Ki-67 (skiedimas 1:100, M3064). Teigiamai nusidažusių ląstelių kiekis buvo įvertintas naudojant *Olympus* mikroskopą ir x40, x100, x200 priartinimus.

Dažymas prieš alfa lygiųjų raumenų aktiną (angl. *Alfa Smooth Muscle Actin*, α -SMA) (VULSK VPC): dažymas atliktas pusiau automatinio būdu naudojant *PT Link* įrangą ir *Dako Autostainer 48+* (K8000, K8002, K8023) vizualizavimo sistemą. Blokavimas peroksidaze vyko 5 min. Po to, 30 min. inkubuojama su α -SMA pirminiais antikūnais (skiedimas 1:200; klonas 1A4), praplaunama ir 20 min. inkubuojama su antriniais antikūnais, konjuguotais su krienų peroksidaze. Vėliau praplaunama ir inkubuojama su DAB chromogenu. Stikleliai praplaunami nuo substrato, dažomi 10 min. *Meyer* hematoksilinu, praplaunami, dehidratuojami ir uždengiami dengiamuoju stikleliu. Nudažytų KA pjūvių α -SMA analizavimui naudotas *Olympus BX51*

mikroskopas su x40 priartinimu. Teigiamai α -SMA nusidažiusių kraujagyslių skaičiavimas buvo atliekamas VULSK VPC Molekulinės patologijos skyriuje. Buvo pasirinkti 3 atsitiktiniai regos laukai 0–500 μ m audinio periferijoje. Skaičiavimas buvo atliktas trijų nepriklausomų tyrėjų, vienas jų – patyręs sertifikuotas patologas, kiti – darbo autorė ir prie šio darbo prisidėjusi magistratūros studijų studentė.

Visų dažymų metu buvo naudojamos teigiamos ir neigiamos kontrolės.

2.5.7. Visuminės RNR išskyrimas

Tik atšildytas ar ksenotransplantuotas KA mėginys perkeliamas į grūstuvę su skystu azotu ir sutrinamas iki miltelių lizavimui su *QIAzol* tirpalu. Visuminei RNR iš KA išskyrimui ir išgryninimui buvo naudojami komerciniai *miRNeasy Mini Kit* ir *RNase-free DNase Set* rinkiniai DNR pašalinimui pagal gamintojo rekomendacijas. Išskirta RNR iki ištyrimo buvo laikoma -80 °C temperatūros šaldiklyje NVI Biobanke. Tolesniems darbams naudoti mėginiai, kurių RNR integralumas daugiau nei 5. Darbai atlikti NVI Biobanke ir Molekulinės onkologijos laboratorijoje.

2.5.8. Kopijinės DNR sintezė, panaudojant RNR matricą

Kopijinė DNR (kDNR), skirta *Human Breast Cancer miScript miRNA* PGR gardelėms, buvo susintetinama atvirkštinės transkripcijos metu panaudojant komercinius *miScript II RT Kit* ir *miScript HiSpec Buffer*. Vienai gardelei (96 reakcijoms) buvo naudojamas rekomenduotas 500 ng išgrynintos visuminės RNR kiekis. kDNR sintezė buvo vykdoma *Labcycler* PGR termocikleryje panaudojant programą: 60 min. 37°C ir 5 min. 95°C. Paruošta kDNR saugoma -80 °C temperatūros šaldiklyje NVI Biobanke.

kDNR, skirta genų raiškai tirti, buvo susintetinama panaudojant komercinį *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* rinkinį. Kiekvieno mėginio kDNR buvo pagaminta iš 550 ng visuminės RNR. kDNR sintezė vykdyta *Labcycler* PGR termocikleryje, panaudojant programą: 10 min. 25°C, 120 min. 37°C ir 5 min. 85°C. Paruošta kDNR saugoma -80 °C temperatūros šaldiklyje NVI Biobanke.

2.5.9. Tikro laiko PGR

Tikro laiko (TL) PGR buvo naudojama genų ir miRNR raiškos tyrimams. Komercinis *miScript SYBR Green PCR Kit* rinkinys buvo naudojamas TL-PGR mišiniams paruošti. Į kiekvieną TL-PGR gardelės šulinėlį, kuriame buvo gamintojo parinkti pradmenys, įpilama PGR mišinio su kDNR. TL-PGR

vykdoma *Rotor-Gene Q* termocikleryje pagal gamintojo sukurtą programą, žr. 2.2 lentelę.

PGR gardelė buvo sudaryta iš 84-ių miRNR, 6-ių endogeninių kontrolių, teigiamos PGR kontrolės (angl. *positive PCR control*), kuri įvertina PGR efektyvumą, ir atvirkštinės transkripcijos kontrolės (angl. *miRNA reverse transcription control*), kuri parodo atvirkštinės transkripcijos reakcijos, atliktos su *miScript II RT Kit* rinkiniu, efektyvumą.

2.2 lentelė. Kiekybinės TL-PGR *Rotor-Gene Q* termocikleryje sąlygos

Žingsniai	Trukmė	Temperatūra	Ciklų skaičius
Polimerazės aktyvacija	15 min	95 °C	1
3-jų žingsnių ciklas			
Denatūracija	15 s	94 °C	40
Pradmenų prijungimas	30 s	55 °C	
Sintezė	30 s	70 °C	

Gautų duomenų pirminė analizė atliekama naudojant *miScript miRNA PCR Array Data Analysis* programą. Kiekvienos miRNR santykinė raiška mėginyje vertinama $\Delta\Delta C_T$ metodu ir normalizuojama pagal endogenines kontroles. Tiriamajame mėginyje santykinis transkripto kiekis, išreikštas kartais, palyginus su kontroliniais mėginiais, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Transkripto pokytis kartais, lyginant su kontrole} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\Delta\Delta C_T = \left(\frac{CT \text{ tiriamo transkripto}}{CT \text{ kontrolinis genas}} \right)_{\text{tiriamasis mėginys}} - \left(\frac{CT \text{ tiriamo transkripto}}{CT \text{ kontrolinis genas}} \right)_{\text{kontrolinis mėginys}}$$

TL-PGR genų raiškai nustatyti buvo naudojami *TaqMan™* pradmenys (išvardinti 2.1 poskyryje) su jiems skirtu komerciniu *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix* rinkiniu pagal gamintojo rekomendacijas pridedant 5 ng kDNR į kiekvieną šulinėlį. TL-PGR vykdoma *QuantStudio™ 5* termocikleryje pagal gamintojo sukurtą programą, žr. 2.3 lentelę. PGR plokštelėje buvo įdedamos neigiamos PGR kontrolės kiekvienam genui (angl. *negative PCR control*), į kurias nebuvo dedama kDNR, taip įvertinant PGR mišinio užterštumą.

2.3 lentelė. Kiekybinės TL-PGR sąlygos naudojant *TaqMan™* pradmenis

Žingsniai	Trukmė	Temperatūra	Ciklų skaičius
UNG inkubacija	2 min	50 °C	1
Polimerazės aktyvacija	20 s	95 °C	1
2-jų žingsnių ciklas			
Denatūracija	1 s	95 °C	40
Pradmenų prijungimas / Sintezė	20 s	60 °C	

Gautų duomenų pirminė analizė buvo atliekama panaudojant *QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.1* programą. Kiekvieno geno santykinis raiškos pokytis vertinamas $\Delta\Delta C_T$ metodu ir normalizuojamas pagal kontrolinio *GAPDH/Gapdh* ar *YBX2* (folikulų genų raiškos įvertinimui) geno raišką. Tiriamajame mėginyje santykinis transkripto kiekis, išreikštas kartais, apskaičiuojamas pagal formulę $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Molekuliniai tyrimai su KA buvo atlikti NVI Biobanke.

2.5.10. miRNR taikinių paieška ir jų signalinių kelių praturtinimo analizė

miRNR, kurių raiška buvo reikšmingai ($p < 0,05$) pakitusi (pokytis kartais ≥ 2), taikinių paieška atlikta panaudojant *miRDB* (www.mirdb.org) ir *TargetScan 7.2* (www.targetscan.org/vert_72) duomenų bazes. Iš *miRDB* bazės buvo pasirinkti tie taikiniai, kurių taikinio balas (angl. *target score*) buvo ≥ 90 , o iš *TargetScan* bazės taikiniai, kurių CWCS (angl. *cumulative weighted context score*) $< -0,4$. Genų-taikinių Kioto genų ir genomo enciklopedijos (angl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG) signalinių kelių praturtinimo analizė atlikta pasitelkus *ShinyGO* v0.08 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) internetinį įrankį su klaidingo atradimo dažniu (KAD, angl. *false discovery rate*, FDR) $< 0,05$.

2.5.11. Folikulų išskyrimas iš kiaušidės audinio

Užuomazginiai bei pirminiai folikulai buvo išskiriami iš KA žievinio sluoksnio panaudojant Chiti *et al.* (2017) protokolą. Vadovaujantis protokolu, šešių pacienčių (25–30 metų amžiaus) KA fragmentai buvo mechanškai susmulkinami su audinių smulkinimo aparatu ir perkeliami į 0,28 *Wünsch* vienetų/ml liberazės DH su 12 Kunitz vienetų/ml DNazės ir DPBS su Ca^{2+} ir Mg^{2+} tirpalą. Susmulkinti audiniai inkubuojami 37 °C temperatūros vandens vonelėje švelniai purtant. Kas 15 min. tirpalas supipetuojamas, o kas 30 min. praleidžiamas per 70 μm filtrą folikulų atskyrimui nuo audinio. Fermentai išaktyvuojami įpilant tokį patį tūrį DPBS su 10 % FBS. Fermentinis apdorojimas tęsiamas iki 90 min. Išskirti folikulai surenkami su 130 μm mikropipete panaudojant stereomikroskopą. Darbai atlikti KLU Reprodukcinės patofiziologijos laboratorijoje.

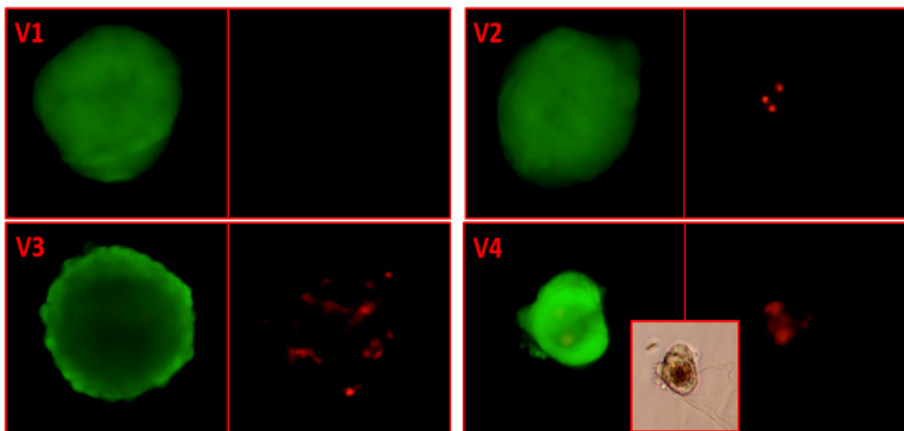
2.5.12. Kiaušidės audinio stromos ląstelių išskyrimas ir auginimas *in vitro*

Menopauzės sulaukusių moterų KA buvo pasirenkami dėl audinių sudarančių ląstelių tipų panašumo į moterų, kurioms, dėl gonadotoksinio gydymo, pasireiškia ankstyvoji menopauzė – priešlaikinis kiaušidžių išsekimas. KA

stromos ląstelės (kaSL) buvo išskiriamos panaudojant adaptuotą Chiti *et al.* (2017) protokolą. Pagal protokolą, penkių pacienčių (51–68 metų amžiaus) KA fragmentai buvo mechaniškai susmulkinami naudojant audinių smulkinimo aparatą ir perkeliama į DPBS su Ca^{2+} ir Mg^{2+} jonais, papildytu 0,28 *Wünsch* vienetų/ml liberazės DH ir 12 Kunitz vienetų/ml DNazės. Susmulkinti audiniai buvo inkubuojami 37 °C temperatūros vandens vonelėje švelniai purtant 75 min. Kas 15 min. tirpalas supipetuojamas. Fermentai išaktyvuojami įpilant tokį patį turį DPBS su 10 % FBS. Tirpalas praleidžiamas per 70 µm filtrą, tuomet per 30 µm filtrą stromos pavienių ląstelių atskyrimui. Ląstelės centrifuguojamos 4 °C temperatūroje 10 min. 500 g greičiu, ląstelių nuosėdos suspenduojamos *DMEM/F12* terpėje, papildytoje 10 % FBS, 1 % antibiotikų ir antimikotikų mišiniu ir 1 % ITS. Ląstelės suskaičiuotos naudojant tripano mėlį bei *Bürker* kamerą, išsėjamos į 4-šulinėlių plokštelę, inkubuojamos 37 °C, 5 % CO_2 inkubatoriuje ir kultivuotos *in vitro* iki monosluoksniu suformavimo. Darbai atlikti KLU Reprodukcinės patofiziologijos laboratorijoje.

2.5.13. Folikulų gyvybingumo vertinimas

Tik ką išskirtų (0-inę dieną; d0) ar *in vitro* brandintų (7-tą dieną; d7) folikulų gyvybingumas buvo nustatomas juos inkubuojant 30 min. tamsoje su 2 µmol/L kalceinu AM ir 5 µmol/L etidžio homodimeru-I *LIVE/DEAD®* tirpalu 37 °C temperatūroje, analizuoti *LSM 510* konfokalinio mikroskopo.



2.3 pav. Folikulų klasifikacija pagal gyvybingumą, nudažius kalceinu AM (žalia spalva) ir etidžio homodimeru-I (raudona spalva). V1: visiškai nepažeistas; V2: minimaliai pažeistas; V3: vidutiniškai pažeistas; V4: žuvęs folikulas. Įterpta nuotrauka rodo folikulą su žuvusia kiaušialąste.

Folikulai suskirstyti į keturias (V1–V4) kategorijas (Martinez-Madrid *et al.*, 2004) (2.3 pav.): V1, visiškai nepažeistas folikulas, su visomis gyvybingomis grūdėtosiomis ląstelėmis (GL) ir kiaušialąste; V2, minimaliai pažeistas folikulas su mažiau nei 10 % žuvusių GL; V3, vidutiniškai pažeistas folikulas nuo 10 % iki 50 % pažeistų GL; ir V4, žuvęs folikulas, kai yra daugiau nei 50 % žuvusių GL ir/ar žuvusi kiaušialąstė. V1 ir V2 kategorijų folikulai laikomi gyvybingais; V3 ir V4 kategorijų folikulai laikomi negyvybingais (arba žuvę). Darbai atlikti KLU Reprodukcinės patofiziologijos laboratorijoje.

2.5.14. Dirbtinės kiaušidės konstravimas – folikulų inkapsuliacija į alginato lašelius ir brandinimas *in vitro*

Folikulų inkapsuliacijai 3 % SLM alginatas buvo praskiedžiamas iki 1,11 % su MOPS pagal Vanacker *et al.* (2014). Vidutiniškai apie 10 folikulų buvo sugrupuojami, inkapsuliuojami į alginato tirpalo lašelius (alginato galutinė koncentracija 1 %) ir perkeliama į 0,1 M CaCl₂ tirpalą gelinės struktūros suformavimui. Šie lašeliai 3 kartus praplaunami MOPS tirpale po 5 min. Buvo suformuojami 1–3 alginato lašeliai, priklausomai nuo folikulų, išskirtų iš vienos pacientės KA, skaičiaus ir patalpinami į atskirus šulinėlius auginimo plokštelėje ant kaSL monosluoksnio arba tiesiai ant šulinėlių paviršiaus. Brandinimo terpės sudėtis nurodyta 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Folikulų *in vitro* brandinimo terpės sudėtis

	Koncentracija		Koncentracija
DMEM/F12 terpė	-	bFGF	30 ng/ml
FBS	10 %	IGF1	50 ng/ml
Menopur*	0,2 %	EGF	30 ng/ml
ITS	1 %	GDF-9	40 ng/ml
Piruvo rūgštis	50 mg/ml	SCF	100 ng/ml
Antibiotikų antimikotikų mišinys	1 %		

*75IU folikulus stimuliuojančio hormono ir liuteinizuojančio hormono tirpalas. bFGF – rekombinantinis žmogaus bazinis fibroblastų augimo veiksnys (angl. *basic fibroblast growth factor*), IGF – į insuliną panašus augimo veiksnys 1 (angl. *insulin-like growth factor 1*), EGF – epidermio augimo veiksnys (angl. *epidermal growth factor*), GDF-9 – augimo diferenciacijos veiksnys 9 (angl. *growth differentiation factor 9*), SCF – kamieninių ląstelių veiksnys (angl. *stem cell factor*).

Inkapsuliuoti folikulai brandinami 7 dienas 37 °C temperatūroje, 5 % CO₂ inkubatoriuje. Kas 2–3 dienas pusė auginimo terpės pakeičiama šviežiai pasidaryta folikulų *in vitro* brandinimo terpe. Nusiurbta terpė užšaldoma -80 °C temperatūroje tolesniems tyrimams. Septintą eksperimento dieną visa

nusiurbta terpė užšaldoma -80 °C temperatūros šaldiklyje tolesniems tyrimams. Darbai atlikti KLU Reprodukcinės patofiziologijos laboratorijoje.

2.5.15. Folikulų klasifikacija pagal dydį

Folikulų diametras buvo matuojamas d0, d3 ir d7 *in vitro* folikulų brandinimo kultūros dienomis invertuotu mikroskopu, turinčiu 0,01 mm tinklėlį. Folikulai buvo klasifikuojami pagal Lierman *et al.* (2015): užuomazginiai ($\leq 60 \mu\text{m}$), pirminiai (nuo $61 \mu\text{m}$ iki $75 \mu\text{m}$) ir antriniai (nuo $76 \mu\text{m}$ iki $200 \mu\text{m}$). Antriniai folikulai papildomai suskirstomi į ankstyvuosius / vidurinius (nuo $75 \mu\text{m}$ iki $100 \mu\text{m}$), vidurinius / vėlyvuosius (nuo $100 \mu\text{m}$ iki $150 \mu\text{m}$) ir vėlyvuosius (daugiau nei $150 \mu\text{m}$) (Kristensen *et al.*, 2011). Darbai atlikti KLU Reprodukcinės patofiziologijos laboratorijoje.

2.5.16. Steroidogenezės dirbtinių kiaušidžių auginimo terpėse įvertinimas

Užšaldytos auginimo terpės (folikulų, augintų ant kaSL monosluksnio ar be jo) buvo atšildomos estradiolio kiekio nustatymui panaudojant imunofermentinį tyrimo metodą pagal gamintojo rekomendacijas. Paruošti standartai, eksperimentiniai ir kontroliniai mėginiai buvo supilstomi į 96-šulinėlių plokštelę, kurioje buvo su biotinu konjuguoti estradioliui specifiški antikūnai. Pridedama avidino, konjuguoto su krienų peroksidaze, ir inkubuojama 1 val. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos pridedama substrato. Fermento-substrato reakcija pabaigiamą pridedant sieros rūgšties tirpalo. Sugertis matuojama spektrofotometru ties 450 nm ilgio banga. Nustatymo intervalas nuo 15,63 pg/ml iki 1000 pg/ml. Darbai atlikti KLU Reprodukcinės patofiziologijos laboratorijoje.

2.5.17. Šiaurės-Baltijos regiono šalių vaikų onkologijos centrų apklausa

Bendradarbiaujant su NOPHO, buvo išsiųsti anoniminiai elektroniniai klausimynai 23-ims didžiausių vaikų onkologijos centrų direktoriams Šiaurės ir Baltijos šalyse. Klausimynas buvo sudarytas kartu su vaikų onkologais bei ginekologais, norint išsiaiškinti vaikų iki pilnametystės vaisingumo išsaugojimo galimybes šiose šalyse. Apklausoje buvo pateikti 22 klausimai, kurie leido susipažinti su patvirtintomis gairėmis, taikomomis vaisingumo išsaugojimo galimybėmis, klinikinėmis indikacijomis ir konsultavimu (P8 lentelė). Visi apklausti vaikų onkologijos centrai priklausė universitetinėms ligoninėms. Vaisingumo išsaugojimas paslaugos Šiaurės-Baltijos regiono šalyse yra daugiausiai finansuojamas sveikatos sistemos, tačiau kai kuriais

atvejais yra remiamos gydymo įstaigų programomis arba pačių pacientų, nevyriausybinių organizacijų ar paramos / labdaros fondų.

Klausimynai buvo užpildyti vaikų onkologų bendradarbiaujant su vaikų onkologijos centro specialistais. Klausimynai buvo užpildyti iki 2022 metų pabaigos naudojant internetinį įrankį „Nettskjema“ (<https://www.uio.no/english/services/it/adm-services/nettskjema/>).

2.5.18. Statistinė duomenų analizė

miRNR raiškos duomenų analizės buvo atliekamos panaudojant *miScript miRNA PCR Array Data Analysis* arba *Python v3.12* programas. Statistiškai reikšmingi miRNR raiškos skirtumai tarp tiriamosios grupės (atšildytų KA mėginių) ir kontrolinių grupių (sveiko krūties ir navikinio audinio mėginių) miRNR raiškos buvo nustatomos taikant dviejų parametų Stjudento *t* kriterijų. Statistiškai reikšmingai pakitusia laikoma miRNR raiška, kai raiškos pokyčio reikšmė kartais buvo 2 kartai arba daugiau, o skirtumai laikomi statistiškai reikšmingais, kai p reikšmė $< 0,05$.

Kitų tyrimų statistinė duomenų analizė atliekama panaudojant *GraphPad Prism*, v9.1.2. Kiekybiniai duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ SN (standartinis nuokrypis), vidurkis $\pm$ SEM (vidurkio standartinė paklaida, angl. *standard error of the mean*) arba mediana $\pm$ IKR (interkvartilinis regionas), analizuota Stjudento *t* kriterijumi, ANOVA su Tukey *post-hoc* kriterijumi arba Mann-Whitney U testu, priklausomai ar duomenų pasiskirstymas normalus ir dispersijos lygios. Kokybiniai duomenys analizuojami Chi-kvadrato suderinamumo kriterijumi arba Fisherio tiksliuoju kriterijumi. Skirtumai laikomi statistiškai reikšmingais, kai p reikšmė $< 0,05$.

Apklaustos rezultatai analizuoti su *Microsoft Excel 365* panaudojant aprašomąją statistiką.

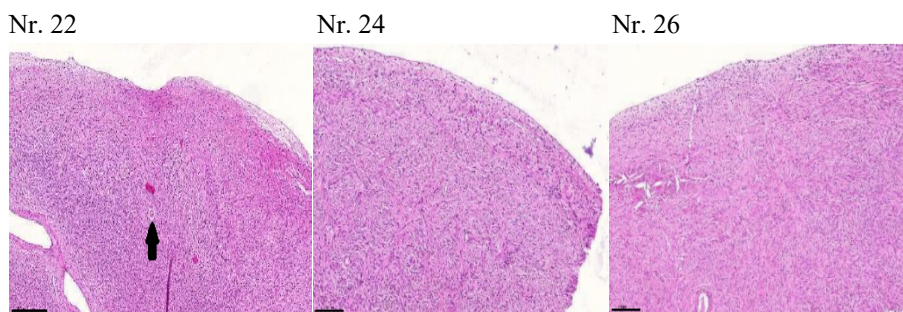
3. REZULTATAI

3.1. Atšildytų kiaušidės audinių įvertinimas

Šio darbo metu buvo vertinamas audinio gyvybingumą išsaugančio lėto užšaldymo protokolo (2.4.1.) / greito atšildymo (2.4.2.) poveikis KA. Dėl galimų pažeidimų, užšaldytuose / atšildytuose KA ($n = 8$) buvo įvertinamas bendras audinio struktūros vientisumas (3.1 pav.), jungiamojo audinio struktūros (3.2 pav.), ląstelių proliferacija (3.3 pav.) *in vitro* ir prigijimo potencialas (3.4 pav. a–c) bei potencialiai metastazavusių piktybinių ląstelių įvertinimas (3.4 pav. d–f) po lėto užšaldymo / greito atšildymo atliekant ksenotransplantaciją į imunodeficitines peles tyrimus. Buvo atliktas miRNR raiškos palyginimo tarp sveiko ($n = 2$), navikinio ($n = 2$) krūties audinio ir KA iš moterų, kurioms nustatytas krūties vėžys ($n = 3$), tyrimas, siekiant įvertinti miRNR raiškos skirtumus. Buvo atrinktos reikšmingai pakitusios raiškos miRNR (pokytis kartais > 4 , $p < 0,05$) (3.5 pav.), nustatyti jų genai-taikiniai *in silico* bei atlikta genų-taikinių praturtinimo analizė (3.7 ir 3.8 pav.).

3.1.1. Struktūros įvertinimas

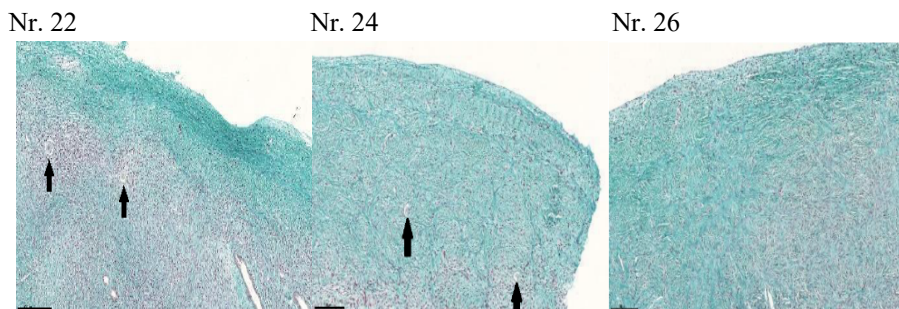
Histologinių preparatų nuotraukose (3.1 pav.) matome nepakitusią KA struktūrą ir jos vientisumą. Ląstelės ir jų branduoliai yra aiškiai išreikšti, audiniai tankūs, be ryškių beląstelių audinio sričių. Taip pat skirtinguose audinių pjūviuose (3.1, 3.2 ir 3.3 pav.) matomi užuomazginiai / tarpiniai folikulai (rodyklės) pasižymėjo normalia arba nežymiai atsitraukusia citoplazma nuo GL, kurios svarbios užtikrinti folikulų vystymąsi, morfologija.



3.1 pav. Histologinis struktūros vientisumo įvertinimas kiaušidės audiniuose (Nr. 22, 24, 26) po atšildymo. Dažymas su hematoksilinu ir eozinu: branduoliai – violetinė; ląstelių citoplazma – rožinė spalva. Rodyklės rodo kiaušidės audinyje esančius folikulus. Mastelis 100 μm .

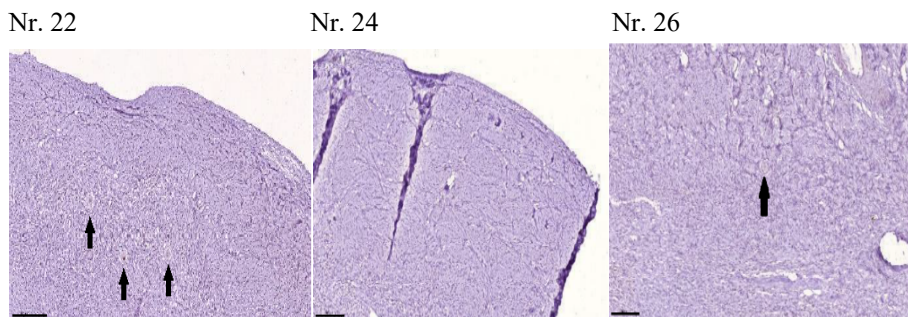
Dažant *Masson* trichromu rinkiniu nudažomi KA jungiamojo audinio elementai, kolagenas bei raumeninės ląstelės. Jungiamojo audinio elementų

įvertinimas yra svarbus, nes gali parodyti fibrozinės audinio vietas, kurios yra gausios kolageno sankaupų bei sumažėjusio ląsteliškumo sritys. Tokios vietos KA gali atsirasti dėl užšaldymo / atšildymo procesų arba dėl natūralios audinių struktūros, jeigu audinys buvo gautas iš vyresnio amžiaus moters. Visi audiniai, išskyrus vieną (3.2 pav., Nr. 26), neturėjo fibroziniam audiniui būdingų elementų. Išanalizavus tris atsitiktinius nr. 26 KA pjūvius, nustatytas tik 1 % fibrozinės audinio srities. Raumeninės ląstelės, kurios įprastai išsidėsto aplink kraujagysles ir augančius folikulus, nebuvo aptiktos, kadangi jos labiau būdingos KA šerdinei, o ne žievinei daliai.



3.2 pav. Jungiamojo audinio elementų įvertinimas kiaušidės audiniuose (Nr. 22, 24, 26) po atšildymo. Dažymas *Masson* trichromo rinkiniu: kolagenas – žalia; branduoliai – violetinė; citoplazma – rožinė spalva. Rodyklės rodo kiaušidės audinyje esančius folikulus. Mastelis 100 μ m.

Toliau buvo vertinama proliferacijos žymens (Ki-67) raiška (3.3 pav.) atšildytuose KA. Visuose audiniuose Ki-67 raiška buvo nustatyta mažesnė nei 5 % (didesnė raiška galėtų rodyti proliferuojančias metastazavusių navikinių ląstelių sankaupas). Nors proliferacijos žymuo buvo aptiktas keliose folikulų kiaušialąstėse (3.3 pav., nr. 22, vidurinė rodyklė), didžioji dalis aptiktų folikulų – tiek kiaušialąstės, tiek GL – nepasižymėjo šio baltymo raiška.

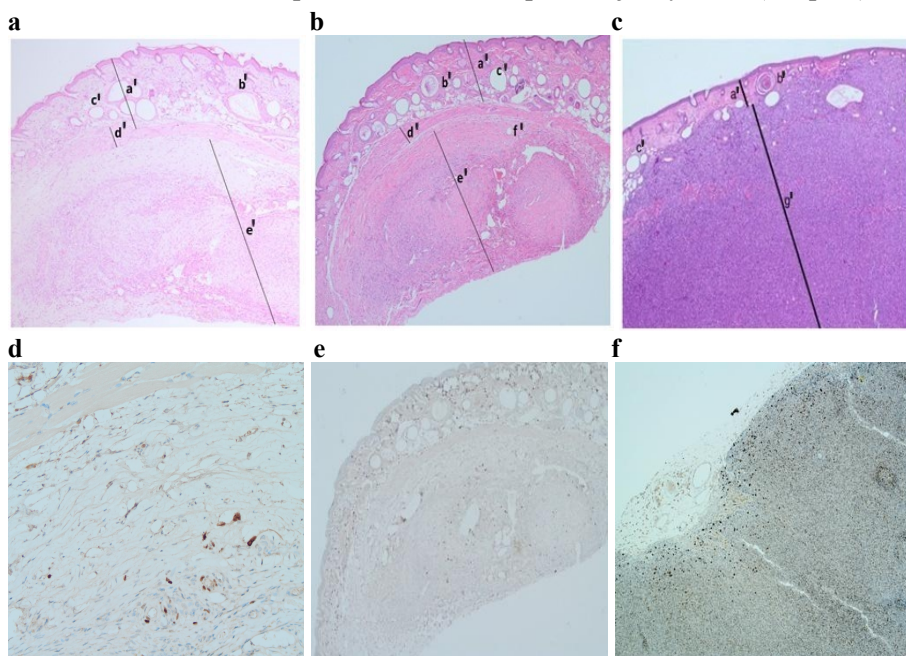


3.3 pav. Proliferuojančių ląstelių įvertinimas kiaušidės audiniuose (Nr. 22, 24, 26) po atšildymo. Imunohistocheminis Ki-67 dažymas: branduoliai – violetinė; Ki-67 – ruda. Rodyklės rodo kiaušidės audinyje esančius folikulus. Mastelis 100 μ m.

Iš histologinio ir imunohistocheminio įvertinimo galime daryti išvadą, jog audinio apdorojimas iki užšaldymo, lėto užšaldymo ir greito atšildymo protokolai nepažeidžia audinių vientisumo, nesukelia jungiamojo audinio elementų sankaupų ir ląstelių masinės aktyvacijos.

3.1.2. Audinio gyvybingumo, prigijimo ir piktybinių transformacijų įvertinimas

Atlikus audinio struktūrinę analizę, toliau buvo siekiama įsitikinti, jog šio biomedicininio tyrimo metu naudoti KA lėto užšaldymo / greito atšildymo protokolai išsaugo ir jų gyvybingumą, ir gebėjimą prigyti po transplantacijos (3.4 pav.). Taip pat atliktas ir piktybinių ląstelių audinyje nustatymo tyrimas. Tuo tikslu buvo atliktas pirmasis ksenotransplantacijos tyrimas (2.2 pav.).



3.4 pav. Histologinis audinių ir imunohistocheminis proliferuojančių ląstelių įvertinimas po 35 dienų ksenotransplantacijos. **(a ir d)** šviežias transplantuotas KA; **(b ir e)** užšaldytas / atšildytas transplantuotas KA; **(c ir f)** navikinis audinys. a–c – histologinis dažymas, d–f – imunohistocheminis Ki-67 dažymas (ruda spalva teigiamai nusidažiusios ląstelės). a' – pelės oda; b' – pelės plauko folikulas; c' – riebalų sankaupos; d' – tarpinė zona tarp KA ir pelės odos; e' – žmogaus KA; f' – kraujagyslė; g' – įskiepytų vėžinių ląstelių sankaupa. a, b, c, e ir f priartinimas $\times 40$, d priartinimas $\times 100$. KA – kiaušidės audinys.

Po užšaldymo ir ne trumpiau nei 1 metai saugojimo laikotarpio, penkių pacienčių KA buvo atšildyti ir transplantuoti į imunodeficitinių pelių poodį. Stebėsena truko 35 d. Makroskopinė analizė atskleidė audinių gebėjimą prigyti po transplantacijos ir atkurti kraujotaką. Eksperimentinėje grupėje 4 iš

5 atšildytų audinių prigijo sėkmingai (80 %). Pirmojoje kontrolinėje grupėje švieži KA transplantuoti ir prigijo sėkmingai (100 %). Antrojoje kontrolinėje grupėje spartus navikų augimas su stipriai išvystyta *de novo* kraujagyslių sistema buvo stebimas jau po 14 d. nuo eksperimento pradžios. Trečiosios kontrolinės grupės pelės išliko sveikos viso 35 d. eksperimento metu.

Histologinė analizė (3.4 pav., a–c) parodė sėkmingą KA ir naviko transplantacijos procedūrą ir prigijimą. KA mėginiuose stebima tarpinė zona iš jungiamojo audinio (3.4 pav., d'), taip pat ir neovaskuliarizacijos elementai (3.4 pav., f') tarp pelės poodžio bei KA. Ki-67 dažymas (3.4 pav., d–f) atskleidė mažesnę nei 5 % raišką tiek šviežiuose, tiek atšildytuose transplantuotuose KA, o kontrolinėje grupėje, kurioje buvo įskiepytos vėžinės ląstelės, stebėta didesnė nei 10 % Ki-67 baltymo raiška.

3.1.3. MiRNR raiškos įvertinimas ir analizė

Diferencinė miRNR raiškos analizė tarp sveiko ($n = 2$) bei navikinio krūties ($n = 2$) audinių buvo atlikta siekiant nustatyti miRNR, susijusių su krūties vėžiu, raiškos skirtumus (P4 pav.) ir sudaryti krūties navikiniui audiniui būdingą miRNR raiškos profilį. Pagal šį profilį būtų galima įvertinti, ar moterų, kurioms nustatytas III stadijos krūties vėžys, užšaldytuose KA yra metastazavusių krūties navikinių ląstelių iš pirminės vėžio židinio lokalizacijos. Šių pacienčių KA buvo užšaldyti vaisingumo išsaugojimo tikslais, todėl įvertinti KA potencialią infiltraciją piktybinėmis ląstelėmis prieš retransplantaciją atgal į moters organizmą yra būtina.

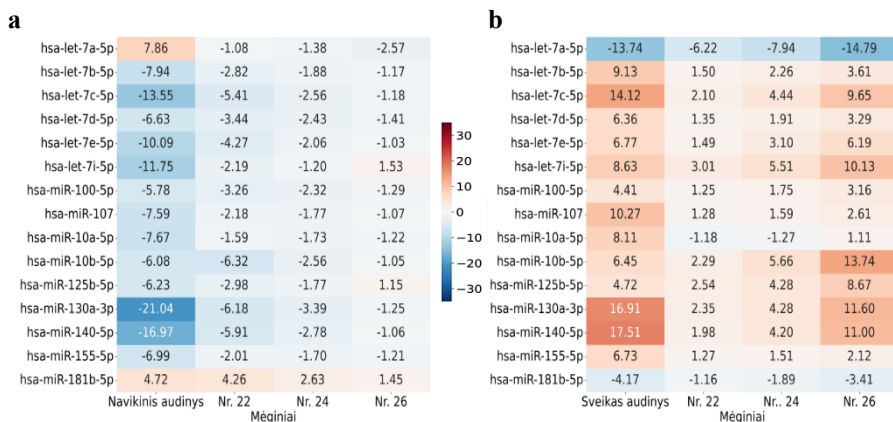
Human Breast Cancer miScript miRNA PGR gardelės sudarytos iš 84 miRNR, kurios arba yra žinomos dėl savo vaidmens krūties vėžio atveju, arba nustatytos bioinformatiniais tyrimais kaip potencialiai dalyvaujančios genų, susijusių su krūties vėžiu, reguliavimo procesuose. Ženkliai padidėjusi miRNR raiška įprastai rodo, kad jos genų-taikinių informacinės RNR raiška bus slopinama, o sumažėjusi miRNR raiška – aktyvinama genų-taikinių informacinių RNR transliacija. Šio tyrimo metu buvo nustatytos 39-ios miRNR, kurių raiška statistiškai reikšmingai ($p > 0,05$) skyrėsi bent 2 kartus navikiniame krūties audinyje palyginus su sveiku krūties audiniu (P4 pav.). Iš šių 39-ių miRNR, 15-os raiškos pokytis buvo bent 4 kartai, tad, siekiant sudaryti patikimesnį navikinio audinio miRNR raiškos profilį, buvo pasirinktos būtent šios miRNR (3.5 pav., a, P3 lentelė).

Taip pat, buvo sudarytas ir sveikam krūties audiniui būdingas miRNR raiškos profilis (3.5 pav., b, P1 lentelė), panaudojus tuos pačius parametrus – statistiškai reikšmingas raiškos pokytis bent 4 kartai – kuris pasižymėjo priešingomis miRNR raiškomis nei navikiniame krūties audinyje. Šis profilis

buvo taipogi panaudotas lyginant tų pačių miRNR raišką KA, siekiant patikrinti į kurio krūties audinio – navikinio ar sveiko – profilį yra panašesni tirti KA (3.5 pav., b)

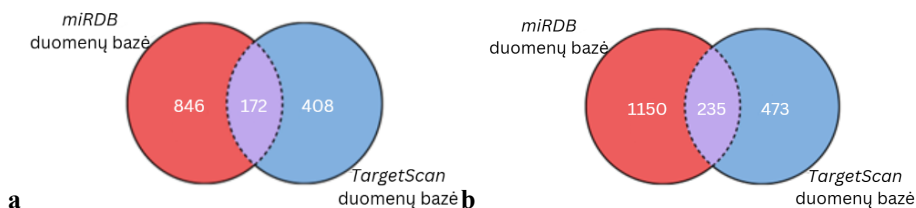
Iš 3.4 pav. matome, kad palyginus krūties sveiko ir naviko miRNR raiškos profilius su trijų skirtingų moterų KA miRNR raiškos profiliais (Nr. 22, 24, 26), buvo stebimi didesni raiškos skirtumai tarp navikinio krūties audinio ir KA nei sveiko krūties audinio ir KA. Iš to būtų galima daryti išvadą, jog šiuose audiniuose nėra aptikta metastazavusių krūties navikinių ląstelių. Tai patvirtina ir anksčiau aprašyti makroskopiniai ir mikroskopiniai – histologiniai ir imunohistocheminiai – transplantuotų audinių tyrimai (3.1 pav., 3.2 pav., 3.3 pav., 3.4 pav.).

Toliau buvo siekiama palyginti KA miRNR raiškos profilio skirtumus tiek sveiko, tiek navikinio krūties audinio ir atlikti šių miRNR *in silico* analizę. KA buvo nustatytos 13 miRNR, kurių raiškos pokytis statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi bent du kartus nuo sveiko krūties audinio (P2 lentelė). Taip pat, buvo nustatytos ir 18 miRNR, kurių raiškos pokytis statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi bent 2 kartus nuo navikinio krūties audinio (P3 lentelė). Iš jų buvo atrinktos 5-ios miRNR, kurių raiška > 2 kartus didesnė – hsa-miR-1-3p, hsa-miR-202-3p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-495-3p ir 9-ios miRNR, kurių raiška > 2 kartus mažesnė – hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-429, hsa-miR-96-5p.



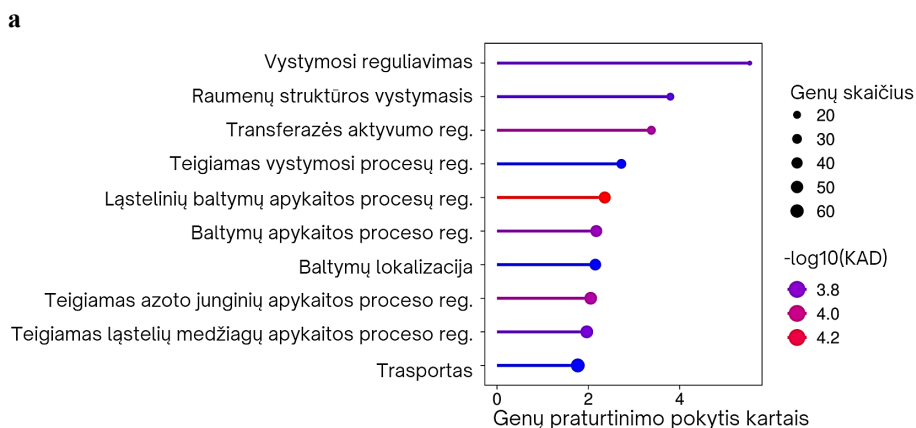
3.5 pav. miRNR raiškos pokyčių profiliai. **(a)** navikinio krūties audinio miRNR raiškos profilis ir jo palyginimas su tiriamųjų kiaušidės audinių miRNR profiliais. **(b)** sveiko krūties audinio miRNR raiškos profilis ir jo palyginimas su tiriamųjų kiaušidės audinių miRNR profiliais. Naudotos miRNR, kurių raiška statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) pakitusi bent 4 kartus.

Atrinkus šias miRNR (raiškos pokytis kartais > 2 , $p < 0,05$), buvo identifikuoti jų genai-taikiniai ir atliekama šių genų-taikinių praturtinimo analizė, siekiant įvertinti, ar tai gali parodyti kokį poveikį lėto šaldymo ir greito atšildymo protokolai daro KA. Genų-taikinių paieška atlikta naudojantis *miRDB* ir *TargetScan* duomenų bazėmis. Iš nustatytų genų-taikinių duomenų bazėse, atrinkti tik tie, kurie buvo rasti abiejose duomenų bazėse. Remiantis nubraižyta Veno diagrama, buvo atrinkti 172 genai-taikiniai miRNR, kurių raiška didesnė (3.6 pav., a) ir 235 genai-taikiniai miRNR, kurių raiška mažesnė (3.6 pav., b).



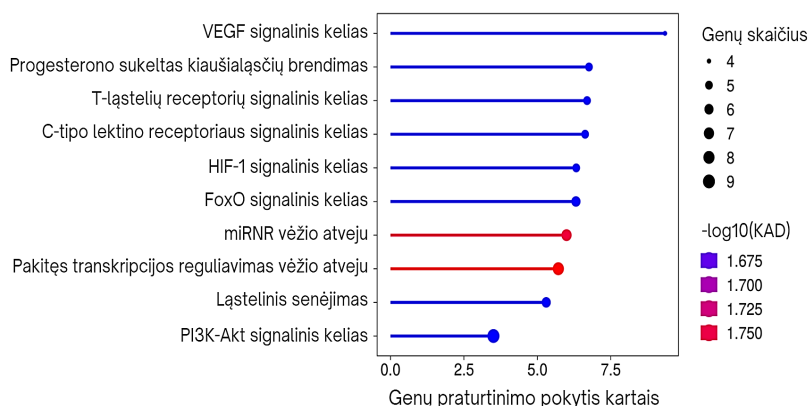
3.6 pav. Veno diagramos, kurios rodo genų-taikinių skaičių, nustatytą *miRDB* ir *TargetScan* duomenų bazėse. **(a)** genai-taikiniai miRNR, kurių raiška nustatyta statistiškai reikšmingai didesnė (raiškos pokytis > 2 , $p < 0,05$); **(b)** genai-taikiniai miRNR, kurių raiška nustatyta statistiškai reikšmingai mažesnė (raiškos pokytis > 2 , $p < 0,05$).

Siekiant detaliau išsiaiškinti procesus, kuriuose dalyvauja šie genai-taikiniai, ir jų galimas epigenetinio reguliavimo pasekmes, buvo atlikta KEGG signalinių kelių ir biologinių procesų (genų ontologijos (GO) terminų) praturtinimo analizė. Genai, kurie nustatyti kaip taikiniai miRNR, kurių raiška reikšmingai ($p < 0,05$) didesnė (3.7 pav., P4 ir P5 lentelės) ar mažesnė (3.8 pav., P6 ir P7 lentelės), buvo priskirti 10 signalinių kelių bei biologinių procesų GO terminų.



(3.7 pav. tęsinys kitame puslapyje)

b



3.7 pav. Kiaušidžių audinyje nustatytų miRNR, kurių raiška didesnė (raiškos pokytis kartais > 2 , $p < 0,05$) lyginant su kontroliniais audiniais, epigenetinio reguliavimo praturtinimo analizė. **(a)** priskirtų top 10 biologinių procesų GO terminų; **(b)** priskirtų top 10 KEGG signalinių kelių. Akt – baltymų kinazė B; FoxO – *forkhead box* baltymas O; HIF1 – hipoksijos sukeltas veiksnys 1; GO – genų ontologija; KAD – klaidingų atradimų dažnis; KEGG – Kioto genų ir genomo enciklopedija; PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinazė; VEGF – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys.

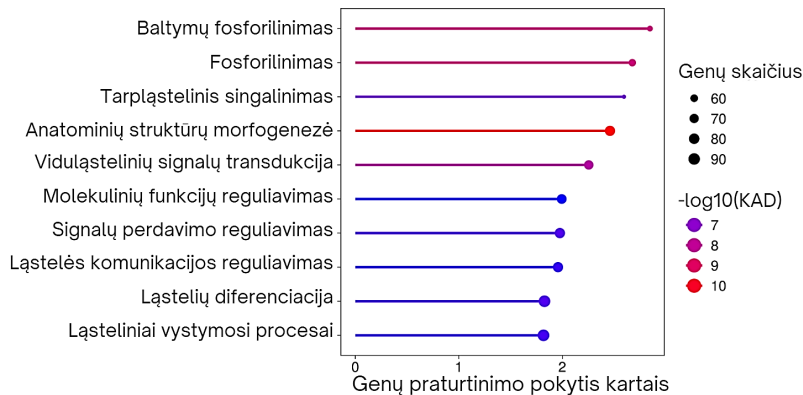
Buvo atskleista, jog miRNR, kurių raiška didesnė, epigenetiškai reguliuoja tokius biologinius procesus (3.8 pav., a) kaip vystymosi reguliavimas bei medžiagų apykaitų procesai per tokius signalinius kelius kaip VEGF ir HIF, PI3K-Akt, FoxO ir nuo progesterono priklausomas kiaušialąsčių brendimas, kurie yra susiję su angiogeneze ir oksidaciniu stresu, folikulų bei kiaušialąsčių aktyvacija ar brendimu. Didesnė šių miRNR raiška rodo, jog šie signaliniai keliai bei biologiniai procesai gali būti supresuojami.

Analizuojant miRNR, kurių raiška mažesnė, parodyta, jog jos gali epigenetiškai reguliuoti vystymosi bei diferenciacijos procesus, taip pat baltymų fosforilavimo ir signalų perdavimo procesus per tokius signalinius kelius kaip MAPK, glaudžiųjų jungčių, augimo hormonų bei endokrininio ir insulino rezistentiškumo, kurie yra būtini kiaušidžių funkcijoms atlikti, tokioms kaip jautrumas hormonams, padidėjęs metabolinis aktyvumas, signalų perdavimas tarp folikulo ląstelių. Šių miRNR mažesnė raiška labiau atspindi KA skirtumus nuo krūties audinio nei užšaldymo / atšildymo proceso poveikio.

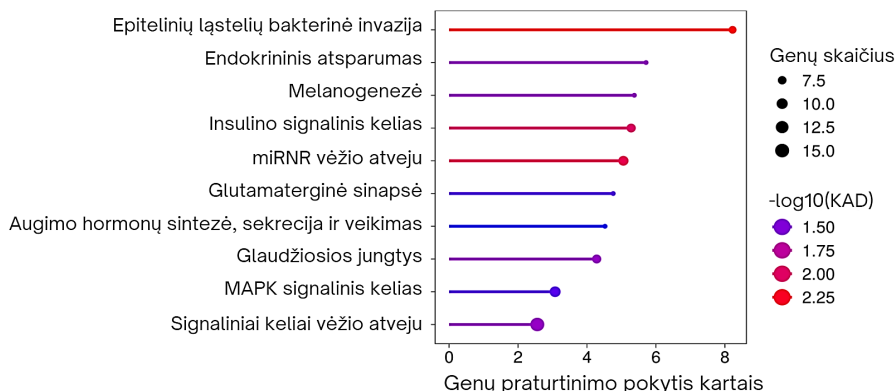
Šis visapusiškas KA histologinis (3.1 pav., 3.2 pav.), imunohistocheminis (3.3 pav.), transplantato prigijimo (3.4 pav.) bei molekulinis (3.5 pav. ir P4 pav.) įvertinimas rodo, jog mūsų vertintas audinių užšaldymo protokolas yra efektyvus ir saugus – KA išsaugo gyvybingumą ir

audinio vientisumą, papildomų žalingų pažeidimų audiniui nesukeliama. Toks lėto užšaldymo / greito atšildymo protokolas gali būti naudojamas ne tik mokslinių tyrimų metu, bet ir klinikinėje vaisingumo išsaugojimo tikslais praktikoje.

a



b



3.8 pav. Kiaušidžių audinyje nustatytų miRNR, kurių raiška mažesnė (raiškos pokytis kartais > 2 , $p < 0,05$) lyginant su kontroliniais audiniais, epigenetinio reguliavimo praturtinimo analizė. **(a)** priskirtų top 10 biologinių procesų GO terminų; **(b)** priskirtų top 10 KEGG signalinių kelių. GO – genų ontologija; KAD – klaidingų atradimų dažnis; KEGG – Kioto genų ir genomo enciklopedija; MAPK – mitogenais aktyvinama baltymų kinazė.

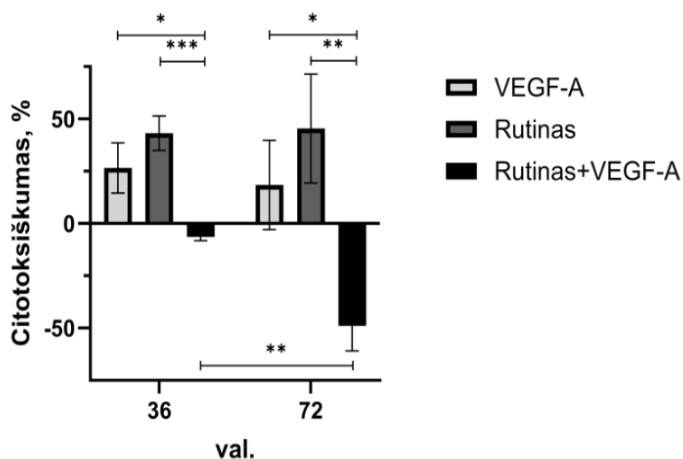
3.2. Kiaušidės audinių *in vitro* aktyvacijos prieš ksenotransplantaciją įvertinimas

Toliau, remiantis gautais *in silico* analizės rezultatais ir kitų tyrėjų atliktais ksenotransplantacijos darbais (1.3.2. poskyris), buvo siekiama išsiaiškinti, kokį poveikį KA *in vitro* kultūrai (audinių aktyvacijai) turi augimo veiksnys VEGF-A (V), antioksidantas rutinas (R) ar jų abiejų derinys (V+R) veikiant

jais KA prieš ksenotransplantaciją. Siekiant išsirinkti geriausią terpės sudėtį, buvo atliktas *in vitro* citotoksiškumo bei hormono progesterono nustatymas. Antrojo ksenotransplantacijos tyrimo metu buvo vertinama šių komponentų įtaka vaskuliarizacijai bei genų, susijusių su folikulogeneze, audinio pažaidomis ir audinio struktūros vientisumu, raiškiai.

3.2.1. *In vitro* aktyvacijos sukulto audinių citotoksiškumo ir steroidogenezės atnaujinimo įvertinimas

Šiame tyrime buvo matuojamas LDH aktyvumas ir progesterono kiekis KA kultūros terpėse dviejuose laiko taškuose – 36 val. ir 72 val. Šiais matavimais buvo siekiama įvertinti KA gyvybingumą bei gebėjimą gaminti ir sekretuoti hormonus *in vitro* kultūrose su skirtingomis terpių sudėtimis po užšaldymo / atšildymo. Kontrolinė terpė buvo standartinė KA *in vitro* kultūros terpė (sudėtis 2.5.3. poskyriuje), eksperimentinės terpės: standartinė KA *in vitro* kultūros terpė praturtinta 1 µg/ml rutinu arba 50 ng/ml VEGF-A, arba 50 ng/ml VEGF-A ir 1 µg/ml rutino (V+R) deriniu.

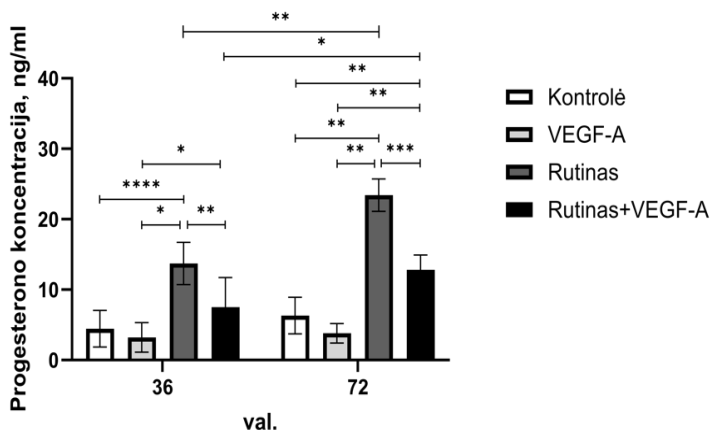


3.9 pav. Kiaušidės audinio gyvybingumo įvertinimas *in vitro* kultūroje. LDH aktyvumo palyginimas tarp skirtingai praturtintų *in vitro* kultūros terpių lyginant su standartine *in vitro* kultūros terpe (n = 8 visose grupėse). Duomenys pateikti kaip vidurkis ± SEM. LDH – laktato dehidrogenazė; R – rutinas; SEM – standartinė vidurkio paklaida; V – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A (VEGF-A). Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Pažeistų ląstelių išskiriamų citoplazminių fermentų aktyvumo matavimas yra vertingas metodas audinio ląstelių žūčiai įvertinti. Šiuo tikslu, siekiant pademonstruoti audinių gyvybingumą, buvo matuojamas LDH aktyvumas *in vitro* kultūros terpėse. Iš 3.9 pav. matome, jog abiejuose laiko taškuose KA kultūrose tik su rutinu arba VEGF-A citotoksiškumas buvo stipresnis

(teigiamos vertės) nei kontrolinėje (standartinėje) terpėje, o KA V+R *in vitro* kultūros terpėje, citotoksiškumas buvo silpnesnis (neigiamos vertės). Nors rezultatai varijavo, potencialiai, dėl audinių heterogeniškumo, reikšmingų išskirčių nenustatyta. Pavyzdžiui, rutino grupėje 36 val. išsibarstymas buvo nuo -16 % iki 83 %, o 72 val. nuo -38 % iki 79 %, rezultatai pateikiami kaip vidurkis $\pm$ SEM.

Atliekant palyginimus tarp grupių, buvo nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai abiejuose laiko taškuose tarp rutino ir V+R grupių (36 val. $43 \% \pm 8 \%$ vs $-6 \% \pm 1 \%$, $p = 0,0006$, 72 val. $38 \% \pm 26 \%$ vs $-42 \% \pm 12 \%$, $p = 0,006$, atitinkamai) bei VEGF-A ir V+R grupių (36 val. $27 \% \pm 12 \%$ vs $-6 \% \pm 1 \%$, $p = 0,028$, 72 val. $16 \% \pm 21 \%$ vs $-42 \% \pm 12 \%$, $p = 0,039$, atitinkamai), tačiau nenustatyti reikšmingi skirtumai tarp rutino bei VEGF-A grupių. Be to, tik V+R grupėje nustatytas statistiškai reikšmingas citotoksiškumo sumažėjimas lyginant 36 val. bei 72 val. matavimus ($-6 \% \pm 1 \%$ vs $-42 \% \pm 12 \%$, $p = 0,002$, atitinkamai).



3.10 pav. Kiaušidės audinio steroidogenezės įvertinimas *in vitro* kultūroje. Progesterono koncentracijos palyginimas tarp skirtingai praturtintų *in vitro* kultūros terpių. Duomenys pateikti kaip vidurkis $\pm$ SN. R – rutinas; SN – standartinis nuokrypis; V – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A (VEGF-A). Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

GL ir TL aktyvumą galima įvertinti pagal jų gebėjimą sintetinti ir sekretuoti progesteroną. Iš 3.10 pav. matome, jog visose *in vitro* kultūros terpėse progesterono koncentracija didėjo su laiku bei abiejuose laiko taškuose nustatytos didžiausios šio hormono koncentracijos tendencijos nekito ir išsidėstė taip: rutinas > V+R > kontrolinė > VEGF-A grupė. Lyginant hormono koncentracijas tarp visų grupių po 36 val., buvo nustatyta reikšmingai didesnė koncentracija rutino grupėje lyginant su VEGF-A

(13,7 ng/ml $\pm$ 3,0 ng/ml vs 3,2 ng/ml $\pm$ 2,1 ng/ml, $p = 0,008$), kontroline (13,7 ng/ml $\pm$ 3,0 ng/ml vs 4,4 ng/ml $\pm$ 2,6 ng/ml, $p = 0,0001$) ir V+R (13,7 ng/ml $\pm$ 3,0 ng/ml vs 7,5 ng/ml $\pm$ 4,2 ng/ml, $p = 0,007$) grupėmis. Taip pat, V+R grupėje buvo nustatyta reikšmingai didesnė progesterono koncentracija lyginant su VEGF-A grupe ($p = 0,034$).

Po 72 val. vėlgi rutino grupė pasižymėjo statistiškai reikšmingai didesne koncentracija už VEGF-A (23,4 ng/ml $\pm$ 2,3 ng/ml vs 3,8 ng/ml $\pm$ 1,4 ng/ml, $p = 0,002$, atitinkamai), kontroline (23,4 ng/ml $\pm$ 2,3 ng/ml vs 6,3 ng/ml $\pm$ 2,6 ng/ml, $p = 0,001$, atitinkamai) ir V+R (23,4 ng/ml $\pm$ 2,3 ng/ml vs 12,8 ng/ml $\pm$ 2,1 ng/ml, $p = 0,0005$, atitinkamai) grupes, o V+R grupė pranašesnė buvo jau ne tik už VEGF-A (12,8 ng/ml $\pm$ 2,1 ng/ml vs 3,8 ng/ml $\pm$ 1,4 ng/ml, $p = 0,003$, atitinkamai), bet ir kontroline (12,8 ng/ml $\pm$ 2,1 ng/ml vs 6,3 ng/ml $\pm$ 2,6 ng/ml, $p = 0,008$, atitinkamai) grupes. Toliau vertinant pokyčius grupių viduje skirtinguose laiko taškuose – 36 val. vs 72 val., statistiškai reikšmingi skirtumai nustatyti rutino (13,7 ng/ml $\pm$ 3,0 ng/ml vs 23,4 ng/ml $\pm$ 2,3 ng/ml, $p = 0,002$) bei V+R (7,5 ng/ml $\pm$ 4,2 ng/ml vs 12,8 ng/ml $\pm$ 2,1 ng/ml, $p = 0,02$) grupėse, kuriose koncentracija reikšmingai didėjo.

Įvertinus gautuosius rezultatus, ksenotransplantacijos tyrimui buvo pasirinktos standartinė KA *in vitro* kultūros terpė (kontroline grupė) bei standartinė terpė praturtinta 50 ng/ml VEGF-A ir 1 μ g/ml rutinu (V+R) dėl pademonstruoto geriausio audinio gyvybingumo abiejuose laiko taškuose bei atkurtos steroidogenezės. Kadangi ženkliai padidėjusi progesterono koncentracija gali būti ir priešlaikinės augančių folikulų žūties požymis, buvo pasirinkta 36 val. KA *in vitro* kultūra prieš antrąjį ksenotransplantacijos tyrimą.

3.2.2. Kiaušidės audinio *in vitro* aktyvacijos prieš ksenotransplantaciją poveikis revaskuliarizacijai

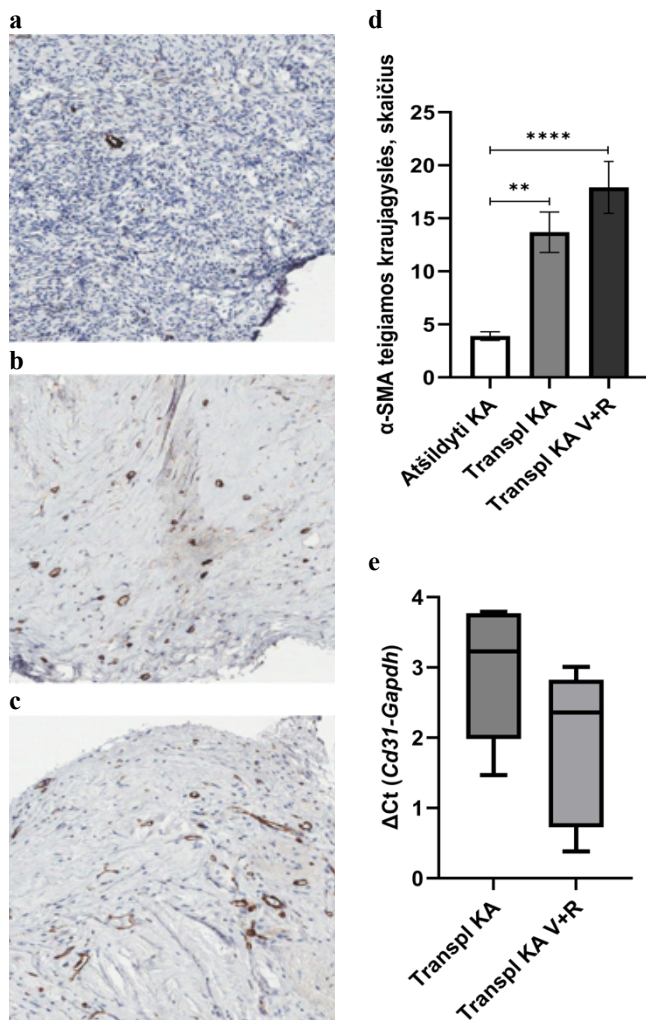
Atsirinkus terpes, kurios toliau buvo naudojamos 36 val. KA aktyvacijai *in vitro* prieš ksenotransplantaciją (3.3.1. poskyris), buvo atrinkti ir atšildyti 10 skirtingų moterų reprodukciniai audiniai. Šie audiniai buvo padalinti pusiau ir išskirstyti į dvi grupes ($n = 10$) *in vitro* kultūroms – standartinėje kultūros terpėje ir praturtintoje V+R kultūros terpėje. Po 36 val. *in vitro* kultivacijos KA buvo ksenotransplantuoti į 10 imunodeficitinių pelių (po du KA gabalėlius į pelės poodį) 28 d. Visi transplantuoti KA sėkmingai prigijo, o išpreparavus transplantatus, jie buvo panaudoti imunohistologiniam bei genų raiškos tyrimams.

Po ksenotransplantacijos, apie 1/3 audinio buvo skirta imunohistologiniam žmogaus subrendusių kraujagyslių – α -SMA – įvertinimui (3.11 pav., b-c). Taip pat buvo α -SMA nudažyti ir kontroliniai audiniai – tik atšildyti KA (3.11 pav., a). α -SMA teigiamos kraujagyslės buvo suskaičiuotos audinio periferijoje norint įvertinti funkcionalaus ir subrendusio kraujagyslių tinklo tarp transplantato ir šeimininko atkūrimą. Nors iš nuotraukų (3.11 pav., b-c) matome, jog abiejuose transplantuotų KA grupėse subrendusių kraujagyslių periferijoje nusidažė nemažai, V+R grupėje jos pasižymėjo didesniu diametru (įvertinta tik vizualiai). Gauti duomenys buvo plačiai išsibarstę, bet reikšmingų išskirčių nerasta. Kontroliniuose transplantuotuose KA kraujagyslių buvo aptinkama nuo 5 iki 28, o transplantuotuose KA V+R nuo 5 iki 46, todėl duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ SEM. Lyginant suskaičiuotas kraujagysles (3.11 pav., d), statistškai reikšmingai daugiau jų buvo aptikta abiejose transplantuotose KA grupėse nei atšildytuose – atšildyti KA vs kontroliniai transplantuoti KA ($4 \pm 0,4$ vs 14 ± 2 , $p = 0,003$) ir atšildyti KA vs transplantuoti KA V+R ($4 \pm 0,4$ vs 18 ± 3 , $p < 0,0001$). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp transplantuotų KA grupių nebuvo nustatyta ($p = 0,289$), tačiau vidutiniškai daugiau (18 vs 14) subrendusių kraujagyslių buvo nustatyta V+R transplantuotų KA grupėje.

Ksenotransplantacijos atveju reikėtų nepamiršti, jog sėkmingai atkurta kraujagyslių sistema transplantate turi turėti ne tik žmogaus, bet ir pelės žymenų. Tad kitas įvertintas atkurtos vaskuliarizacijos žymuo buvo pelės *Cd31* (3.11 pav., e), kitaip žinomas kaip trombocitų endotelio ląstelių adhezijos molekulė. *Cd31* baltymas gali būti aptinkamas tiek ankstyvosiose, tiek subrendusiose kraujagyslėse, todėl šį baltymą koduojančio geno raiškos įvertinimas KA parodo bendrą šeimininko kraujagyslių invaziją į transplantatą viso transplantacijos periodo metu.

3.11 pav., e grafike *Cd31* geno raiška yra normalizuota (Δ Ct) pagal pelės *Gapdh*. Transplantuotų KA V+R grupėje buvo nustatyta žemesnė Δ Ct *Cd31* geno raiškos vertė – Δ Ct mediana 2,3 ciklo, o kontrolinėje transplantuotų KA grupėje – 3,2 ciklo. Tai rodo, jog transplantuotų KA V+R grupėje beveik vienu amplifikacijos ciklu anksčiau nustatyta *Cd31* geno raiška, vadinasi, šioje grupėje yra daugiau *Cd31* geno transkriptų.

Iš šių atkurtos hibridinės vaskuliarizacijos rezultatų galime daryti išvadą, jog standartinės KA *in vitro* kultūros praturtinimas VEGF-A bei rutinu, nors ir neturėjo statistškai reikšmingos įtakos lyginant su standartinė *in vitro* kultūros terpe, pasižymėjo geresne vaskuliarizacija (nustatytas didesnis skaičius žmogaus subrendusių kraujagyslių) (3.11 pav., d) ir didesniu pelės *Cd31* geno transkriptų kiekiu (3.11 pav., e).

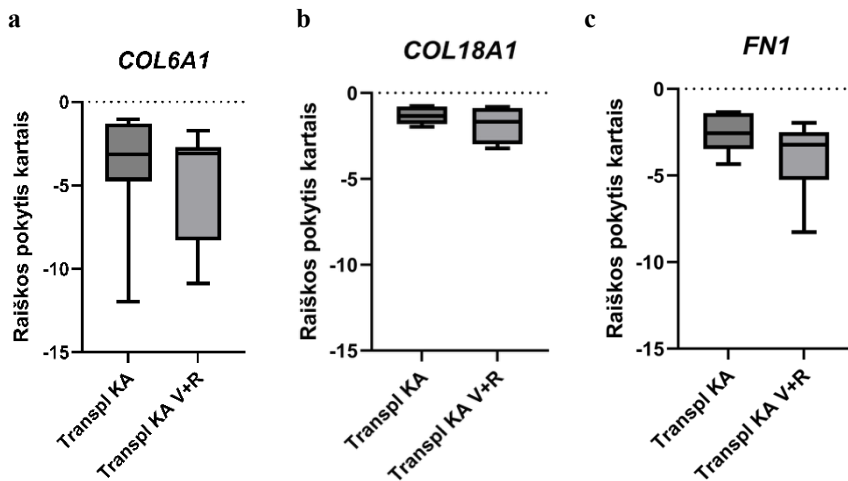


3.11 pav. Vaskuliarizacijos kiaušidės audiniuose (KA) po 28 dienų ksenotransplantacijos įvertinimas. Reprzentacinės α -SMA dažytų kraujagyslių nuotraukos **(a)** atšildytuose KA, **(b)** transplantuotuose ir *in vitro* kontrolinėje terpėje aktyvuotuose KA (Transpl KA), **(c)** transplantuotuose ir *in vitro* praturtintoje VEGF-A su rutinu (Transpl KA V+R) terpėje aktyvuotuose KA. Nusidažiusios kraujagyslės yra rudos spalvos. Priartinimas $\times 10$; **(d)** kiekybinis α -SMA kraujagyslių audinio periferijoje (0-500 μ m) įvertinimas atšildytuose KA, transplantuotuose ir *in vitro* kontrolinėje terpėje aktyvuotuose KA bei transplantuotuose ir *in vitro* praturtintoje V+R terpėje aktyvuotuose KA. Kiekvieno audinio ($n = 5$ atšildytų KA ir $n = 10$ abiejose transplantuotų KA grupėse) analizuoti trys atsitiktinai pasirinkti regos laukai. Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ SEM; **(e)** pelės $Cd31$ geno normalizuotos raiškos (ΔCt) verčių palyginimas po ksenotransplantacijos. Rezultatai pateikti stačiakampe diagrama, mediana $\pm$ IKR, ūsai – mažiausia ir didžiausia vertė. Ct – amplifikacijos ciklas; IKR – interkvartilinis regionas; KA – kiaušidės audiniai; R – rutinas; SEM – standartinė vidurkio paklaida; V – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A (VEGF-A). Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti: ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

3.2.3. Kiaušidės audinio *in vitro* aktyvacijos prieš ksenotransplantaciją poveikis genų, susijusių su folikulogeneze, audinio vientisumo išlaikymu ir pažaidomis, raiškai

Nustačius sėkmingą hibridinio kraujagyslių tinklo atkūrimą abiejose transplantuotų KA grupėse (V+R grupėje nežymiai geresnį), toliau buvo siekiama nustatyti ar *in vitro* terpės prieš ksenotransplantaciją praturtinimas V+R turėjo įtakos ir kitiems biologiniams procesams – audinio vientisumo išlaikymui, folikulogenezei ir audinio pažaidoms. Dėl gautų duomenų heterogeniškumo, jie pateikiami kaip mediana [IKR] (interkvartilinis regionas).

Sėkmingas audinio vientisumo atkūrimas po transplantacijos yra esminis veiksnys, po vaskuliarizacijos, leidžiantis išsaugoti audinio funkcijas ir brandinti folikulus. Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp trijų analizuotų struktūrinių genų – *kolageno VI*, *kolageno XVIII* ir *fibronektino 1* – raiškos pokyčio medianų, po ilgalaikės ksenotransplantacijos, nustatyta nebuvo. Kolagenas VI yra labiausiai paplitęs užląstelinio matrikso baltymas kiaušidės audinyje, tad šio geno raiškos pokyčiai gali parodyti bendrą KA vientisumą.



3.12 pav. Kiaušidės audinio vientisumo išsaugojimo po 28 dienų ksenotransplantacijos įvertinimas. Užląstelinio matrikso komponentų – (a) *kolageno VI* (*COL6A1*), (b) *kolageno XVIII* (*COL18A1*) ir (c) *fibronektino* (*FN1*) genų raiškos transplantuotuose ir *in vitro* standartinėje terpėje aktyvuotuose KA (Transpl KA) bei transplantuotuose ir *in vitro* praturtintoje V+R terpėje aktyvuotuose KA (Transpl KA V+R). Rezultatai pateikti stačiakampe diagrama, mediana $\pm$ IKR, ūsai – mažiausia ir didžiausia vertė. IKR – interkvartilinis regionas; KA – kiaušidės audiniai; R – rutinas; V – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A (VEGF-A).

Kaip matome iš 3.12 pav., a, nustatyta sumažėjusi *kolageno VI* geno raiška abiejose transplantuotų KA grupėse buvo -3,1 karto. Taip pat matome,

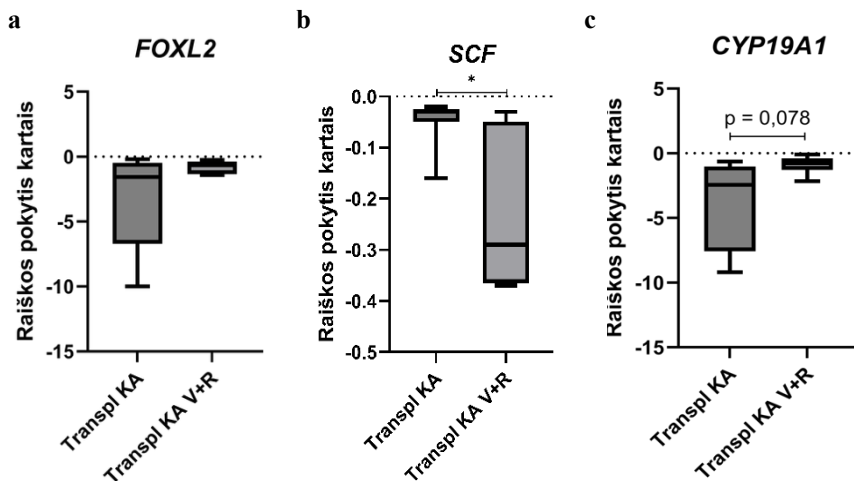
jog *kolageno XVIII* (3.12 pav., b), kuris yra senstančių kiaušidžių žymuo, raiškos pokyčių skirtumas tarp abiejų transplantuotų KA grupių nebuvo didelis (-1,3 [-1,8 – -0,8] karto vs -1,6 [-3,0 – -0,8] karto) bei artimas šio geno raiškai, nustatytai atšildytuose KA (atšildytų KA genų raiška naudota transplantuotų KA genų raiškos normalizavimui, tad atšildytų KA raiška yra lygi 1). Kitas žymuo, kuris galėtų parodyti ar audinyje įvyko ilgalaikiai užląstelinio matrikso struktūriniai pokyčiai – fibronektinas 1 (FN1). Šio geno raiškos reikšmingi skirtumai nebuvo nustatyti tarp kontrolinių transplantuotų KA ir V+R KA grupių (-2,6 [-3,5 – -1,4] karto vs -3,2 [-5,2 – -1,9] karto, atitinkamai) (3.12 pav., c), o raiškos sumažėjimas koreliuoja su *kolageno VI* geno raiškos sumažėjimu, kuris galėtų būti paaiškinamas kaip natūralus audinio dydžio sumažėjimas transplantacijos metu.

Toliau buvo tikrinami pradinės vystymosi stadijos, pirminių bei antrinių folikulų žymenys. *FOXL2* yra būdingas tik užuomazginiams ir tarpiniams folikulams, tad šio geno raiškos pokytis gali parodyti šių folikulų kiekio sumažėjimą lyginant tiek su kontroline transplantuotų KA grupe, tiek su atšildytais KA. Iš 3.13 pav., a matome, jog *FOXL2* geno raiškos sumažėjimas nėra statistiškai reikšmingas tarp transplantuotų KA grupių – medianos -1,6 [-6,7 – -0,5] kartai vs -0,7 [-1,4 – -0,4] kartai (V+R KA vs kontroliniai KA, atitinkamai), tačiau V+R grupėje šio geno raiškos sumažėjimas nesiekia nei 2-jų kartų, o kontroliniuose transplantuotuose KA mažiau nei 3 kartus lyginant su atšildytais KA, todėl galima daryti išvadą, kad V+R grupėje yra išsaugotas didesnis skaičius šių pradinės vystymosi stadijos folikulų. Taip pat, V+R grupėje šio geno raiškos pokytis pasižymėjo mažesne variacija lyginant su KA, aktyvuotuose standartinėje *in vitro* kultūros terpėje, prieš ksenotransplantaciją (mažiausia – didžiausia vertė: -1,4 – -0,2 karto vs -10 – -0,2 karto, atitinkamai).

Kiti du tirti genai – vystymosi į aukštesnės vystymosi stadijos folikulus žymenys aromatazė (*CYP19A1*) ir kamieninių ląstelių veiksnys (*SCF*). Abiejų šių genų raiška nustatoma folikulų kuboidinėse grūdėtose ląstelėse. *SCF* dalyvauja užuomazginių folikulų aktyvacijoje, vystymosi iki pirminio folikulo bei TL pritraukimo procesuose. Nustatytas *SCF* geno raiškos pokyčio skirtumas KA aktyvuotuose prieš ksenotransplantaciją standartinėje *in vitro* terpėje -0,03 [-0,05 – -0,02] karto vs V+R KA grupės -0,3 [-0,4 – -0,05] karto ($p = 0,02$) yra statistiškai reikšmingas, tačiau toks mažas, kad net baltymo lygmeny skirtumai nebūtų aptikti nei tarp transplantuotų KA grupių, nei nuo atšildytų KA (3.13 pav., b). Taip pat, buvo nustatytas *CYP19A1* geno, aptinkamo antriniuose folikuluose, raiškos sumažėjimas abiejose transplantuotų KA grupėse (3.13 pav., c), tačiau V+R grupės KA pasižymėjo stabilesne geno raiškos variacija (mažiausia – didžiausia vertė: -2,2 – -0,1

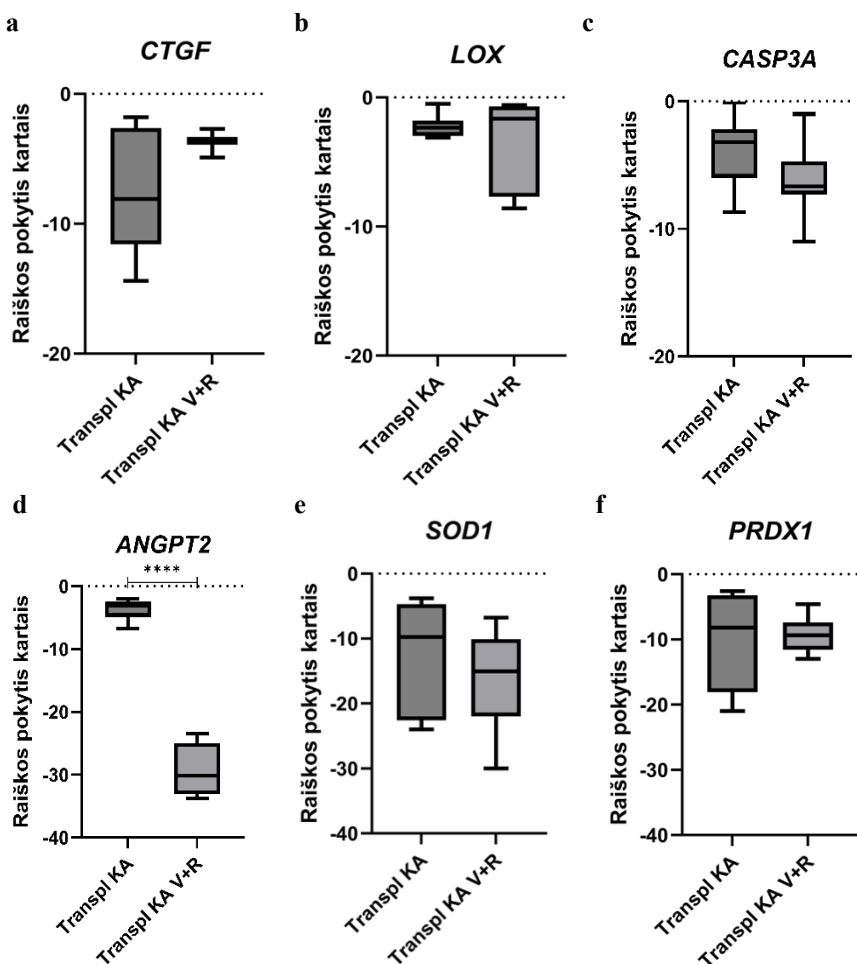
kartais vs -9,2 – -0,6 kartais), bei mažesniu jos sumažėjimu (-0,8 [-1,3 – -0,4] karto vs -2,5 [-7,6 – -1,0] karto, $p = 0,078$).

Šie folikulų genų raiškos rezultatai rodo, jog V+R praturtintoje *in vitro* kultūros terpėje aktyvuoti KA prieš ksenotransplantaciją yra išsaugotas nors ir nereikšmingas, bet didesnis kiekis užuomazginių, tarpinių (3.13 pav., a) ir antrinių folikulų (3.13 pav., c).



3.13 pav. Su folikulai ir jų vystymusi susijusių genų raiškos įvertinimas po 28 dienų ksenotransplantacijos. Užuomazginių folikulų – (a) transkripcijos veiksnys *FOXL2* – bei aukštesnės vystymosi stadijos folikulų – (b) kamieninių ląstelių veiksnio (*SCF*) ir (c) aromatazės (*CYP19A1*) genų raiškos transplantuotuose ir *in vitro* standartinėje terpėje aktyvuotuose KA (Transpl KA) bei transplantuotuose ir *in vitro* praturtintoje V+R terpėje aktyvuotuose KA (Transpl KA V+R). Rezultatai pateikti stačiakampe diagrama, mediana $\pm$ IKR, ūsai – mažiausia ir didžiausia vertė. IKR – interkvartilinis regionas; KA – kiaušidės audiniai; R – rutinas; V – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A (VEGF-A). Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti: * $p < 0,05$.

Ksenotransplantaciniu periodu, iki kol atkurama kraujotaka, taip pat audinyje vyksta įvairūs pažaidų atsiradimai, kurie su laiku atsistato arba audinyje palieka pažaidas, kurios gali turėti įtakos audinio vientisumo atstatymui bei folikulų išgyvenamumui. Kelių tirtų genų (*CTGF* ir *LOX*), susijusių su Hippo signaliniu keliu ir užląstelinio matrikso modifikavimu, raiškos pokyčiai atskleidė šių genų transkripcijos sumažėjimą abiejuose transplantuotų KA grupėse (3.14 pav., a-b), kurie koreliuoja ir su *fibronektino 1* ir *kolageno VI* raiškos sumažėjimais. Toliau buvo tiriamos *kaspazės 3A* (*CASP3A*), *superoksido dismutazės 1* (*SOD1*) ir *peroksiredoksino 1* (*PRDX1*), susijusių su ląstelių pažaidomis, raiškos.



3.14 pav. Kiaušidės audinio pažeidų po 28 dienų ksenotransplantacijos įvertinimas. Audinio ir ląstelių pažeidų – fibrozės ((a) jungiamojo audinio augimo veiksnio, *CTGF* ir (b) lisiloksidazės, *LOX*)), apoptozės ((c) kaspazės 3A, *CASP3A*), uždegiminių procesų ((d) angiopoetino, *ANGPT2*) ir oksidacinio streso ((e) superoksido dismutazės, *SOD1* ir (f) peroksiredoksino, *PRDX1*) genų raiškos transplantuotuose ir *in vitro* standartinėje terpėje aktyvuotuose KA (Transpl KA) bei transplantuotuose ir *in vitro* praturtintoje V+R terpėje aktyvuotuose KA (Transpl KA V+R). Rezultatai pateikti stačiakampe diagrama, mediana ± IKR, ūsai – mažiausia ir didžiausia vertė. IKR – interkvartilinis regionas; KA – kiaušidės audiniai; R – rutinas; V – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A (VEGF-A). Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti: **** p < 0,0001.

Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp transplantuotų KA grupių nebuvo nustatyta, tačiau jų raiškos sumažėjimas, lyginant su atšildytais KA, buvo didelis – *CASP3A* geno raiškos pokytis kartais kontrolinėje transplantuotų KA grupėje buvo apie 5 kartus, o V+R KA grupėje 8 kartai (3.14 pav., c), *SOD1*

9,8 [-22,6 – -4,7] kartų vs 15,0 [-22,0 – -10,1] kartų, atitinkamai (3.14 pav., e) bei *PRDX1* geno raiškos sumažėjimas buvo apie 9 kartus abiejose grupėse (3.14 pav., f). Vienintelis genas, kurio raiškos pokytis buvo statistiškai reikšmingas ($p < 0,0001$) tarp transplantuotų KA grupių, buvo *angiopoetinas 2* (*ANGPT2*). *Angpt2* gali dalyvauti ankstyvojoje kraujagyslių invazijoje ir susidaryme, hipoksijos, kraujagyslių destabilizacijos ir uždegiminiuose procesuose. Šio geno raiška kontrolinėje transplantuotų KA grupėje buvo net 27 kartus didesnė lyginant su V+R KA grupe (3.14 pav., d).

Šie genų raiškos rezultatai rodo, jog *in vitro* kultūros terpės praturtinimas prieš ksenotransplantaciją neturi reikšmingos įtakos audiniams, tačiau demonstruoja nežymų pranašumą apsaugant audinio struktūrą (3.12 pav.) bei įvairios vystymosi stadijos folikulus (3.13 pav.) nuo pažaidų (3.14 pav.).

3.3. Dirbtinės kiaušidės modelių konstravimas *in vitro*

Iš anksčiau aprašyto poskyrio (1.2.3.) apie navikinių ląstelių aptikimą KA matome, jog KA yra užšaldomi ne tik pacientėms, kurioms nustatyta maža piktybinių ląstelių infiltracijos rizika, bet ir didelės rizikos pacientėms (hematologiniai navikai, neuroblastoma ir Juingo sarkoma), tad tokioms pacientėms yra reikalinga tobulinti kitokias vaisingumo atkūrimo strategijas (1.3.3. poskyris). Todėl šiame disertacijos darbe buvo atliekamas 3D struktūrų konstravimas – dirbtinių kiaušidžių modeliai.

3.3.1. Užuomazginių ir pirminių folikulų išskyrimas bei inkapsuliacija į alginato lašelius

Iš 18 atšildytų KA žievės fragmentų buvo išskirti 407 užuomazginiai bei pirminiai folikulai iš kurių 382 panaudoti dirbtinių kiaušidžių konstravimui (3.1 lentelė). Išskirtų folikulų vidutinis diametras buvo $40,8 \mu\text{m} \pm 9,9 \mu\text{m}$.

3.1 lentelė. Eksperimento dizainas. Folikulų inkapsuliacija ir paskirstymas į *in vitro* brandinimo grupes.

Išskyrimas	Folikulų skaičius*	Vid. folikulų dydis, μm	Folikulų skaičius AL	Paruoštų AL skaičius	AL / šulinėlyje	Šulinėliai / grupėje
Nr. 1	60	$44,7 \pm 11,6$	10	6	3	1
Nr. 2	89	$39,2 \pm 6,8$	8–9	10	2–3	2
Nr. 3	40	$44,3 \pm 9,7$	10	4	2	1
Nr. 4	18	$42,1 \pm 13,2$	9	2	1	1
Nr. 5	175	$37,7 \pm 10,1$	8–10	18	3	3

*inkapsuliuotų folikulų skaičius, kuris buvo panaudotas *in vitro* brandinimo eksperimente (be 25-ių folikulų, kurie buvo panaudoti d0 gyvybingumo įvertinimui). AL – alginato lašelis.

Didžiąją dalį – 97 % – sudarė 30–50 µm dydžio folikulai (370/382), o likusius 3 % (12/382) sudarė pirminiai folikulai. Šie folikulai buvo padalinti į grupes, auginimui ant kaSL monosluoksnio arba be jo, ir inkapsuliuoti į alginato lašelius, taip sukonstruojant dirbtinės kiaušidės 3D modelius.

3.3.2. Folikulų gyvybingumo įvertinimas dirbtinės kiaušidės modeliuose

Folikulų gyvybingumas po išskyrimo (d0) siekė 96 % (24/25) (3.2 lentelė). Taip pat buvo įvertintas 87-ių (47 ant kaSL ir 40 be kaSL) įvairios stadijos folikulų gyvybingumas po 7 kultivavimo dienų (d7) *in vitro* kultūroje (3.2 lentelė). Išanalizavus fluorescuojančiais dažais nudažytus folikulus (2.3 pav.), skirtinguose dirbtinės kiaušidės modeliuose, buvo nustatyta, kad reikšmingų skirtumų tarp modelių – augintų ant ar be kaSL monosluoksnio – gyvybingumo nėra ($p = 0,265$).

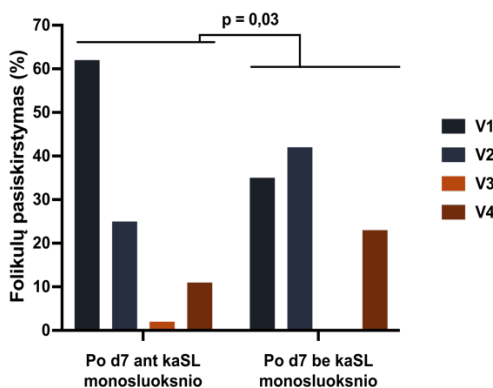
3.2 lentelė. Folikulų gyvybingumo pasiskirstymas dirbtinės kiaušidės modeliuose. Gyvybingumas įvertintas prieš *in vitro* kultūrą (d0) bei 7-ą dieną (d7). V1/V2: gyvybingi/gyvybingi, minimaliai pažeisti folikulai; V3/V4: vidutiniškai pažeisti/žuvę folikulai. kaSL – kiaušidės audinio stromos ląstelių monosluoksnis.

Folikulų klasifikacija	d0	d7	
		Ant kaSL	Be kaSL
Gyvybingi (V1+V2)	96 %	87 %	77 %*
	(24/25)	(41/47)	(31/40)
Pažeisti/žuvę (V3+V4)	4 %	13 %	23 %*
	(1/25)	(6/47)	(9/40)

*nurodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp d0 ir d7 ($p < 0,05$).

Toliau, palyginus su d0 folikulais, nustatyta, jog gyvybingų ir žuvusių folikulų pasiskirstymas dirbtinės kiaušidės modelyje be kaSL buvo statistiškai reikšmingai ($p = 0,043$) pakitęs – ženkliai padidėjusi pažeistų / žuvusių ir sumažėjusi gyvybingų folikulų dalis, tačiau folikulai, auginti ant kaSL monosluoksnio, tokio ženklaus gyvybingų folikulų sumažėjimo nepatyrė ($p = 0,225$) (3.2 lentelė).

Atliekant folikulų pasiskirstymo atskirose V1, V2, V3 ir V4 gyvybingumo kategorijose (2.3 pav.) analizę, buvo nustatyti reikšmingi skirtumai ($p = 0,03$) po 7 dienų kultivavimo *in vitro* tarp abiejų dirbtinės kiaušidės modelių (3.15 pav.). Aukščiausios – V1 – gyvybingumo kategorijos folikulų buvo aptikta net 1,8 karto daugiau, o V4 – žuvusių – kategorijos folikulų 2 kartus mažiau dirbtinės kiaušidės modelyje ant kaSL monosluoksnio.

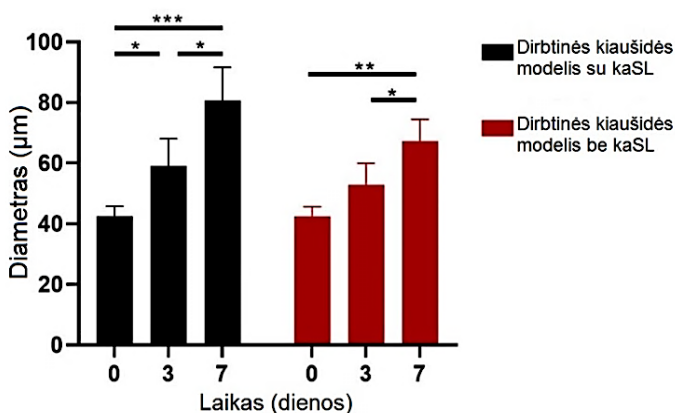


3.15 pav. Skirtingų folikulų gyvybingumo kategorijų pasiskirstymas dirbtinės kiaušidės modeliuose po 7 dienų kultivavimo *in vitro*. V1 – gyvybingi, V2 – gyvybingi, minimaliai pažeisti folikulai, V3 – vidutiniškai pažeisti, V4 – žuvę folikulai. kaSL – kiaušidės audinio stromos ląstelės.

3.3.3. Folikulų vystymosi įvertinimas dirbtinės kiaušidės modeliuose

Siekiant įrodyti vieno ar kito dirbtinės kiaušidės modelio pranašumą, buvo įvertintas modelio gebėjimas inicijuoti užuomazginių folikulų vystymąsi į aukštesnės stadijos folikulus. Tai galima atlikti keliais skirtingais įvertinimo būdais – išmatuojant folikulų diametro pokyčius ir priskiriant į skirtingos brandos stadijos folikulus bei įvertinant jų funkcionalumą.

Išskirtų ir 7-ias dienas *in vitro* brandintų folikulų vystymasis panaudojus skirtingus dirbtinės kiaušidės modelius buvo įvertintas invertuotu mikroskopu. Eksperimento pradžioje, 184 folikulai buvo inkapsuliuoti į alginato lašelius ir auginti ant kaSL monosluoksniu, kiti 186 folikulai auginti alginato lašeliuose be kaSL.



3.16 pav. Folikulų diametro augimas dirbtinės kiaušidės modeliuose per 7-ias kultivavimo *in vitro* dienas. kaSL – kiaušidės audinio stromos ląstelės. Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Per 7-ių dienų laikotarpį, abiejose grupėse, buvo stebimas reikšmingas folikulų augimas visomis vertinimo dienomis, išskyrus periodą tarp d0 ir d3 dirbtinės kiaušidės modelyje be kaSL (3.16 pav.). Septintą eksperimento dieną folikulų, augintų ant kaSL monosluoksnio, diametras buvo $80,65 \mu\text{m} \pm 10,98 \mu\text{m}$, kai folikulų, be kaSL, diametras siekė $67,30 \mu\text{m} \pm 7,19 \mu\text{m}$, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo tarp diametrų dydžio nebuvo ($p = 0,07$).

3.3 lentelė. Aktyvių ir neaktyvių folikulų pasiskirstymas prieš ir po kultivavimo *in vitro*. Neaktyvūs folikulai yra ramybės būsenos užuomazginiai folikulai, o aktyvūs yra augantys ir pradėję vystysis (pirminiai/antriniai). kaSL – kiaušidės audinio stromos ląstelės.

	d0		d3		d7	
	Neaktyvūs	Aktyvūs	Neaktyvūs	Aktyvūs	Neaktyvūs	Aktyvūs
Ant kaSL monosl.	96 % (184/191)	4 % (7/191)	70 % (124/177)	30 % ^{1,a} (53/177)	35,5 % (51/144)	64,5 % ^{2,3,c} (93/144)
Be kaSL monosl.	97 % (186/191)	3 % (5/191)	81 % (141/175)	19 % ^{1,b} (34/175)	56 % (84/149)	44 % ^{2,3,d} (65/149)

Statistiškai reikšmingi folikulų (neaktyvių/aktyvių) pasiskirstymo skirtumai grupėse tam tikromis dienomis pažymėti: ^{a,b} $p < 0,05$, ^{c,d} $p < 0,001$, o grupės viduje tam tikromis dienomis pažymėti: ¹d0 vs d3, ²d0 vs d7, ³d3 vs d7, kai $p < 0,0001$.

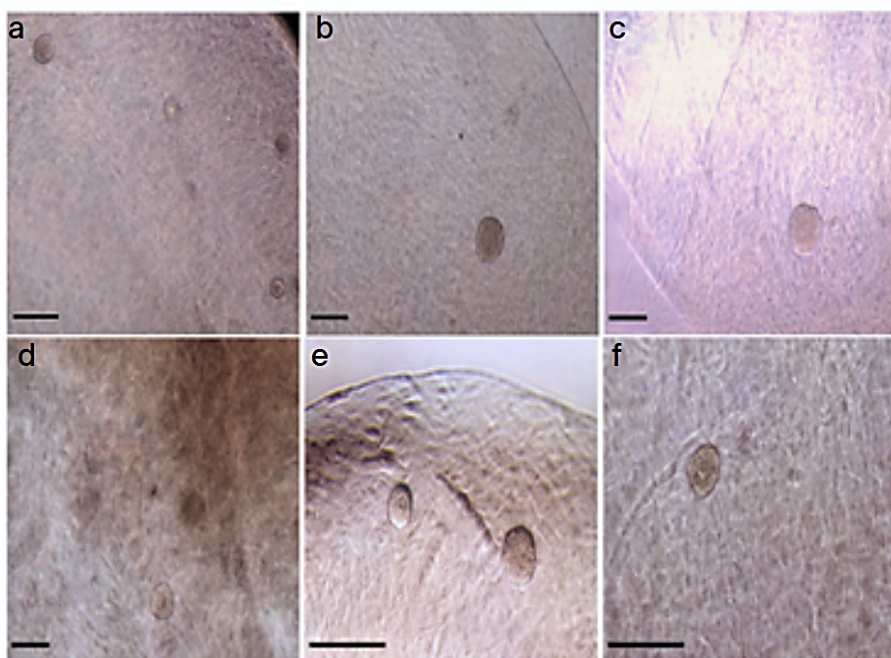
Toliau buvo palygintas užuomazginių/tarpinių (neaktyvių) bei pradėjusių aktyviai vystytis folikulų pasiskirstymas per 7-ias *in vitro* dienas (3.3 lentelė). Visomis vertinimo dienomis aktyvių folikulų skaičius augo abiejų grupių viduje ir buvo nustatyti reikšmingi folikulų (neaktyvių/aktyvių) pasiskirstymo skirtumai ($p < 0,0001$). Negana to, reikšmingai daugiau aktyviai augančių folikulų buvo stebėta tiek po 3-jų ($p < 0,05$), tiek po 7-ių dienų ($p < 0,001$) *in vitro* kultūros dirbtinės kiaušidės modelyje ant kaSL (3.3 lentelė).

Tai rodo, kad didesnis skaičius užuomazginių / tarpinių folikulų pradėjo vystytis į pirminės ar antrinės stadijos folikulus (3.4 lentelė). Trečią *in vitro* kultūros dieną, buvo pastebėta, kad net 23 iš 28 antrinių folikulų, augintų ant kaSL monosluoksnio, buvo ankstyvos / vidurinės stadijos (3.17 pav., a ir e, kairiame kampe), o likę 5 buvo vidurinės / vėlyvos stadijos (3.17 pav., b, d ir f). Palyginimui, visi 13 antrinių folikulų, augintų be kaSL monosluoksnio, buvo ankstyvos / vidurinės stadijos. Septintą *in vitro* kultūros dieną, 48 folikulai, auginti ant kaSL monosluoksnio, buvo ankstyvos / vidurinės, 16 vidurinės / vėlyvos bei 2 vėlyvos stadijos ($170 \mu\text{m}$ ir $200 \mu\text{m}$) antriniai folikulai (3.17 pav., c), o augintų be kaSL, buvo nustatyta 36 ankstyvos / vidurinės, 7 vidurinės / vėlyvos ir vienas vėlyvos stadijos ($170 \mu\text{m}$) antrinis folikulas.

3.4 lentelė. Neaktyvių, pirminių ir antrinių folikulų pasiskirstymas prieš ir po kultivavimo *in vitro*. Neaktyvūs folikulai yra ramybės būsenos užuomazginiai folikulai. kaSL – kiaušidės audinio stromos ląstelės.

d0	Neaktyvūs	Pirminiai	Antriniai
Ant kaSL monosl.	96 % (184/191)	4 % (7/191)	- (0/191)
Be kaSL monosl.	97 % (186/191)	3 % (5/191)	- (0/191)
d3			
Ant kaSL monosl.	70 % (124/177)	14 % (25/177)	16 % ^a (28/177)
Be kaSL monosl.	81 % (141/175)	12 % (21/175)	7 % ^b (13/175)
d7			
Ant kaSL monosl.	35,5 % (51/144)	20 % (29/144)	45,5 % ^c (64/144)
Be kaSL monosl.	56 % (84/149)	14 % (21/149)	30 % ^d (44/144)

Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp užuomazginių, pirminių ir antrinių folikulų pasiskirstymo grupėse tam tikromis dienomis pažymėti: ^{a,b}p < 0,05, ^{c,d}p < 0,001.



3.17 pav. Reprezentacinės skirtingų brandumo stadijų folikulų nuotraukos 7-ą *in vitro* kultūros dieną: užuomazginis (a dešinėje; 60 μm), antrinis ankstyvosios/vidurinės stadijos (a ir e kairėje; abu 90 μm), antrinis vidurinės/vėlyvosios stadijos (b, d, e dešinėje ir f; 150 μm, 110 μm, 130 μm ir 100 μm, atitinkamai) ir antrinis vėlyvosios stadijos folikulas (c; 170 μm). Mastelis 200 μm. kaSL – kiaušidės audinio stromos ląstelės.

Besivystančių folikulų funkcionalumas įvertintas pagal jų gebėjimą gaminti ir sekretuoti hormonus. Vienas jų, pradedamas sekretuoti grūdėtųjų ląstelių jau pirminio folikulo stadijoje, yra estradiolis. Tam buvo surinktos abiejų grupių d7 kultivavimo *in vitro* dienos terpės ir išmatuota joje esanti šio hormono koncentracija. Nustatyta, kad reikšmingai daugiau ($p = 0,006$) estradiolio buvo nustatyta terpėje folikulų, augintų ant kaSL monosluoksnio, palyginus su augintų be kaSL monosluoksnio ($54,1 \pm 14,2$ pg/ml vs $29,9 \pm 4,0$ pg/ml).

Šio tyrimo gauti rezultatai demonstruoja, jog kaSL ne tik padeda išsaugoti daugiau gyvybingų (3.14 pav.), ypač aukščiausios gyvybingumo kategorijos folikulų (3.15 pav.), bet ir folikulai, auginti ant kaSL monosluoksnio, sparčiau auga (3.16 pav.) bei vystosi į funkcionalius pirminius ar antrinius folikulus (3.4 lentelė).

3.4. Šiaurės ir Baltijos šalių vaikų vaisingumo išsaugojimo situacijos įvertinimas

Matant, jog tiek pasaulyje (1.3 skyrius), tiek Lietuvoje (aukščiau aprašyti šio darbo rezultatai) yra plėtojami tyrimai su KA įvairioms vaisingumo išsaugojimo strategijoms įdiegti tiek klinikiname, tiek eksperimentiniame lygmenyse, buvo siekiama išsiaiškinti kokiomis tarptautinėmis / nacionalinėmis gairėmis remiantis pacientai ir jų tėvai yra konsultuojami vaisingumo išsaugojimo tema prieš ar po gydymo, kokie įtraukimo kriterijai bei kokios strategijos yra taikomos Šiaurės-Baltijos regiono šalyse. Šios apklausos dar vienas potencialus tikslas – nustčius skirtumus, harmonizuoti klinikinę praktiką ir standartizuoti gaires, siekiant teikti veiksmingas vaisingumo išsaugojimo paslaugas šiame regione. Bendradarbiaujant su NOPHO, buvo apklausti 23 didžiausi vaikų onkologijos centrai Šiaurės ir Baltijos šalyse, iš kurių 17 (74 %) pateikė atsakymus (3.5 lentelė). Vidutiniškai apklausoje dalyvavę gydytojai onkologai turėjo 17 metų klinikinę patirtį (intervalas: 3–32 metų).

Apklausoje buvo pateikti klausimai, kurie leido susipažinti su patvirtintomis gairėmis, taikomomis vaisingumo išsaugojimo strategijomis, klinikinėmis indikacijomis ir vaikų iki 18 metų konsultavimo principais vaisingumo išsaugojimo tema. Pagrindiniai rezultatai yra pateikti 3.6, 3.7 ir 3.8 lentelėse. Apklausos metu (vykdyta 2022 metų pabaigoje), vienintelės viešai pasiekiamos anglų kalba gairės buvo Šiaurės šalių tinklo rekomendacijos (*Recommendations*, 2015a ir 2015b).

3.5 lentelė. Apklaustų ir pateikusių atsakymus didžiausių vaikų onkologijos centrų skaičius Šiaurės-Baltijos regione 2022 metais.

Šalis	Pateikę atsakymus / visi centrai
Danija	2/4
Estija	1/1
Suomija	3/5
Islandija	1/1
Latvija	1/1
Lietuva	2/2
Norvegija	3/4
Švedija	4/5
Viso	17/23

3.4.1. Vaisingumo išsaugojimo ir konsultavimo gairės

Net 65 % respondentų patvirtino, jog jų šalyje yra patvirtintos nacionalinės vaisingumo išsaugojimo onkologiniams pacientams gairės (3.6 lentelė). Tačiau pažiūrėjus atidžiau, galima pastebėti, jog tose šalyse, kuriose vieni centrai atsakė turintys patvirtintas nacionalines gaires, kiti tos šalies centrai atsakė nežinantys apie jas (pvz., Norvegijoje ir Švedijoje) arba jų neturintys (pvz., Suomija). Taip pat, trys šalys – Estija, Islandija ir Latvija – teigė neturinčios patvirtintų nacionalinių vaisingumo išsaugojimo gairių.

3.6 lentelė. Apklaustų centrų atsakymai apie patvirtintas nacionalines gaires jų šalyje 2022 metais.

Šalis	Yra	Nežinau	Nėra	Visi centrai
Danija	2	-	-	2
Estija	-	-	1	1
Suomija	2	-	1	3
Islandija	-	-	1	1
Latvija	-	-	1	1
Lietuva	2	-	-	2
Norvegija	2	1	-	3
Švedija	3	1	-	4
Viso	11	2	4	17

Nepaisant to, 65 % centrų turi patvirtintas gaires bent vienai ar daugiau vaisingumo išsaugojimo strategijų, kurios, pasak respondentų, remiasi pacientui skirtu gydymu, paciento amžiumi ar kitais kriterijais, tačiau pastebėtas konsensusas, jog visuose centruose spermos bei kiaušialąsčių užšaldymas siūlomas remiantis paciento lytinės brandos stadija (P9 ir P10 lentelės). Vienas vaikų onkologijos centras nurodė, kad sėklidžių audinio užšaldymas yra siūlomas pirmiausiai berniukams iki lytinės brandos, o jaunesnių nei 16 metų mergaičių KA šaldomi tik mokslinių tyrimų tikslais (P9 lentelė). Nors atsakymai variavo, dauguma centrų patvirtino, jog vaisingumo

išsaugojimas atliekamas prieš pradedant gonadotoksinį gydymą, įskaitant hematopoetinių kamieninių ląstelių transplantaciją (HKLT) ir radiacinę apšvitą reprodukcinio audinio srityje, o netgi trys centrai pranešė skiriantys prieš didelį dozių alkilinančių preparatų gavimą (P9 lentelė). Taip pat visi centrai nurodė bendradarbiaujantys su kitais paslaugų tiekėjais dėl vaisingumo išsaugojimo strategijų pritaikymo (3.7 lentelė).

Paklausus apie pacientų diagnozes, kurias nustačius, centruose taikomi lytinių ląstelių ar reprodukcinio audinio užšaldymai, buvo gauti įvairūs atsakymai. Dauguma centrų siūlo vaisingumo išsaugojimo strategijas pacientams, kuriems diagnozuota Hodžkino limfoma (88 %), ne Hodžkino limfoma (82 %), Juingo / minkštųjų audinių sarkoma (82 %), osteosarkoma (82 %) ir pacientai, kuriems taikoma HKLT (88 %) (3.7 lentelė). Mažiau nei pusė centrų siūlo vaisingumo išsaugojimą pacientams, kuriems diagnozuota ūminė limfoblastinė leukemija (45 %), ūminė mieloidinė leukemija (45 %), Vilmsio navikas (35 %) ir lytinių ląstelių navikai (35 %). Be to, du vaikų onkologijos centrai pabrėžė, kad pacientams, sergantiems hematologiniais navikais šios paslaugos nėra taikomos arba tokias atvejais turi būti skirtas ypatingas dėmesys dėl galimos reprodukcinio audinio infiltracijos piktybinėmis ląstelėmis.

3.7 lentelė. Gairių, teisės aktų ir klinikinės praktikos rezultatų apžvalga.

Klausimas	% (centrų skaičius / viso)
Teisės aktai/Gairės	
Pasirinkite, kurios vyrų vaisingumo išsaugojimo strategijos yra taikomos jūsų šalyje:	
Spermos užšaldymas	100 (17/17)
Spermos donorystė	76 (13/17)
Reprodukcinio audinio ekranavimas	65 (11/17)
Sėklidžių audinio šaldymas iki lytinės brandos	47 (8/17)
Įsivaikinimas	35 (6/17)
TESA / PESA	29 (5/17)
Sėklidžių audinio šaldymas po lytinės brandos	18 (3/17)
Pasirinkite, kurios moterų vaisingumo išsaugojimo strategijos yra taikomos jūsų šalyje:	
Kiaušialąsčių užšaldymas	88 (15/17)
Kiaušidžių audinio šaldymas iki lytinės brandos	82 (14/17)
Kiaušidžių audinio šaldymas po lytinės brandos	82 (14/17)
Reprodukcinio audinio ekranavimas/transpozicija	71 (12/17)
Kiaušialąstės donorystė	53 (9/17)
GnRH antagonistų terapija	41 (7/17)
Įsivaikinimas	35 (6/17)
Embrionų šaldymas	29 (5/17)
<i>In vitro</i> brandinimas	24 (4/17)
Embriono donorystė	12 (2/17)

Ar jūsų centras turi gaires dėl:	
Spermos surinkimos ir užšaldymo?	65 (11/17)
Kiaušidės žievinio audinio surinkimo ir užšaldymo?	65 (11/17)
Sėklidžių audinio surinkimo ir užšaldymo?	59 (10/17)
Kiaušidžių stimuliacijos ir kiaušialąsčių užšaldymo?	53 (9/17)
Neturime jokių gairių	29 (5/17)
Praktika	
Pasirinkite vaisingumo išsaugojimo strategijas, taikomas jūsų centre:	
Spermos surinkimas ir užšaldymas	82 (14/17)
Kiaušidės žievinio audinio surinkimas ir užšaldymas	65 (11/17)
Kiaušidžių stimuliacija ir kiaušialąsčių užšaldymas	59 (10/17)
Sėklidžių audinio surinkimas ir užšaldymas	41 (7/17)
Vaisingumo išsaugojimo procedūra vyksta kitame centre	24 (4/17)
Ar jūsų centras naudoja kitų teikiamas paslaugas:	
Spermos surinkimui ir užšaldymui?	82 (14/17)
Kiaušidės žievinio audinio surinkimui ir užšaldymui?	71 (12/17)
Sėklidžių audinio surinkimui ir užšaldymui?	65 (11/17)
Kiaušidžių stimuliacijai ir kiaušialąsčių užšaldymui?	59 (10/17)
Ar naudojate spermos / sėklidžių audinio / kiaušidžių audinio / kiaušialąsčių šaldymą pacientams su šiomis diagnozėmis?	
Hodžkino limfoma	88 (15/17)
Prieš kamieninių ląstelių transplantaciją	88 (15/17)
Ne Hodžkino limfoma	82 (14/17)
Juingo / minkštųjų audinių sarkoma	82 (14/17)
Osteosarkoma	82 (14/17)
Ūminė limfoblastinė leukemija, diagnozės metu	47 (8/17)
Ūminė mieloidinė leukemija, diagnozės metu	47 (8/17)
Vilmsio navikas	35 (6/17)
Lytinių ląstelių navikai	35 (6/17)
CNS navikai	29 (5/17)
Kiti	12 (2/17)
Ar jūsų centre vyksta pacientų ir jų tėvų konsultacijos vaisingumo išsaugojimo tema?	
Taip, tiems, kurie atitinka vaisingumo išsaugojimo indikacijas	76 (13/17)
Taip, visiems	12 (2/17)
Taip, kai kuriems	12 (2/17)
Ar jūsų centre yra teikiama informacija apie vaisingumo išsaugojimą pacientams ir jų tėvams prieš ir po gydymo?	
Taip	41 (7/17)
Informacija ruošiama	29 (5/17)
Ne	24 (4/17)
Nežinau	6 (1/17)
Jei taip, koku būdu yra pateikiama ši informacija?	
Leidiniais / lankstinukais / skrajutėmis	41 (7/17)
Internetinėje svetainėje	24 (4/17)
Kita	6 (1/17)
Ar jūsų centre vyksta pacientų ir jų tėvų konsultacijos su vaisingumo problemomis susijusia tema?	
Taip, visus pacientus ir jų tėvus	47 (8/17)

Taip, kai kuriems	41 (7/17)
Ne	12 (2/17)
Kodėl ne visiems pacientams ir jų tėvams yra siūloma konsultacija?	
Mūsų centras nesiūlo konsultacijos visiems pacientams ir jų tėvams	35 (6/17)
Amžius (per jaunas / senas)	35 (6/17)
Kalbos barjeras	29 (5/17)
Trūksta laiko iki gydymo pradžios	24 (4/17)
Svarbūs kiti klausimas	18 (3/17)
Pacientų / tėvų nedomina ar gėdijasi kalbėti	12 (2/17)
Kas atsakingas už vaisingumo konsultaciją?	
Onkologas	88 (15/17)
Ginekologas	65 (11/17)
Endokrinologas	18 (3/17)
Onkologijos slaugytoja	12 (2/17)
Kiti	12 (2/17)
Andrologas	6 (1/17)

GnRH – gonadotropiną atpalaiduojantis hormonas (angl. *gonadotropin releasing hormone*), TESA – spermatozoidų iš sėklidžių aspiravimo procedūra (angl. *testicular sperm aspiration procedure*), PESA – perkutaninė spermatozoidų aspiracija iš sėklidės prielipo (angl. *percutaneous epididymal sperm aspiration*).

Nors didžiojoje dalyje (88 %) centrų yra konsultuojama apie galimus vaisingumo sutrikimus po gydymo, ne visi pacientai gauna šią paslaugą. Pasak respondentų, kai kuriems pacientams konsultacijos su vaisingumo problemomis susijusi tema nėra suteikiamos dėl pacientų amžiaus (35 %), kalbos barjero (29 %), laiko trūkumo konsultacijai iki gydymo pradžios (24 %) arba pacientų ar jų tėvų gėdijimosi kalbėti šia tema (12 %). Taip pat, visi apklausti centrai atsakė turintys galimybę teikti konsultacijas apie vaisingumo išsaugojimo galimybes pacientams ir jų tėvams prieš gydymą, tačiau 76 % jų konsultuoja tik tuos, kurie atitinka tos šalies vaisingumo išsaugojimo kriterijus. Mažiau nei pusė centrų (41 %) nurodė teikiantys pacientams ir jų tėvams patvirtintą viešai prieinamą informaciją, pavyzdžiui, leidinius / lankstinukus / skrajutes (41 %) ar paskelbtą informaciją internete (24 %). Daugelyje vaikų onkologijos centrų konsultacijas teikia onkologai (88 %) arba ginekologai (65 %). Likę respondentai nurodė, jog pacientai ir jų tėvai yra nukreipiami pas specialistus arba onkologijos slaugytojas (3.7 lentelė).

3.4.2. Berniukų ir mergaičių vaisingumo išsaugojimo strategijos

Iš apklausos rezultatų matome, jog visuose centruose yra siūlomas spermos užšaldymas (3.7 lentelė), tačiau ar šia vaisingumo išsaugojimo strategija galės pacientas pasinaudoti, priklauso nuo lytinės brandos stadijos. Lytinė branda

nustatoma diskusijų su pacientais ir jų tėvais metu, įvertinant brandos stadiją pagal Tanerį bei įvertinant sėklidžių išsivystymą (3.8 ir P10 lentelė).

3.8 lentelė. Berniukams ir mergaitėms taikomų vaisingumo išsaugojimo strategijų rezultatų apžvalga.

Klausimas	% (centrų skaičius / viso)
Berniukų vaisingumo išsaugojimas	
Kas atsakingas už spermos surinkimą?	
Onkologijos slaugytoja	94 (16/17)
Onkologas	12 (2/17)
Ginekologas	12 (2/17)
Andrologas	6 (1/17)
Pagal ką nusprendžiate, kad berniukas yra pakankamai subrendęs spermos surinkimui?	
Brandos stadija	100 (17/17)
Kur yra produkuojamas spermos mėginys?	
Spermos tyrimų laboratorijoje	100 (17/17)
Paciento namuose	41 (7/17)
Paciento ligoninės palatoje	6 (1/17)
Kitur	6 (1/17)
Ką darote, jeigu pacientas negali produkuoti spermos mėginio? Prašome nurodyti.	
Nieko	47 (8/17)
Sėklidžių audinio šaldymas	18 (3/17)
TESA / PESA	18 (3/17)
Elektroejakuliacija	18 (3/17)
Dar kartą mėginti ejakuliaciją (masturbacija)	12 (2/17)
Ar jūsų centras siūlo spermos / sėklidžių audinio šaldymą po gydymo?	
Ne	59 (10/17)
Taip, kai kuriems	41 (7/17)
Mergaičių vaisingumo išsaugojimas	
Ar jūsų centras siūlo kiaušidžių žievinio audinio ir / ar kiaušialąsčių šaldymą po gydymo?	
Taip, kai kurioms	47 (8/17)
Ne	47 (8/17)
Taip, visoms	6 (1/17)
Ar jūsų centre yra įprastinė gydymo praktika mergaitėms, kurioms atsistatė kiaušidės audinio funkcijos po kiaušidžių nepakankamumo?	
Jokios įprastinės praktikos	65 (11/17)
Konsultacija su ginekologu	35 (6/17)
Konsultacija su endokrinologu	12 (2/17)

TESA – spermatozoidų aspiravimo iš sėklidžių procedūra (angl. *testicular sperm aspiration procedure*), PESA – perkutaninė spermatozoidų aspiracija iš sėklidės prielipo (angl. *percutaneous epididymal sperm aspiration*).

Sėklidės audinio užšaldymas lytinės brandos nesulaukusiems pacientams tiek prieš, tiek po gonadotoksinio gydymo yra siūlomas tik 18 %, o po

gydymo – 41 % vaikų onkologijos centrų. Daugumoje centrų (94 %) už spermos mėginių paėmimą yra atsakingi vaikų onkologai, nors kai kuriuose centruose tai gali atlikti endokrinologai (12 %), onkologijos slaugytojos (12 %) ar andrologai (6 %) (3.8 lentelė). Nors visi respondentai nurodė, kad dažniausiai spermos mėginys paimamas laboratorijoje, kai kurie centrai taip pat leidžia tai atlikti paciento namuose (6 %), specialiai skirtame kabinete ligoninėje (47 %) arba kitose vietose (6 %).

Tik 9 onkologijos centrai (53 %) pateikė atsakymus apie alternatyvius spermos surinkimo metodus tais atvejais, kai lytiškai subrendę berniukai negali produkuoti ejakuliuotų spermos mėginių. Tokiu atveju šie centrai siūlo įvairius pagalbinius metodus, įskaitant elektroejakuliaciją, spermatozoidų aspiraciją iš sėklidžių spermos, perkutaninę spermatozoidų aspiraciją iš sėklidės prielipo ir sėklidės audinio užšaldymą (3.8 lentelė).

Daugumoje Šiaurės ir Baltijos šalių centrų pagrindinės vaisingumo išsaugojimo strategijos lytinės brandos sulaukusioms mergaitėms yra kiaušialąsčių užšaldymas (88 %), KA užšaldymas (82 %) ir reprodukinių audinių ekranavimas / transpozicija (71 %) (3.7 lentelė). Hormoninį gydymą, potencialiai apsaugantį kiaušides nuo chemoterapijos, taiko tik 41 % onkologijos centrų. Be to, KA užšaldymas lytinės brandos nesulaukusioms mergaitėms siūlomas net 82 % vaikų onkologijos centrų.

Po gonadotoksinio gydymo, 53 % vaikų onkologijos centrų gali pasiūlyti kiaušialąsčių ar KA užšaldymą bei 47 % centrų yra parengę protokolus, skirtus pacientėms, kurioms atsistatė kiaušidžių funkcija, gydyti (3.8 lentelė).

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Naujausi vėžio gydymo pasiekimai prailgina pacientų išgyvenamumo rodiklius, todėl daug dėmesio skiriama išgyvenusių asmenų gyvenimo kokybės gerinimui. Vienas iš tokių aspektų, kuriam skiriama daug dėmesio, yra vaisingumas bei jo išsaugojimas, kuris yra svarbus fiziologinis, psichologinis ir socialinis veiksnys. Yra žinoma, kad chemoterapija ir radioterapija sukelia priešlaikinį kiaušidžių nepakankamumą, sukeldami folikulų atreziją (Wallace *et al.*, 2010). Kadangi dalinis ar pilnas nevaisingumas yra viena jautriausių vėžį išgyvenusių pacientų problema, prieš pradedant onkologinį gydymą būtina nukreipti pacientus pas vaisingumo specialistus konsultacijai. Nemažai pasaulio šalių yra pasitvirtinusios nacionalines ar adaptavusias tarptautines gaires bei rekomendacijas, skirtas onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimui, kurios pagrinde skirtos solidiniais navikais sergantiems pacientams (Oktay *et al.*, 2018; von Wolff *et al.*, 2019, *The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation et al.*, 2020). Šiose rekomendacijose nustatytas embrionų, kiaušialąsčių ir KA šaldymas, siekiant spręsti priešlaikinio kiaušidžių išsekimo problemą. Ypač pastaruoju dešimtmečiu KA užšaldymas tampa patrauklia vaisingumo išsaugojimo strategija dėl galimybės ją taikyti ir lytinės brandos nesulaukusioms pacientėms (Loren *et al.*, 2013).

Iš atliktų literatūros apžvalgų, yra žinoma, jog KA užšaldymas gali sukelti didžiulę riziką audinio struktūros, ląstelių bei folikulų pažeidų atsiradimui, tad geriausio metodo parinkimas yra svarbus žingsnis (Rivas Leonel *et al.*, 2019), norint išsaugoti KA potencialą atkurti vaisingumą bei endokrininės sistemos veiklą po autotransplantacijos. Tiesa, šio darbo metu buvo naudota pasyvi lėto užšaldymo technologija, o ne automatinė kontroliuojamos aplinkos aparatūra, kas galėjo turėti neigiamos įtakos KA kokybei. Tyrėjai teikia, kad taikant šį metodą, priklausomai nuo temperatūros kritimo greičio stabilumo, gali nekontroliuojamai formuotis ledo kristalai ir tokiu būdu pažeisti audinius (Zhang *et al.*, 2011), ar sukelti audinio ląstelių, folikulų žūtį, fibrozę ir ROS lygio išaugimą (Asadi *et al.*, 2024). Tačiau yra ir prieštaraujančių tyrimų, tokių kaip neseniai išspausdintas ikiklininis tyrimas, kurio metu buvo pademonstruota, kad nors pasyvus lėtas užšaldymas sukelia didesnę užuomazginių folikulų aktyvaciją – fibrozinio audinio, apoptotinių ar proliferuojančių folikulų kiekis reikšmingai nesiskyrė tarp KA, užšaldytų taikant abu lėto užšaldymo metodus, tad pasyvus lėtas užšaldymo metodas įvertintas kaip mažos audinio pažeidų / degradacijos rizikos technologija. Be to, 2016 metais buvo parodytas pasyvaus lėto užšaldymo

metodo efektyvumas, kai po 10-ies metų užšaldymo buvo autotransplantuotas KA ir atkurtos jo funkcijos (Póvoa *et al.*, 2016).

Pirmiausiai darbo metu buvo įvertinti lėtai užšaldyti / greitai atšildyti KA naudojant histologinius, imunohistocheminius bei molekulinis tyrimo metodus, siekiant įsitikinti, jog šie taikyti protokolai vaisingumo išsaugojimo tikslais nesukelia reprodukciniam audiniui žalingo poveikio. Gauti rezultatai koreliuoja su kitų tyrėjų atliktais darbais, kuriuose įvertintas lėto užšaldymo ir / ar vitrifikacijos poveikis audinių integralumui (Rodrigues *et al.*, 2021; Gu *et al.*, 2023; Candelaria *et al.*, 2024). Lyginant audinių morfologijas, vitrifikuoti KA pasižymi sumažėjusiu stromos ląstelių tankiu (Gu *et al.*, 2023) ir didesniu apoptotinių ląstelių skaičiumi lyginant su šviežiais KA (Gu *et al.*, 2023; Candelaria *et al.*, 2024), o šio darbo metu išanalizuotų KA struktūra, taikant histologinius tyrimo metodus, buvo panašesnė į šviežio audinio struktūrą, panašus buvo ir stromos ląstelių tankis, o tai sutampa su Rodrigues ir bendraautorų (2021) atliktu tyrimu, įrodančiu, jog po lėto užšaldymo / greito atšildymo stromos ląstelių užimamas plotas nesiskiria nuo šviežio KA. Be to, didelę įtaką stromos ląstelių gyvybingumui, folikulų vystymuisi bei jų tarpusavio bendravimui turi audinio užląstelinis matriksas (Ouni *et al.*, 2021; Ouni *et al.*, 2022; Grosbois *et al.*, 2023). KA užląstelinio matrikso dominuojantis komponentas yra kolagenas (Ouni *et al.*, 2022), tad jis yra dažnai naudojamas, siekiant įvertinti KA vientisumą. Pavyzdžiui, Ramos su bendraautorais (2022) pademonstravo vitrifikacijos pranašumą prieš lėtą užšaldymą sukeliant mažesnes struktūrinio vientisumo pažeidas KA, nors vėliau kita tyrėjų grupė parodė, jog nepriklausomai nuo KA užšaldymo metodo, struktūra ir bendras kolageno kiekis audinyje nekinta (Candelaria *et al.*, 2024). Kadangi mūsų atliktoje KA jungiamojo audinio analizėje pakitusių užląstelinio matrikso elementų – fibrozinių vietų ar struktūrinių pažeidų – nebuvo nustatyta, tikėtina, kad audiniuose dėl transportavimo, užšaldymo ir atšildymo procesų neįvyko jo aktyvacija. Tai patvirtina ir mūsų atliktas Ki-67 raiškos tyrimas. Įprastai sveiko KA stromos ląstelės yra ramybės būsenoje, aktyvi proliferacija stebima tik tam tikrų fiziologinių procesų, tokių kaip folikulų vystymasis (Funayama *et al.*, 1996; Candelaria *et al.*, 2024) ar audinio remodeliavimas dėl stresinių sąlygų (Onions *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2022) metu. Taip pat nebuvo nustatytų ir aktyviai proliferuojančių ląstelių kaupų, kurios galėtų liudyti apie metastazavusias iš pirminio naviko lokalizacijos piktybines ląsteles (Eijkenboom *et al.*, 2021). Toks morfologinis įvertinimas leidžia daryti išvadą, kad mūsų tyrime lėtai užšaldytas / greitai atšildytas KA išlaiko savo struktūrinį vientisumą, o tuo pačiu ir gerą audinio kokybę.

Šio darbo metu atlikti pirmieji sėkmingi žmogaus lėtai užšaldytų / greitai atšildytų ir šviežių KA ksenotransplantacijos tyrimai Lietuvoje, kurių metu parodyta, jog lėto užšaldymo / greito atšildymo protokolas yra patikimas metodas, kurį taikant išsaugojamas KA gyvybingumas bei funkcijos (Gudlevičienė *et al.*, 2020). Iki šiol pagrindinių ksenotransplantacijos tyrimų kryptys yra susijusios su kiaušidžių biologine funkcija, KA užšaldymo, atšildymo bei transplantacijos vietos protokolų optimizavimu, revaskuliarizacijos ir piktybinių ląstelių identifikavimo eksperimentais bei etikos klausimais dėl gyvūnų panaudojimo (Thuwanut *et al.*, 2025).

Mūsų pirmojo ksenotransplantacijos tyrimo rezultatai pademonstravo pakankamai efektyvų (80 %) audinių gebėjimą prigyti po lėto užšaldymo / greito atšildymo, patvirtindami kitų tyrėjų atliktus tyrimus (Lierman *et al.*, 2021). Lierman su bendraautorais (2021) atskleidė, jog lėtas užšaldymas yra efektyvi bei nedaug kainuojanti alternatyva kontroliuojamos temperatūros lėtam užšaldymui, tad šio KA užšaldymo protokolo pasirinkimas taikyti klinikinėje praktikoje galėtų būti naudingas. Taip pat, KA fragmentuose buvo identifikuotas ne tik kraujagyslių tinklo tarp šeimininko ir transplantato atkūrimas, kuris yra svarbus sėkmingos transplantacijos rodiklis (Rahimi *et al.*, 2010; Komatsu *et al.*, 2020), bet ir morfologiškai nepažeisti folikulai. Gauti rezultatai sutampa kitų mokslininkų atliktų tyrimų rezultatais, kai buvo vertinamas folikulų išgyvenamumas po skirtingų KA užšaldymo protokolų panaudojimo (Herraiz *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2019). Šio tyrimo metu KA ksenotransplantacijos efektyvumo rezultatų patvirtinimui buvo panaudota šviežio KA kontrolė, kuri patvirtino, jog užšaldyti / atšildyti KA gali taip pat sėkmingai transplantuotis. Taigi, šis tyrimas patvirtina, jos pasirinkta metodika, skirta moterų vaisingumo atkūrimo autotransplantacijos būdu ateityje, patikimai išsaugo KA gyvybingumą ir po daugiau nei 5-ių metų užšaldymo.

Analizuotuose transplantatuose taip pat nebuvo nustatytų metastazavusių piktybinių ląstelių, kurios gebėtų sukelti ligos atsinaujinimą. Pasaulyje yra aktyviai plėtojami *in vivo* krypties tyrimai, kadangi KA autotransplantacija yra aktuali tiek mažos, tiek ir vidutinės metastazavimo rizikos navikais sergančioms pacientėms (Shapira *et al.*, 2018; Grubliauskaite *et al.*, 2023a; Thuwanut *et al.*, 2025). Nors šio darbo metu po ksenotransplantacijos nebuvo atlikti molekuliniai transplantatų tyrimai, toks visapusiškas atšildyto KA įvertinimas užtikrina jo saugumo įvertinimą. Kiti tyrėjai bando pasitelkti ne gyvūnų modelius, siekiant išsiaiškinti piktybinių ląstelių buvimą KA, o *in vitro* molekulinis metodas – tiriant specifinių žymenų raišką prieš autotransplantaciją (Fabbi *et al.*, 2024). Nors krūties vėžys yra vidutinės metastazavimo rizikos į KA grupėje (Grubliauskaite *et al.*, 2023a), pastaruoju

metu kyla vis daugiau diskusijų ar KA užšaldymas turėtų būti siūlomas pacientėms, sergančioms šia liga (Macklon ir De Vos, 2024; Andersen *et al.*, 2025). Nepaisant to, KA užšaldymas yra taikomas visose pasaulio šalyse, kurios taiko šią vaisingumo išsaugojimo strategiją, krūties vėžiu sergančioms pacientėms, tad transplantacijos saugumo ir žymenų tyrimai išlieka aktualūs. Pirmiausia, šio darbo metu buvo sukurti krūties navikinių bei sveikų audinių miRNR raiškos profiliai, su kuriais lyginti moterų, sirgusių krūties vėžiu, KA miRNR profiliai. Sudarytas navikinio audinio profilis pasižymėjo jau seniau identifikuotomis sumažėjusia (let-7 šeima, miRNR-10b (Kasinski ir Sack, 2011; Al-Harbi *et al.*, 2018), miRNR-100 (Xie *et al.*, 2021), miRNR-107 (Li *et al.*, 2014), miRNR-125b (Banzhaf-Strathmann ir Edbauer, 2014)) arba padidėjusia (miRNR-181b (Yan *et al.*, 2008)) raiška pasižyminčiomis miRNR krūties vėžio atveju, tad juo buvo pasitikėta lyginant KA miRNR profilius ieškant metastazavusių krūties vėžio žymenų. Šio tyrimo trūkumas – naudota maža imtis tiek navikinių audinių, tiek KA, tad preliminarūs rezultatai turėtų būti toliau validuojami ir atlikti didesnės apimties darbe. Tačiau, kaip buvo ir tikėtasi, KA miRNR profiliai buvo panašesni į sveiko krūties audinio profilį, kadangi moterims, kurioms buvo siūloma vaisingumo išsaugojimo programa, nebuvo nustatyta metastatinė liga į kitus organus. Šis krūties navikinio audinio miRNR raiškos profilis ateityje turėtų būti ištirtas panaudojant KA, kurie specialiai įskiepyti krūties vėžio ląstelėmis, siekiant patvirtinti jo specifiškumą.

Šiuo metu lyginamieji šviežių ar skirtingomis sąlygomis užšaldytų / atšildytų KA transkriptomikos tyrimai dar nėra plačiai paplitę, tačiau neseniai atliktos diferentinės genų raiškos analizės (Gu *et al.*, 2023; Kong *et al.*, 2024) atskleidė kelis svarbius procesus, kurie turi įtakos audinio funkcijoms ir gyvybingumui po atšildymo, bei koreliuoja su mūsų gautais rezultatais. Kong su bendraautorais (2024) nustatė, jog po lėto atšildymo KA pasikeičia net 3000 genų raiška. Keli svarbiausi nustatyti genai, kurių raiška išauga dėl užšaldymo ir atšildymo, dalyvauja ląstelių proliferacijos, apoptozės, atsako į stresą bei uždegimą procesuose (Kong *et al.*, 2024). MAPK signalinio kelio aktyvacija įrodyta ne tik mūsų darbo metu, bet yra patvirtinta ir kitų tyrėjų (Gu *et al.*, 2023). Taip pat mūsų darbe nustatyti aktyvuoti endokrininio atsparumo bei insulino signaliniai keliai, kurie galėtų byloti apie audinio hormonų receptorių patirtas pažaidas ir medžiagų apykaitos sutrikimą, kurie gali turėti įtakos atsakui hormonų poveikiui, folikulų vystymuisi bei išgyvenamumui (Webb ir Brunet, 2014; Das ir Arur, 2017). Pagrindiniai genai, kurių nustatyta sumažėjusi raiška, dalyvauja kiaušidės steroidogenezės procesuose (Kong *et al.*, 2024). Mūsų miRNR genų-taikinių praturtinimo analizėje buvo nustatyti slopinami signaliniai keliai tokie kaip progesterono sukeltas kiaušialąsčių

brendimas bei FoxO signalinis kelias, kurie dalyvauja pagrindinių KA funkcijų – folikulų brendimo ir hormonų sintezės – procesuose (Webb ir Brunet, 2014; Grosbois ir Demeestere, 2018; Li *et al.*, 2021). Nėgano to, Kong su bendraautoriais atliktoje analizėje nustatyti nuslopinti lizosomų ir kortizolio sintezės keliai, kurie dalyvauja formuojantis atsakai į stresą, dėl ko ląstelėse gali pradėti kauptis toksinės medžiagos, tokios kaip ROS, sukeliančios ląstelės žūtį (Tan *et al.*, 2022; Pellegrini *et al.*, 2023) bei užląstelinio matrikso receptorių sąveikos ir PI3K-Akt signaliniai keliai, kurių abiejų nuslopinimas turi įtakos folikulų aktyvacijai, ląstelių gyvybingumui, proliferacijai, migracijai bei apoptozės iniciacijai (Maidarti *et al.*, 2020). Mūsų atliktoje analizėje buvo nustatyti HIF-1 signalinio kelio aktyvumo sumažėjimas kartu su VEGF signalinio kelio aktyvumo sumažėjimu galėtų nurodyti kenksmingą užšaldymo / atšildymo poveikį angiogenezei, kurie abu gali būti reguliuojami per PI3K-Akt kelio užslopinimą, tad būtų aktualu patikrinti / padidinti angiogeninių veiksnių raišką po transplantacijos.

Yra parodyta, jog atsirinkus tinkamiausius audinio užšaldymo / atšildymo protokolus, KA transplantacija yra procesas, sukeliantis reikšmingą folikulų atreziją (Rodrigues *et al.*, 2021). Rodrigues su bendraautoriais atlikto tyrimo metu buvo palygintas transplantacijos poveikis tiek šviežiams, tiek lėtai užšaldytiems / greitai atšildytiems KA ir nustatytas 10-ies kartų folikulų skaičiaus bei jų užimamo audinio ploto sumažėjimas lyginant su kontroliniais – netransplantuotais šviežiais ir užšaldytais / atšildytais KA. Nors statistškai reikšmingų pokyčių tarp netransplantuotų grupių nebuvo nustatyta, tačiau buvo aptikta šių parametrų mažėjimo tendencija. Taip pat buvo parodyta, jog ksenotransplantacijos pirmąją savaitę KA patiria hipoksiją ir oksidacinį stresą, iki kol atkuriamas revaskuliarizacijos procesas (van Eyck *et al.*, 2009 ir 2010). Šiuo periodu daugiausiai išaugusios raiškos genų funkcijos buvo susijusios su audinių pertvarkymu, ląstelių adhezija, migracija ir vaskuliarizacija (van Langendonck *et al.*, 2014), todėl vis daugėja tyrimų, kurių metu KA prieš ksenotransplantaciją yra aktyvuojami fragmentacijos ar inkapsuliacijos būdu, ar tiesiog praturtinant *in vitro* kultūros terpę įvairias augimo veiksniais, hormonais, antioksidantais bei kitais komponentais, kuriais siekiama sumažinti hipoksijos, oksidacinio streso ir kitų veiksnių sukiamų pažeidimų audiniuose bei folikuluose (Cacciottola *et al.*, 2021).

Galimai šio darbo ksenotransplantacijos tyrimų apribojimas tas, jog naudoti KA iš vyresnio amžiaus pacienčių (33 ± 5 metai), kas galėtų turėti įtakos tyrimo rezultatams dėl natūraliai mažesnio folikulų skaičiaus. Įprastai, KA užšaldymas rekomenduojamas iki 35–36-ųjų metų (Wallace *et al.*, 2014; The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation *et al.*, 2020), tačiau kai kurios šalys šį amžių yra pavėlinusios. Tyrimų metu

pademonstruota, jog ir vyresnėms nei 35-eri metai moterims sėkmingai gali būti atkurta kiaušidžių funkcija dėl ko pacientės gali susilaukti vaikų (Patel *et al.*, 2024). Šio tyrimo KA prieš ksenotransplantaciją 36 val. buvo aktyvuojami *in vitro* su skirtingų sudėčių *in vitro* kultūros terpėmis. Didžiausią pranašumą, išlaikant gyvybingumą bei progesterono gamybą, prieš KA standartinėje terpėje, pademonstravo KA terpėje, papildytoje 50 ng/ml VEGF-A ir 1 µg/mL rutino deriniu. Mūsų žiniomis, tai yra pirmasis tokios *in vitro* kultūros terpės derinys bei rutino tyrimai su žmogaus KA. Yra parodyta, jog avių KA atšildymas reikšmingai sumažina *in vitro* kultūros metu sekretuojamų su steroidogeneze susijusių miRNR raišką, estradiolio bei progesterono gamybą bei padidina miRNR-24 raišką, kuri veikia ląstelių apoptozę (Islam *et al.*, 2019). Rutinas yra natūralus antioksidantas, pasižymintis priešuždegiminėmis ir antiapoptotinėmis savybėmis (Gęgotek *et al.*, 2017; Lins *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2024), kurio papildymas į *in vitro* kultūros terpę galėtų sumažinti užšaldymo / atšildymo metu sukeltus hipoksijos, oksidacinio streso ir apoptozės procesus, o VEGF, augimo veiksnys, kuris stimuliuoja kraujagyslių endotelio ląstelių proliferaciją, migraciją ir išgyvenamumą (Araújo *et al.*, 2013) ir galėtų paskatinti revaskuliarizacijos procesą ksenotransplantacijos metu. Mūsų atliktas *in vitro* aktyvacijos tyrimas atskleidė didžiausią žalą KA, kai rutinas naudojamas pavieniui, kas koreliuoja su kito tyrimo rezultatais, įrodančiais rutino proapoptotinį, neigiamą poveikį kiaušinių kiaušidžių ląstelių gyvybingumui bei išaugusią progesterono gamybą, kai naudojama 10 kartų didesnė koncentracija (Lins *et al.*, 2021; Sirotkin *et al.*, 2021), tačiau papildžius avių KA *in vitro* kultūros terpę 1 µg/mL rutinu buvo nustatytas didžiausias teigiamas poveikis užuomazginių folikulų aktyvacijai ir augimui bei mažiausias apoptozės mastas veikiant per PI3K-Akt signalinį kelią (Lins *et al.*, 2021). Tad, siekiant atskleisti, kokį poveikį turi rutinas žmogaus audiniui, reikėtų išsamesnių KA tyrimų po *in vitro* aktyvacijos. Tačiau gautas įdomus rezultatas papildžius *in vitro* mitybinę terpę VEGF-A – KA gyvybingumas buvo didžiausias, o progesterono gamyba – sumažėjusi, kas iš dalies galėtų atskleisti VEGF-A ir rutino antagonistinį poveikį (Luo *et al.*, 2008) progesterono gamybai, bet sinerginį poveikį gyvybingumui, kuris dar niekada iki šiol nebuvo pademonstruotas. Yra pademonstruota, jog ne tik rutinas gali veikti antiapoptotiškai (Araújo *et al.*, 2013), bet ir VEGF, kuris padeda išvengti dėl užšaldymo proceso patiriamos grūdėtųjų ląstelių apoptozės (Shin *et al.*, 2008), o tai paaiškintų žemą citotoksiškumą.

Antrojo ksenotransplantacijos tyrimo rezultatai pademonstravo skirtingą hibridinio kraujagyslių tinklo atkūrimo potencialą tarp KA, kurie buvo *in vitro* aktyvuoti terpėje su VEGF-A ir rutinu, ir be. V+R grupėje buvo stebimas tiek didesnis funkcionalių ir subrendusių (žmogaus α -SMA teigiamai

nusidažiusių) kraujagyslių skaičius bei jas ir kapiliarus sudarančių pelės endotelinų, *Cd31* žymenimi pasižyminčių, ląstelių raiška. Atšildytuose ir ksenotransplantuotuose KA su tik VEGF 165 buvo pagerinta angiogenezė jau po 3-jų dienų transplantacijos, skatinant kraujagyslių brendimą ir sutrumpinant hipoksijos periodą (Herny *et al.*, 2015). Šie rezultatai atskleidžia tendenciją, jog V+R derinys skatina kraujagyslių brendimą ir stabilizavimą, todėl kraujagyslių tinklas tampa stabilesnis. Taip pat, esant VEGF, ANGPT2 dalyvauja tik ankstyvosiose kraujagyslių invazijos stadijose, kuomet yra pakeičiamas ANGPT1, kuris dalyvauja kraujagyslių brendimo ir stabilizavimo procesuose (Youm *et al.*, 2016; Olesen *et al.*, 2023), o tai galėtų paremti gautus α -SMA ir *Cd31* rezultatus. Kontraversalu, bet deguonies tiekimo atnaujinimas sukelia užuomazginių folikulų aktyvaciją žievinėje KA dalyje, dėl ko bendrai išemijos-reperfuzijos periodu prarandama iki 80 % kiaušidžių rezervo (Gavish *et al.*, 2018; Komatsu *et al.*, 2020), tačiau kuo efektyvesnis kraujotakos sistemos atkūrimas yra būtinas sėkmingai KA transplantacijai.

Jau anksčiau buvo aptarta, jog KA užšaldymo / atšildymo procesas nesukelia reikšmingų audinio komponentų pokyčių, tačiau KA *in vitro* kultūros metu – mažėja kolageno, kuris yra pakeičiamas kitomis užląstelinio matrikso komponentų dalimis (Grosbois *et al.*, 2023; Candelaria *et al.*, 2024). Grosbois su bendraautorais (2023) atliktame tyrime buvo nustatyta, jog pirmieji audinio kompozicijos ir architektūriniai pokyčiai įvyksta jau po 2-jų dienų *in vitro* kultūros, kurie nepriklauso nuo pacienčių amžiaus. Be kolageno sumažėjimo, buvo nustatytas elastino padidėjimas, o fibronektino ir laminino kiekis visomis *in vitro* kultūros dienomis išliko stabilus. Ksenotransplantacijos metu audinyje taip pat vyksta reikšmingos užląstelinio matrikso permainos (Gavish *et al.*, 2015; Chiti *et al.*, 2023), kas koreliuoja su mūsų gautais *COLL6*, *COLL18* ir *FNI* genų raiškos rezultatais abejose ksenotransplantuotose KA grupėse. Kolagenas VI sudaro didžiausią dalį KA užląstelinio matrikso (Ouni *et al.*, 2022) ir su fibronektinu yra svarbūs audinio integralumui, folikulų vystymuisi bei ląstelių sąveikai su užląstelinio matriksu (Vasse *et al.*, 2024). Šių komponentų sumažėjimas galėtų atskleisti įvykusį adaptyvų atsaką į sukeltą stresą, teikiant pirmenybę audinio gyvybingumo išlaikymui, o ne užląstelinio matrikso struktūros palaikymui (Chiti *et al.*, 2023). Kolageno XVIII išaugusi raiška yra būdinga menopauziniam KA (Ouni *et al.*, 2022), kuriame jis atlieka angiogenezės bei endotelinų ląstelių migracijos slopinimą (Marneros ir Olsen, 2005), o tai priešinga mūsų gautiems revaskuliarizacijos rezultatams ir patvirtina, kad KA transplantavosi sėkmingai dėl atkurto kraujagyslinio tinklo. Taip pat tai koreliuoja ir su folikulų tirtais žymenimis. Nors užuomazginių / tarpinių (*FOXL2*) bei

aukštesnės vystymosi stadijos (*SCF* ir *CYP19A1*) folikulų genų raiškos buvo sumažėjusios, pilnas folikulų išsekimas – atrezija – neįvyko, vadinasi, po ksenotransplantacijos KA netapo menopauziniais. Kaip buvo minėta, KA, kurie buvo naudoti šiam tyrimui, buvo gauti iš vyresnio amžiaus pacienčių, o nustatytos folikulų žymenų raiškos suteikia vilčių, jog taikant šį pasyvų KA užšaldymo metodą, išsaugomas bent minimalus folikulų rezervas.

FOXL2 yra nesubrendusių GL žymuo, užtikrinantis kiaušialąsčių ramybės būseną (Reddy *et al.*, 2010), o aromatazė CYP19A1 yra aptinkama tik aktyviose GL, kurios dalyvauja folikulogenezėje vykdydamos estrogenų sintezę (Simpson *et al.*, 2002).

Tiriant oksidacinio streso (*PRDX* ir *SOD1*) ir apoptozės (*CASP3A*) žymenų raišką, buvo nustatytas jų raiškos sumažėjimas po ksenotransplantacijos lyginant su užšaldytu / atšildytu KA. Yra žinoma, jog užšaldymo / atšildymo procesai sukelia ne tik mitochondrijų disfunkciją, ROS kaupimąsi bei grūdėtųjų ląstelių žūtį (Zhang *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2021), bet ir SOD, kuri neutralizuoja laisvus superoksido radikalus, aktyvumo sumažėjimą (Zhang *et al.*, 2013). SOD aktyvumo sumažėjimas palieka ląstelę neapsaugotą nuo tolimesnių oksidacinio streso pažaidų. Antioksidantų įtraukimo į užšaldymo terpę ir panaudojimo prieš transplantaciją nauda mitochondrijų funkcijų atnaujinimui po atšildymo yra parodyta ne viename tyrime (Sun *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2024). Be to, mokslininkai pademonstravo, jog ANGPT2 (Cho *et al.*, 2018), CTGF bei LOX (Nagashima *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2013; Ouni *et al.*, 2021) raiškos išauga esant hipoksijos, ankstyvosios transplantacijos, bei užląstelinio matrikso pertvarkymo metu, o šį principą taikant mūsų gautiems rezultatams, galime daryti išvadą, jog po 28 dienų transplantacijos abiejose KA grupėse buvo atkurtos KA fiziologinės sąlygos, kuriose hipoksijos, oksidacinio streso ir fibrozės sukeltų žymenų nebeaptinkama.

Šis tyrimas atskleidė, jog 36 val. *in vitro* KA aktyvacija, mitybinę terpę papildžius rutinu bei VEGF-A, išsaugojo gyvybingumą bei atnaujino audinio steroidogenezės funkciją, ilgalaikės ksenotransplantacijos eksperimente reikšmingų genų, susijusių su folikulogeneze, pažaidomis ir audinio integralumu, raiškos skirtumų nebuvo nustatyta, tačiau pastebėta stabilesnio atkurto kraujagyslių tinklo formavimosi tendencija. Tačiau yra ir panašių tyrimų, kai potencialios molekulės ar technologijos neįrodo savo reikšmingo pranašumo ksenotransplantacijos metu lyginant su kontroline grupe (Dolmans *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2021; Shiroma *et al.*, 2021; Azevedo *et al.*, 2022; Olesen *et al.*, 2023), tad kyla klausimas ar iš tiesų tokios manipuliacijos prieš transplantaciją kada nors bus įdiegtos į kasdienę klinikinę praktiką. Nors yra publikuotų tyrimų su žmogaus KA *in vitro* aktyvacija ir autotransplantacija

(Wang *et al.*, 2021), vis tik dar nėra aišku, ar bus pasiliekiama prie šiuo metu sėkmingai taikomos transplantacijos po atšildymo procedūros.

Svarbus šio disertacinio darbo pasiekimas konstruojant dirbtinę kiaušidę – pademonstruotas žmogaus užuomazginių / tarpinių folikulų vystymasis iki antrinių folikulų per pakankamai trumpą – vos vienos savaitės – laikotarpį 3D *in vitro* kultūroje. Pastaraisiais metais taip pat atliekama daug tyrimų, kurių metu vertinamos įvairios sąlygos, skirtos folikulų brandinimui *in vitro*, tačiau dažniausiai jos paremtos KA *in vitro* kultūromis (Laronda *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2015; Younis *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2021; Schallmoser *et al.*, 2022). Lyginant su pastarosiomis, kuriose naudojamos kiaušidžių žievinės dalys su jose esančiais įvairiausio brandumo stadijos folikulai, 3D modeliuose yra žymiai lengviau stebėti ir nustatyti momentą, kada buvo aktyvuoti užuomazginiai folikulai. Vis dėlto, šis darbas turi ir ribotumą – folikulų vystymasis (augimas) buvo vertinamas naudojant tik mikroskopą, o užuomazginiai ir tarpiniai folikulai buvo sugrupuoti į vieną grupę, remiantis kitų mokslininkų pasiūlytomis folikulų vystymosi stadijų klasifikavimo sistemomis (Griffin *et al.*, 2006; Lierman *et al.*, 2015), neatliekant išsamesnio morfologinio ištirimo. Pasak Gougeon su bendraautorais (Gougeon *et al.*, 1994), šios abi – užuomazginių ir tarpinių – folikulų stadijos yra priskiriamos prie neaugančių / neaktyvių folikulų. Nors dirbtinės kiaušidės kokultūros sistema neleido individualiai stebėti kiekvieno folikulo augimo, išmatuoti folikulų skersmens dydžiai eksperimento pradžioje ir pabaigoje įrodo jų potencialą vystytis ir pasiekti aukštesnes brendimo stadijas.

Be to, šio tyrimo išskirtinumas yra tai, jog jame tiriama folikulų kokultūra su maitinamuoju kaSL monoslukuksniu. Intriguojantis šio tyrimo aspektas yra tai, kad naudojamos kaSL, išskirtos iš menopauzės sulaukusių moterų KA. Toks kaSL pasirinkimas leidžia panaudoti ląstelių populiaciją, kuri tiksliau atspindėtų gonadotoksinį gydymą gavusių pacienčių KA ląstelių populiacijas. Pacientėms, sergančioms vėžiu, dirbtinės kiaušidės konstravimas, panaudojant pradinės vystymosi stadijos folikulus, išskirtus iš jų užšaldyto KA prieš vėžio gydymą, kartu su kiaušidžių stromos ląstelėmis, išskirtomis iš tų pačių pacienčių KA remisijos metu, yra labai perspektyvus. Tiksliau, ši naujoviška metodika gali būti panaudojama ir jaunoms moterims, ir mergaitėms iki lytinės brandos, kurioms nustatyta didelė piktybinių ląstelių metastazavimo į kiaušides rizika (Grubliauskaitė *et al.*, 2023a). Nėgana to, ši vaisingumo atkūrimo technologija galėtų būti naudinga ir pacientėms, kurioms dėl autoimuninių ligų taikomas gonadotoksinis gydymas (Marder *et al.*, 2012). Toks klinikinis pritaikymas padidina šio tyrimo rezultatų svarbą,

pabrėždamas galimą platesnį vaisingumo išsaugojimo strategijų panaudojimą ateityje ir kitomis ligomis sergančioms pacienčių grupėms.

Yra žinoma, jog reprodukcinio amžiaus moterų reprodukcinio audinio stromą sudaro įvairių tipų ląstelės, tokios kaip kiaušialąstės, grūdėtosios ląstelės, imuninės sistemos ląstelės, endotelio, perivaskulinės ląstelės ir stromos ląstelės, kurios vis dar nėra pilnai charakterizuotos (Fan *et al.*, 2019; Kinnear *et al.*, 2020; Wagner *et al.*, 2020). Sulaukus menopauzės, ši ląstelių populiacijų dinamika keičiasi – aptinkama daugiau endotelinių, imuninės sistemos, limfinės endotelio, perivaskulinės, lygiųjų raumenų ir pilnai charakterizuotų stromos ląstelių (Lengyel *et al.*, 2022). Be to, senstančioms kiaušidėms būdinga uždegiminė aplinka, kuri prisideda prie folikulų žūties (Ansere *et al.*, 2021; Lliberos *et al.*, 2021; Ouni *et al.*, 2022), o tai rodo, kad tokios kiaušidės nebėra palankios folikulogenezės proceso palaikymui. Tačiau ląstelėse, išskirtose iš menopauzinio audinio stromos, buvo įrodytas jų plastiškumas *in vitro*, t.y. stebimas jų gebėjimas išgyventi, augti, diferencijuoti, išskirti į aplinką hormonus ir sintetinti užląstelinį matriksą (Asiabi *et al.*, 2020; Maruhashi *et al.*, 2020; Dadashzadeh *et al.*, 2022). Šiame disertacijos darbe įrodėme, jog galima sėkmingai išskirti didelį skaičių tokių ląstelių iš atšildyto menopauzinio KA, o jų išgyvenamumas ir gebėjimas proliferuoti įrodytas suformuojant pilną monosluoksnį per kelias *in vitro* kultūros dienas. Nors eksperimento pabaigoje nebuvo atliktas monosluoksnį suformavusių ląstelių gyvybingumo įvertinimas, visų pacienčių kaSL per 7-ių dienų *in vitro* kokultūros auginimo laikotarpį išlaikė tiek tipišką morfologiją, tiek vientisą monosluoksnį. Teigiamas ląstelių monosluoksnių poveikis pradinės vystymosi stadijos folikulų gyvybingumui ir (arba) jų augimui *in vitro* kultūrose yra įrodytas pelių (Tingen *et al.*, 2011; Itami *et al.*, 2011; Tagler *et al.*, 2012; Sarabadani *et al.*, 2021), karvių (Itoh ir Hoshi, 2000) ir žmonių modeliuose (Wu *et al.*, 2021). Įprastai tokiuose eksperimentuose naudojami įvairios kilmės fibroblastai, pavyzdžiui, išskirti iš pelių embrionų (Tagler *et al.*, 2012), odos (Itoh ir Hoshi, 2000) ir žmogaus dermos (Wu *et al.*, 2021) arba specifiskai iš KA išskirtos ląstelės, tokios kaip mezenchiminės kilmės ląstelės (Itoh ir Hoshi, 2000), intersticinės ląstelės (Itami *et al.*, 2011), makrofagai su teka ląstelėmis (Tingen *et al.*, 2011).

Nors šiame tyrime nebuvo atliktas ląstelių populiacijų charakterizavimas po išskyrimo (d0) ar tyrimo pabaigoje (d7), anksčiau mūsų atliktoje analizėje nustatėme, kad didžioji dalis ląstelių, išskirtų iš menopauzės sulaukusių moterų kiaušidės žievinės dalies, yra fibroblastai, mezenchiminės kilmės ląstelės ir endotelinės ląstelės (Dadashzadeh *et al.*, 2022). Šios stromos ląstelės išskiria daugybę augimo veiksnių į aplinką, kurie, kaip žinoma, per parakrininius signalinius kelius daro didelę įtaką užuomazginių folikulų

aktyvavimui ir (arba) antrinės stadijos nesulaukusių folikulų brendimui. Šie jau seniai identifikuoti augimo veiksniai yra hepatocitų augimo veiksnys (Parrott *et al.*, 1994), transformuojantis *alfa* augimo veiksnys (Scurry *et al.*, 1994), bazinis fibroblastų augimo veiksnys (Almeida *et al.*, 2012), epidermio augimo veiksnys (Scurry *et al.*, 1994, į insuliną panašaus augimo veiksnys (Monget *et al.*, 1996), naviko nekrozės veiksnys *alfa* (Kaipia *et al.*, 1996), interleukinas-6 (Maeda *et al.*, 2007) ir kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (Danforth *et al.*, 2003). Tokie tyrimai rodo svarbią ląstelių ir folikulų sąveiką per sekretuojamus citokinus, augimo veiksnius ir hormonus, todėl yra būtina nustatyti tiek konkrečias ląstelių populiacijas, tiek specifinius jų sekretuojamus veiksnius, prisidedančius prie *in vitro* kokultūros sistemos dinamikos. Siekiant nustatyti kaSL ir folikulų sąveiką per sekretuojamas bioaktyvias molekules, būtų galima atlikti *in vitro* kultūros terpės sudėties pokyčių analizę panaudojant imunofermentinius tyrimus arba skysčių chromatografiją su masių spektrometrija (Chiswick *et al.*, 2012; Nakashima *et al.*, 2018). Tačiau nustatyti ląstelių populiacijas gali būti sudėtingesnė užduotis, nes net patys pažangiausi metodai, tokie kaip vienos ląstelės RNR sekoskaita, iki šiol nepadėjo pilnai charakterizuoti atskirų ląstelių subpopuliacijų žmogaus KA stromoje (Fan *et al.*, 2019; Wagner *et al.*, 2020).

Tokių ateities vaisingumo išsaugojimo technologijų vystymai ir jų taikymas kelia klausimą ar jau šiuo metu onkologijos centrai ir jų gydytojai ruošiasi tokiam progresui. Tam įvertinti, buvo atlikta Baltijos-Šiaurės regiono šalių vaikų onkologijos centrų apklausa, siekiant įvertinti juose esančias patvirtintas gaires dėl onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimo paslaugų – ar pacientai informuojami apie priešvėžinio gydymo padarinius vaisingumui, kokios vaisingumo išsaugojimo strategijos taikomos ir kokiems pacientams jos taikomos.

Gauti apklausos rezultatai leido išsamiai apibendrinti Šiaurės-Baltijos šalių situaciją. Buvo atskleista, jog visame regione yra aktyviai teikiamos vaikų iki 18 metų vaisingumo išsaugojimo paslaugos. Kiaušialąsčių ir KA šaldymas yra siūloma vaisingumo išsaugojimo strategija 80 % centrų, spermos šaldymas – visuose centruose, o sėklidės audinio šaldymas teikiamas tik 40 % centrų. Taip pat pastebėti skirtumai tarp vaisingumo išsaugojimo atrankos kriterijų bei žinių apie patvirtintas gaires. Tokie rezultatai atskleidžia nevienodą nacionalinių gairių sklaidą pačioje medikų visuomenėje ir gydytojų informuotumą apie jas šalies viduje, todėl yra būtina stiprinti komunikaciją onkologijos centruose.

Dauguma apklaustų centrų remiasi Šiaurės šalių tinklo rekomendacijomis, skirtomis vaisingumo išsaugojimui vaikams iki lytinės brandos ir jos sulaukus (*Recommendations*, 2015a ir 2015b). Tačiau neseniai

buvo paskelbtas tyrimas, kuriame buvo nurodyta, jog Lietuvoje bent vienas iš apklaustų vaikų onkologijos centrų pradėjo vadovautis *PanCareLIFE* konsorciumo ir *The International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group* rekomendacijomis (Stukaite-Ruibiene *et al.*, 2023). Duomenų apie vaisingumo gairių pokyčius Latvijoje ir Estijoje nebuvo gauta. Šiaurės šalių tinklo rekomendacijose yra pateikiamos bendros rekomendacijos dėl pacientų įtraukimo į vaisingumo išsaugojimo programas ir strategijų taikymo pagal lytinę brandą. Remiantis šiomis rekomendacijomis, vaikai iki lytinės brandos, kurie gauna gonadotoksinį gydymą, priskiriami labai didelės rizikos dėl nevaisingumo grupei, todėl jiems yra siūlomos eksperimentinėje stadijoje esančios reprodukcinio audinio (kiaušidės ar sėklidės) šaldymo procedūros, o lytinės brandos sulaukusiems pacientams yra pritaikomos suaugusiųjų indikacijos. Yra tarptautinis sutarimas, kad kaulų čiulpų transplantacija ir tiesioginė dubens srities radioterapija sukelia didelę nevaisingumo riziką, todėl šiems pacientams turėtų būti siūlomos vaisingumo išsaugojimo strategijos bei konsultacijos (Mulder *et al.*, 2021a ir 2021b). Šios apklausos rezultatai rodo, jog onkologijos centruose šie gydymo būdai taip pat yra įtraukti į vaisingumo išsaugojimo indikacijas.

Lyginant su kitomis tarptautinėmis vaisingumo išsaugojimo gairėmis, Šiaurės šalių tinklo rekomendacijose nėra nustatyta griežtų įtraukimo kriterijų priklausomai nuo gaunamos alkilinančių preparatų dozės. Europos *PanCareLIFE* konsorciumo rekomendacijose pateikiamos vidutinio pagrįstumo gairės dėl vaisingumo išsaugojimo paslaugų lytinės brandos nesulaukusiems pacientėms, kurios gauna $> 6000 - 8000 \text{ mg/m}^2$ bendrą ciklofosfamido ekvivalentinę dozę (CED) (Mulder *et al.*, 2021a) ir lytinės brandos nesulaukusiems berniukams, kuriems paskirta $> 4000 \text{ mg/m}^2$ CED (Mulder *et al.*, 2021b). Mūsų apklausoje vienas centras Norvegijoje nurodė būtent tokias stratifikavimo ribas. Panašias rekomendacijas galima matyti ir *American Oncofertility* konsorciumo gairėse: gaunama didesnė nei 4000 mg/m^2 CED berniukams, didesnė nei 12000 mg/m^2 CED lytinės brandos nesulaukusioms mergaitėms ir didesnė nei 8000 mg/m^2 CED lytinės brandos sulaukusioms mergaitėms, yra susijusi su didele nevaisingumo ar reprodukcinių audinių funkcijos nepakankamumo rizika ateityje (Meacham *et al.*, 2020). Švedijos nacionalinėse vaisingumo išsaugojimo rekomendacijose (*Recommendations*, 2015a ir 2015b) nurodoma, jog jeigu dėl gaunamos chemoterapijos dozės pacientas priskiriamas didelės rizikos dėl nevaisingumo grupei, jis automatiškai atitinka vaisingumo išsaugojimo kriterijus, o Suomijos nacionalinėse rekomendacijose iš viso jokių stratifikavimo ribų pagal gaunamą chemoterapijos dozę nėra (Pampanini *et al.*, 2024). Tai rodo standartizuotų vaisingumo išsaugojimo indikacijų ir nevaisingumo rizikos

stratifikavimo būtinybę, siekiant harmonizuoti jų panaudojimą klinikinėje praktikoje. Didžiausi sunkumai kuriant tokį rizikos stratifikavimo modelį – stoka patikimų klinikinių įrodymų, kurie apibrėžtų sterilizuojančią CED vaikų amžiaus pacientams, bei pilnos CED vertinimo sistemos – nėra įtraukiami visi alkalinantys preparatai, kurie įprastai naudojami vaikų onkologijoje.

Nors yra sutariama, jog konsultavimas yra neatsiejama onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimo dalis, apklausos tiek pasaulyje, tiek Lietuvoje rodo, jog pacientų ar jų tėvų nepasiekia naujausia ir reikalinga informacija arba jos nepakanka, kad būtų duodamas sutikimas tokioms procedūroms atlikti (Sullivan-Pyke *et al.*, 2018; Anazodo *et al.*, 2019; Omani-Samani *et al.*, 2021; Zobielaite *et al.*, 2022; Stukaite-Ruibiene *et al.*, 2023; Pampanini *et al.*, 2024). Pateikiant rašytinę informaciją apie vaisingumo išsaugojimo galimybes, gali būti naudinga ne tik pacientams ar jų tėvams, bet ir gydytojams, nes diagnozės metu gauta informacija apie onkologinę ligą dažnai pribloškia pacientus ir jų artimuosius, dėl ko kita (pvz. vaisingumo išsaugojimo) informacija nėra įsisavinama. Tai patvirtina ankstesnių tyrimų rezultatai, kurie atskleidė, jog net 45 % pacientų nepamena gavę informacijos apie vaisingumą ir galimus jo išsaugojimo būdus (Clasen *et al.*, 2024), o tik 41 % mūsų tyrime apklaustųjų patvirtino, jog pacientai ir jų tėvai gali rasti leidinukus jų centruose. Iš apklausos matome, jog dažniausios to priežastys yra paciento amžius, kalbos barjeras, laiko trūkumas ar tėvų susidomėjimo stoka, tačiau kitų mokslininkų atlikti tyrimai rodo, jog ir gydytojai susiduria su informacijos stoka, ypač kai yra kalbama apie jautrią pacientų grupę – vaikus (Terenziani *et al.*, 2014; Covelli *et al.*, 2019). Kylantys nesutarimai pačių mokslininkų ir medikų bendruomenėse dėl vaisingumo išsaugojimo indikacijų ir rekomendacijų dažnai turi reikšmės ir nedideliu skaičiumi tokių konsultacijų ir po jų sekančių procedūrų.

Pagrindinis vaisingumo išsaugojimo strategijų, tokių kaip reprodukcinių audinių užšaldymas, trūkumas – potencialių piktybinių ląstelių audinyje autotransplantacija (Grubliauskaite *et al.*, 2023a). Daugumos solidinių navikų metastazavimo į KA tikimybė yra mažesnė lyginant su hematologiniais navikais. Apklausos metu išsiaiškinome, jog net 50 % centrų siūlo reprodukcinių audinių užšaldymą pacientams, sergantiems leukemija, tačiau aiškus informacijos pateikimas ir konsultavimas yra itin svarbūs siekiant supažindinti pacientus ir jų tėvus apie šią eksperimentinę vaisingumo išsaugojimo strategiją ir su ja susijusias rizikas. Tiek pasaulyje, tiek šio disertacinio darbo metu buvo stengiamasi sukurti naujas strategijas, kaip atkurti vaisingumą jautriausioms pacientų grupėms, tačiau jų tolesnis validavimas ir tyrimai yra labai svarbūs ir reikalingi, siekiant platesnio jų pritaikymo klinikinėje praktikoje.

IŠVADOS

1. Šio tyrimo metu vertintas kiaušidės audinio lėto užšaldymo / greito atšildymo protokolas yra efektyvus ir saugus – atliktų histologinių, imunohistocheminių, molekulinų ir ksenotransplantacijos tyrimų rezultatai neparodė audinių vientisumo ir užląstelinio matrikso komponentų pažaidų, nesukėlė masinės audinio stromos ir folikulo ląstelių aktyvacijos bei neformavo piktybinių navikų. Kiaušidės audiniai išsaugo gyvybingumą bei gebėjimą saugiai prigyti transplantacijos metu.
2. *In vitro* kiaušidės audinių kultūrų mitybinės terpės praturtinimas skirtingais komponentais ir jų deriniais pagerina kiaušidės audinių atsistatymo po užšaldymo / atšildymo rezultatus:
 - a. mitybinės terpės papildymas VEGF-A 165 ir rutino deriniu reikšmingai sumažina *in vitro* kultūros citotoksiškumą ir sėkmingai atkuria progesterono sekreciją tiek po 36 val., tiek po 72 val. Inkubacijos.
 - b. standartinės mitybinės terpės papildymas VEGF-A 165 ir rutino deriniu prieš ksenotransplantaciją neturi reikšmingos įtakos kiaušidės audinių transplantacijai, tačiau tokiu būdu paveikti audiniai pasižymi geresne hibridine vaskuliarizacija bei demonstruoja nežymų pranašumą apsaugant audinio struktūrą (*COL6A1*, *COL18A1*, *FNI*) bei įvairios vystymosi stadijos folikulus (*FOXL2*, *CYP19A1*) nuo pažaidų (*CTFG*, *LOX*, *CASP3A*, *SOD1*), lyginant su standartinės mitybinės terpės poveikiu.
3. Dirbtinės kiaušidės konstravimas *in vitro* yra efektyvi alternatyva kiaušidės audinių transplantacijai:
 - a. kiaušidės audinio stromos ląstelių įtraukimas į dirbtinės kiaušidės modelį, reikšmingai pagerina užuomazginių ir tarpinių folikulų augimą bei gyvybingumą: folikulai ant kiaušidės audinio stromos ląstelių monosluoksniu išlaiko ~2 kartus didesnį skaičių aukščiausios gyvybingumo kategorijos folikulų bei jų žūva 2 kartus mažiau, lyginant su dirbtinės kiaušidės modeliu be stromos ląstelių.
 - b. dirbtinės kiaušidės modelyje ant kiaušidės audinio stromos ląstelių monosluoksniu vystosi reikšmingai didesnis užuomazginių / tarpinių folikulų skaičius į aukštesnės – pirminės ir antrinės – vystymosi stadijos folikulus, kurie pasižymi didesne hormonų sekrecija *in vitro*.

4. Atliktos apklausos rezultatai parodė, kad Šiaurės šalių pediatrinės hematologijos ir onkologijos draugijos narėse skiriasi onkologinių pacientų vaisingumo priežiūra ir / ar patvirtintos vaisingumo išsaugojimo klinikinės praktikos gairės, indikacijos ir taikomos strategijos, būtinas jų standartizavimas, siekiant įvesti nuoseklų pacientų konsultavimą, vieningą standartizuotą sistemą nevaisingumo rizikai įvertinti ir siekiant stiprinti tarptautinį bendradarbiavimą.

REKOMENDACIJOS

1. Taikytas lėto užšaldymo / greito atšildymo protokolas, išsaugojantis kiaušidžių audinio struktūrą, gyvybingumą, funkcionalumą bei folikulų vystymosi potencialą, atkuriant steroidogenezę *in vitro*, gali būti naudojamas moterų vaisingumo išsaugojimo tikslais.
2. Metastazavusių krūties audinio navikinių ląstelių paieškai kiaušidžių audinyje rekomenduotina taikyti greitesnį ir etiškai priimtinesnį metodą – specifinio miRNR profilio, iš 15-ios reikšmingai ($p < 0,05$, pokytis kartais > 4) pakitusios raiškos miRNR identifikavimą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abir R, Ben-Aharon I, Garor R, Yaniv I, Ash S, Stemmer SM, Ben-Haroush A, Freud E, Kravarusic D, Sapir O, Fisch B. Cryopreservation of in vitro matured oocytes in addition to ovarian tissue freezing for fertility preservation in paediatric female cancer patients before and after cancer therapy. *Hum Reprod.* 2016;31(4):750-62. doi: 10.1093/humrep/dew007
2. Abir R, Roizman P, Fisch B, Nitke S, Okon E, Orvieto R, Ben Rafael Z. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. *Hum Reprod.* 1999;14(5):1299-301. doi: 10.1093/humrep/14.5.1299. PMID: 10325281
3. Akino N, Wada-Hiraike O, Terao H, Honjoh H, Isono W, Fu H, Hirano M, Miyamoto Y, Tanikawa M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Oda K, Kawana K, Fujii T, Osuga Y. Activation of Nrf2 might reduce oxidative stress in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;470:96-104. doi: 10.1016/j.mce.2017.10.002
4. Al-Harbi B, Hendrayani SF, Silva G, Aboussekhra A. Let-7b inhibits cancer-promoting effects of breast cancer-associated fibroblasts through IL-8 repression. *Oncotarget.* 2018;9(25):17825-17838. doi:10.18632/oncotarget.24895
5. Almeida AP, Saraiva MVA, Alves Filho JG, Silva GM, Gonçalves RF, Brito IR, Silva AWB, Lima AKF, Cunha RMS, Silva JRV, et al. Gene expression and immunolocalization of fibroblast growth factor 2 in the ovary and its effect on the in vitro culture of caprine preantral ovarian follicles. *Reprod Domest Anim* 2012;47:20-25. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01793.x
6. Amorim CA, Shikanov A. The artificial ovary: current status and future perspectives. *Future Oncol.* 2016;12(20):2323-32. doi: 10.2217/fon-2016-0202
7. Anazodo A, Laws P, Logan S, Saunders C, Travaglia J, Gerstl B, Bradford N, Cohn R, Birdsall M, Barr R, Suzuki N, Takae S, Marinho R, Xiao S, Qiong-Hua C, Mahajan N, Patil M, Gunasheela D, Smith K, Sender L, Melo C, Almeida-Santos T, Salama M, Appiah L, Su I, Lane S, Woodruff TK, Pacey A, Anderson RA, Shenfield F, Ledger W, Sullivan E. How can we improve oncofertility care for patients? A systematic scoping review of current international practice and models of care. *Hum Reprod Update.* 2019;25(2):159-179. doi: 10.1093/humupd/dmy038
8. Andersen CY, Donnez J, Ernst E, Gook D, Pellicer A, Von Wolff M, Suzuki N, Roux C, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation in breast

cancer patients: glass half empty or glass half full? *Reprod Biomed Online*. 2025;50(1):104442. doi: 10.1016/j.rbmo.2024.104442

9. Ansere VA, Ali-Mondal S, Sathiaselvan R, Garcia DN, Isola JVV, Henseb JD, Saccon TD, Ocañas SR, Tooley KB, Stout MB, Schneider A, Freeman WM. Cellular hallmarks of aging emerge in the ovary prior to primordial follicle depletion. *Mech Ageing Dev* 2021;194:111425. doi: 10.1016/j.mad.2020.111425

10. Araújo VR, Duarte AB, Bruno JB, Pinho Lopes CA, de Figueiredo JR. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote*. 2013;21(3):295-304. doi: 10.1017/S0967199411000578

11. Asiabi P, Dolmans MM, Ambroise J, Camboni A, Amorim CA. In vitro differentiation of theca cells from ovarian cells isolated from postmenopausal ovaries. *Hum Reprod* 2020;35:2793-2807. doi: 10.1093/humrep/deaa246

12. Asadi E, Najafi A, Benson JD. Comparison of liquid nitrogen-free slow freezing protocols toward enabling a practical option for centralized cryobanking of ovarian tissue. *Cryobiology*. 2024;114:104836. doi: 10.1016/j.cryobiol.2023.104836

13. Azevedo AR, Pais AS, Almeida-Santos T, Pires VMR, Pessa P, Marques CC, Nolasco S, Castelo-Branco P, Prates JAM, Lopes-da-Costa L, Laranjo M, Botelho MF, Pereira RMLN, Pimenta JMBGA. Medical Grade Honey as a Promising Treatment to Improve Ovarian Tissue Transplantation. *Bioengineering (Basel)*. 2022;9(8):357. doi: 10.3390/bioengineering9080357

14. Azevedo AR, Pais AS, Almeida-Santos T, Pires VMR, Pessa P, Marques CC, Nolasco S, Castelo-Branco P, Prates JAM, Lopes-da-Costa L, Laranjo M, Botelho MF, Pereira RMLN, Pimenta JMBGA. Medical Grade Honey as a Promising Treatment to Improve Ovarian Tissue Transplantation. *Bioengineering (Basel)*. 2022;9(8):357. doi: 10.3390/bioengineering9080357

15. Backhus LE, Kondapalli LA, Chang RJ, Coutifaris C, Kazer R, Woodruff TK. Oncofertility consortium consensus statement: guidelines for ovarian tissue cryopreservation. *Cancer Treat Res*. 2007;138:235-239. doi:10.1007/978-0-387-72293-1_17

16. Banzhaf-Strathmann J, Edbauer D. Good guy or bad guy: the opposing roles of microRNA 125b in cancer. *Cell Commun Signal*. 2014;12:30. doi: 10.1186/1478-811X-12-30

17. Behl S, Joshi VB, Larson NB, Young MC, Bilal M, Walker DL, Khan Z, Granberg CF, Chattha A, Zhao Y. Vitrification versus slow freezing of human ovarian tissue: a systematic review and meta-analysis of histological

outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2023;40(3):455-464. doi: 10.1007/s10815-022-02692-w

18. Bertoli S, Picard M, Bérard E, Griessinger E, Larrue C, Mouchel PL, Vergez F, Tavitian S, Yon E, Ruiz J, Delabesse E, Luquet I, Linares LK, Saland E, Carroll M, Danet-Desnoyers G, Sarry A, Huguet F, Sarry JE, Récher C. Dexamethasone in hyperleukocytic acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2018;103(6):988-998. doi: 10.3324/haematol.2017.184267

19. Bilić K, Vilaj M, Golubić-Ćepulić B, Ježek D. Ovarian tissue bank. *Croat Med J.* 2021;62(3):297-299. doi:10.3325/cmj.2021.62.297

20. Brancati S, Gozzo L, Longo L, Vitale DC, Russo G, Drago F. Fertility Preservation in Female Pediatric Patients With Cancer: A Clinical and Regulatory Issue. *Front Oncol.* 2021;11:641450. doi:10.3389/fonc.2021.641450

21. Cacciottola L, Donnez J, Dolmans MM. Ovarian tissue damage after grafting: systematic review of strategies to improve follicle outcomes. *Reprod Biomed Online.* 2021;43(3):351-369. doi: 10.1016/j.rbmo.2021.06.019

22. Cacciottola L, Manavella DD, Amorim CA, Donnez J, Dolmans MM. In vivo characterization of metabolic activity and oxidative stress in grafted human ovarian tissue using microdialysis. *Fertil Steril.* 2018;110(3):534-544.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.009

23. Camboni A, Van Langendonck A, Donnez J, Vanacker J, Dolmans MM, Amorim CA. Alginate beads as a tool to handle, cryopreserve and culture isolated human primordial/primary follicles. *Cryobiology.* 2013;67(1):64-9. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.05.002

24. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry.* 1999;38(4):139-52. doi: 10.1002/(sici)1097-0320(19990815)38:4<139::aid-cyto1>3.0.co;2-h

25. Candelaria JI, Denicol AC. Assessment of ovarian tissue and follicular integrity after cryopreservation via slow freezing or vitrification followed by in vitro culture. *F S Sci.* 2024;5(2):154-162. doi: 10.1016/j.xfss.2023.10.004

26. Chen J, Todorov P, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P, Isachenko V. Construction and cryopreservation of an artificial ovary in cancer patients as an element of cancer therapy and a promising approach to fertility restoration. *Hum Fertil (Camb).* 2022;25(4):651-661. doi: 10.1080/14647273.2021.1885756

27. Chiswick EL, Duffy E, Japp B, Remick D. Detection and quantification of cytokines and other biomarkers. *Methods Mol Biol* 2012;844:15-30. doi: 10.1007/978-1-61779-527-5_2

28. Chiti MC, Dolmans MM, Hobeika M, Cernogoraz A, Donnez J, Amorim CA. A modified and tailored human follicle isolation procedure improves follicle recovery and survival. *J Ovarian Res.* 2017;10:71. doi: 10.1186/s13048-017-0366-8.
29. Chiti MC, Masciangelo R, Courtoy G, Vilela JMV, Amorim C. O-273 Impact of ovarian tissue transplantation on extracellular matrix remodelling. *Hum Reprod.* 2023;38(S1):dead093.327. doi: 10.1093/humrep/dead093.327
30. Cho IA, Lee YJ, Lee HJ, Choi IY, Shin JK, Lee SA, Lee JH, Choi WJ. Angiopoietin-1 and -2 and vascular endothelial growth factor expression in ovarian grafts after cryopreservation using two methods. *Clin Exp Reprod Med.* 2018;45(3):143-148. doi: 10.5653/cerm.2018.45.3.143.
31. Clasen NHZ, van der Perk MEM, Neggers SJMM, Bos AME, van den Heuvel-Eibrink MM. Experiences of Female Childhood Cancer Patients and Survivors Regarding Information and Counselling on Gonadotoxicity Risk and Fertility Preservation at Diagnosis: A Systematic Review. *Cancers (Basel).* 2023;15(7):1946. doi: 10.3390/cancers15071946
32. Cobo A, García-Velasco J, Domingo J, Pellicer A, Remohí J. Elective and Onco-fertility preservation: factors related to IVF outcomes. *Hum Reprod.* 2018;33(12):2222–2231. doi: 10.1093/humrep/dey321
33. Corkum KS, Rhee DS, Wafford QE, Demeestere I, Dasgupta R, Baertschiger R, Malek MM, Aldrink JH, Heaton TE, Weil BR, Madonna MB, Lautz TB. Fertility and hormone preservation and restoration for female children and adolescents receiving gonadotoxic cancer treatments: A systematic review. *J Pediatr Surg.* 2019;54(11):2200-2209. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2018.12.021
34. Covelli A, Facey M, Kennedy E, Brezden-Masley C, Gupta AA, Greenblatt E, Baxter NN. Clinicians' Perspectives on Barriers to Discussing Infertility and Fertility Preservation With Young Women With Cancer. *JAMA Netw Open.* 2019;2(11):e1914511. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.14511
35. Dadashzadeh A, Moghassemi S, Grubliauskaitė M, Vlieghe H, Brusa D, Amorim CA. Medium supplementation can influence the human ovarian cells in vitro. *J Ovarian Res* 2022;15:137. doi: 10.1186/s13048-022-01081-2
36. Dadashzadeh A, Moghassemi S, Shavandi A, Amorim CA. A review on biomaterials for ovarian tissue engineering. *Acta Biomater.* 2021;135:48-63. doi: 10.1016/j.actbio.2021.08.026
37. Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle

- growth in the rat ovary. *Biol Reprod* 2003;68:1736-1741. doi: 10.1095/biolreprod.101.000679
38. Das D, Arur S. Conserved insulin signaling in the regulation of oocyte growth, development, and maturation. *Mol Reprod Dev.* 2017;84(6):444-459. doi: 10.1002/mrd.22806
39. Dath C, Dethy A, Van Langendonck A, Van Eyck AS, Amorim CA, Luyckx V, Donnez J, Dolmans MM. Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells. *Hum Reprod.* 2011;26(6):1431-9. doi: 10.1093/humrep/der073
40. Demeestere, I. Overview of Fertility Preservation Approaches in Cancer Patients. In: Azim Jr, H., Demeestere, I., Peccatori, F. (eds) *Fertility Challenges and Solutions in Women with Cancer.* 2020 *Springer, Cham.* doi: 10.1007/978-3-030-24086-8_4
41. Devine PJ, Perreault SD, Luderer U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biol Reprod.* 2012;86(2):27. doi: 10.1095/biolreprod.111.095224
42. Diaz-Garcia C, Herraiz S, Such E, Andres MDM, Villamon E, Mayordomo-Aranda E, Cervera JV, Sanz MA, Pellicer A. Dexamethasone does not prevent malignant cell reintroduction in leukemia patients undergoing ovarian transplant: risk assessment of leukemic cell transmission by a xenograft model. *Hum Reprod.* 2019;34(8):1485-1493. doi: 10.1093/humrep/dez115
43. Dolmans MM, Amorim CA. FERTILITY PRESERVATION: Construction and use of artificial ovaries. *Reproduction* 2019;158:F15-25. doi: 10.1530/REP-18-0536
44. Dolmans MM, Cordier F, Amorim CA, Donnez J, Vander Linden C. *In vitro* Activation Prior to Transplantation of Human Ovarian Tissue: Is It Truly Effective? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:520. doi: 10.3389/fendo.2019.00520
45. Dolmans MM, Donnez J, Cacciottola L. Fertility Preservation: The Challenge of Freezing and Transplanting Ovarian Tissue. *Trends Mol Med.* 2021;27(8):777-791. doi: 10.1016/j.molmed.2020.11.003
46. Donnez J, Dolmans MM, Demyelle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonck A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet.* 2004;364(9443):1405-10. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17222-X
47. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(12):735-749. doi:10.1038/nrendo.2013.205

48. 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. doi:10.1007/s10815-015-0544-9
49. Eijkenboom L, Mulder C, van der Reijden B, van Mello N, van Leersum J, Koorenhof-Scheele T, Braat D, Beerendonk C, Peek R. Purging human ovarian cortex of contaminating leukaemic cells by targeting the mitotic catastrophe signalling pathway. *J Assist Reprod Genet.* 2021;38(6):1571-1588. doi: 10.1007/s10815-021-02081-9
50. 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(4):911-914. doi:10.1016/j.ejca.2012.09.028
51. Fabbri R, Macciocca M, Vicenti R, Pasquinelli G, Caprara G, Valente S, Seracchioli R, Paradisi R. Long-term storage does not impact the quality of cryopreserved human ovarian tissue. *J Ovarian Res.* 2016a;9(1):50. doi: 10.1186/s13048-016-0261-8
52. Fabbri R, Vicenti R, Macciocca M, Martino NA, Dell'Aquila ME, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Seracchioli R, Paradisi R. Morphological, ultrastructural and functional imaging of frozen/thawed and vitrified/warmed human ovarian tissue retrieved from oncological patients. *Hum Reprod.* 2016b;31(8):1838-49. doi: 10.1093/humrep/dew134
53. Fabbri R, Vicenti R, Magnani V, Paradisi R, De Meis L, Raimondo D, Arena A, Venturoli S, Raffone A, Raspollini A, Seracchioli R. Ovarian tissue transplantation: 10 years of experience at the Bologna University. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024;15:1332673. doi: 10.3389/fendo.2024.1332673
54. Fan X, Bialecka M, Moustakas I, Lam E, Torrens-Juaneda V, Borggreven NV, Trouw L, Louwe LA, Pilgram GSK, Mei H, et al. Single-cell reconstruction of follicular remodeling in the human adult ovary. *Nat Commun* 2019;18;10:3164. doi: 10.1038/s41467-019-11036-9
55. Fan X, Chuva de Sousa Lopes SM. Molecular makeup of the human adult ovary. *Curr Opin Endocr.* 2021;18:187-93. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2021.03.016>
56. Fasano G, Dechène J, Antonacci R, Biramane J, Vannin AS, Van Langendonck A, Devreker F, Demeestere I. Outcomes of immature oocytes collected from ovarian tissue for cryopreservation in adult and prepubertal patients. *Reprod Biomed Online.* 2017;34(6):575-582. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.03.007

57. Fisch B, Abir R. Female fertility preservation: past, present and future. *Reproduction*. 2018;156(1):F11-F27. doi:10.1530/REP-17-0483
58. Fleischer RT, Vollenhoven BJ, Weston GC. The effects of chemotherapy and radiotherapy on fertility in premenopausal women. *Obstet Gynecol Surv*. 2011;66(4):248-254. doi:10.1097/OGX.0b013e318224e97b
59. Funayama Y, Sasano H, Suzuki T, Tamura M, Fukaya T, Yajima A. Cell turnover in normal cycling human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(2):828-34. doi: 10.1210/jcem.81.2.8636311
60. Gargus E, Deans R, Anazodo A, Woodruff TK. Management of Primary Ovarian Insufficiency Symptoms in Survivors of Childhood and Adolescent Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018;16(9):1137-1149. doi: 10.6004/jnccn.2018.7023
61. Gavish Z, Peer G, Roness H, Cohen Y, Meirow D. Follicle activation and 'burn-out' contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. *Hum Reprod*. 2014;29(5):989-96. doi: 10.1093/humrep/deu015. Erratum in: *Hum Reprod*. 2015;30(4):1003. doi: 10.1093/humrep/dev020
62. Gavish Z, Spector I, Peer G, Schlatt S, Wistuba J, Roness H, Meirow D. Follicle activation is a significant and immediate cause of follicle loss after ovarian tissue transplantation. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(1):61-69. doi: 10.1007/s10815-017-1079-z
63. Gęgotek A, Rybałowska-Kawałko P, Skrzydlewska E. Rutin as a Mediator of Lipid Metabolism and Cellular Signaling Pathways Interactions in Fibroblasts Altered by UVA and UVB Radiation. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:4721352. doi: 10.1155/2017/4721352
64. Gellert SE, Pors SE, Kristensen SG, Bay-Björn AM, Ernst E, Yding Andersen C. Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. *J Assist. Reprod. Genet*. 2018;35:561–570. doi: 10.1007/s10815-018-1144-2
65. Gertosio C, Magistrali M, Musso P, Meazza C, Bozzola M. Fertility Preservation in Pediatric Oncology Patients: New Perspectives. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 2018;7(3):263-269. doi: 10.1089/jayao.2017.0117
66. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod*. 1994;9(4):597-603. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a138556
67. Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of

- non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 1994;50(3):653-63. doi: 10.1095/biolreprod50.3.653
68. Green LJ, Zhou H, Padmanabhan V, Shikanov A. Adipose-derived stem cells promote survival, growth, and maturation of early-stage murine follicles. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):102. doi: 10.1186/s13287-019-1199-8
69. Griffin J, Emery BR, Huang I, Peterson CM, Carrell DT. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assist Reprod* 2006;3:2. doi: 10.1186/1743-1050-3-2
70. Grosbois J, Bailie EC, Kelsey TW, Anderson RA, Telfer EE. Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during in vitro culture. *Hum Reprod*. 2023;38(3):444-458. doi: 10.1093/humrep/dead008
71. Grosbois J, Demeestere I. Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during in vitro human follicle activation. *Hum Reprod*. 2018;33(9):1705-1714. doi: 10.1093/humrep/dey250
72. Grubliauskaite M, van der Perk MEM, Bos AME, Meijer AJM, Gudleviciene Z, van den Heuvel-Eibrink MM, Rascon J. Minimal Infiltrative Disease Identification in Cryopreserved Ovarian Tissue of Girls with Cancer for Future Use: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2023a;15(17):4199. doi: 10.3390/cancers15174199
73. Grubliauskaitė M, Vlieghe H, Moghassemi S, Dadashzadeh A, Camboni A, Gudlevičienė Ž, Amorim CA. Influence of ovarian stromal cells on human ovarian follicle growth in a 3D environment. *Hum Reprod Open*. 2023b;2024(1):hoad052. doi: 10.1093/hropen/hoad052
74. Gu R, Ge N, Huang B, Fu J, Zhang Y, Wang N, Xu Y, Li L, Peng X, Zou Y, Sun Y, Sun X. Impacts of vitrification on the transcriptome of human ovarian tissue in patients with gynecological cancer. *Front Genet*. 2023;14:1114650. doi: 10.3389/fgene.2023.1114650
75. Gudlevičienė Ž, Plioplytė R, Baušytė R, Barakauskienė A. Vaisingumo išsaugojimo būdai pacientėms su diagnozuota onkologine liga. *Lietuvos akušerija ir ginekologija*. 2014;17(2):124-134
76. Gudlevičienė Ž, Žilinskas K, Kundrotas G, Grubliauskaitė M, Baltriukienė D, Bukelskienė V. Slow-Freezing Cryopreservation Ensures High Ovarian Tissue Quality Followed by In Vivo and In Vitro Methods and Is Safe for Fertility Preservation. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(10):547. doi: 10.3390/medicina56100547.

77. Harp R, Leibach J, Black J, Keldahl C, Karow A. Cryopreservation of murine ovarian tissue. *Cryobiology*. 1994;31(4):336-343. doi:10.1006/cryo.1994.1040
78. Henry L, Labied S, Fransolet M, Kirschvink N, Blacher S, Noel A, Foidart JM, Nisolle M, Munaut C. Isoform 165 of vascular endothelial growth factor in collagen matrix improves ovine cryopreserved ovarian tissue revascularisation after xenotransplantation in mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:12. doi: 10.1186/s12958-015-0015-2
79. Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodríguez B, Díaz C, Sánchez-Serrano M, Mirabet V, Pellicer A. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil Steril*. 2014;101(3):775-84. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.016
80. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:89–102. doi:10.1038/nrm3270
81. Hickman LC, Valentine LN, Falcone T. Preservation of gonadal function in women undergoing chemotherapy: a review of the potential role for gonadotropin-releasing hormone agonists. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(4):415-22. doi: 10.1016/j.ajog.2016.06.053
82. Hoekman EJ, Smit VT, Fleming TP, Louwe LA, Fleuren GJ, Hilders CG. Searching for metastases in ovarian tissue before autotransplantation: a tailor-made approach. *Fertil Steril*. 2015;103(2):469-77. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.11.001
83. Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, Woodruff TK. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. *Hum Reprod*. 2012;27(6):1801-10. doi: 10.1093/humrep/der468
84. Hourvitz A, Yerushalmi GM, Maman E, Raanani H, Elizur S, Brengauz M, Orvieto R, Dor J, Meirow D. Combination of ovarian tissue harvesting and immature oocyte collection for fertility preservation increases preservation yield. *Reprod Biomed Online*. 2015;31(4):497-505. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.06.025
85. https://health.ec.europa.eu/non-communicable-diseases/cancer_en
86. Huang JY, Tulandi T, Holzer H, Tan SL, Chian RC. Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. *Fertil Steril*. 2008;89(3):567-72. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.090

87. Hughes T, Harper A, Gupta S, Frazier AL, van der Graaf WTA, Moreno F, Joseph A, Fidler-Benaoudia MM. The current and future global burden of cancer among adolescents and young adults: a population-based study. *Lancet Oncol.* 2024;25(12):1614-1624. doi: 10.1016/S1470-2045(24)00523-0
88. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA.* 2008;14(11):2348-60. doi: 10.1261/rna.1034808
89. Yasmin E, Balachandren N, Davies MC, Jones GL, Lane S, Mathur R, Webber L, Anderson RA; British Fertility Society. Fertility preservation for medical reasons in girls and women: British fertility society policy and practice guideline. *Hum Fertil (Camb).* 2018;21(1):3-26. doi: 10.1080/14647273.2017.1422297
90. Youm HW, Lee J, Kim EJ, Kong HS, Lee JR, Suh CS, Kim SH. Effects of Angiopoietin-2 on Transplanted Mouse Ovarian Tissue. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166782. doi: 10.1371/journal.pone.0166782
91. Younis AJ, Lerer-Serfaty G, Stav D, Sabbah B, Shochat T, Kessler-Icekson G, Zahalka MA, Shacher-Goldenberg M, Ben-Haroush A, Fisch B, et al. Extracellular-like matrices and leukaemia inhibitory factor for in vitro culture of human primordial follicles. *Reprod Fertil Dev* 2017;29:1982-1994. doi: 10.1071/RD16233
92. Islam N, Ugwoke SP, Alhamdan R, Medrano JH, Campbell BK, Marsters P, Maalouf WE. Steroids and miRNAs in assessment of ovarian tissue damage following cryopreservation. *J Mol Endocrinol.* 2019;JME-18-0237.R2. doi: 10.1530/JME-18-0237
93. Itami S, Yasuda K, Yoshida Y, Matsui C, Hashiura S, Sakai A, Tamotsu S. Co-culturing of follicles with interstitial cells in collagen gel reproduce follicular development accompanied with theca cell layer formation. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:159. doi: 10.1186/1477-7827-9-159
94. Ito K, Takae S, Nakamura K, Furuyama S, Nakajima M, Suzuki Y, Iwahata H, Sugishita Y, Horage Y, Suzuki N. The study of the efficiency of in vitro maturation of ovarian tissue oocytes in pediatric patients. *J Assist Reprod Genet.* 2023;40(12):2787-2797. doi: 10.1007/s10815-023-02958-x
95. Itoh T, Hoshi H. Efficient isolation and long-term viability of bovine small preantral follicles in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000;36:235-240. doi: 10.1290/1071-2690(2000)036<0235:EIALTV>2.0.CO;2

96. Jensen AK, Kristensen SG, Macklon KT, Jeppesen JV, Fedder J, Ernst E, Andersen CY. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. *Hum Reprod*. 2015;30(12):2838-2845. doi:10.1093/humrep/dev230
97. Ji F, Wang Y, Qiu L, Li S, Zhu J, Liang Z, Wan Y, Di W. Hypoxia inducible factor 1 α -mediated LOX expression correlates with migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Int J Oncol*. 2013;42(5):1578-88. doi: 10.3892/ijo.2013.1878
98. Kaipia A, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Tumor necrosis factor- α and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. *Endocrinology* 1996;137:4864-4870. doi: 10.1210/endo.137.11.8895358
99. Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(12):849-64. doi: 10.1038/nrc3166
100. Keegan THM, Abrahão R, Alvarez EM. Survival Trends Among Adolescents and Young Adults Diagnosed With Cancer in the United States: Comparisons With Children and Older Adults. *J Clin Oncol*. 2024;42(6):630-641. doi: 10.1200/JCO.23.01367
101. Khattak H, Malhas R, Craciunas L, Afifi Y, Amorim CA, Fishel S, Silber S, Gook D, Demeestere I, Bystrova O, Lisyanskaya A, Manikhas G, Lotz L, Dittrich R, Colmorn LB, Macklon KT, Hjorth IMD, Kristensen SG, Gallos I, Coomarasamy A. Fresh and cryopreserved ovarian tissue transplantation for preserving reproductive and endocrine function: a systematic review and individual patient data meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2022;28(3):400-416. doi: 10.1093/humupd/dmac003
102. Kim J, Perez AS, Claflin J, David A, Zhou H, Shikanov A. Synthetic hydrogel supports the function and regeneration of artificial ovarian tissue in mice. *NPJ Regen Med*. 2016b;1:16010–. doi: 10.1038/npjregenmed.2016.10
103. Kim SY, Kim SK, Lee JR, Woodruff TK. Toward precision medicine for preserving fertility in cancer patients: existing and emerging fertility preservation options for women. *J Gynecol Oncol*. 2016a;27(2):e22. doi: 10.3802/jgo.2016.27.e22
104. Kinnear HM, Tomaszewski CE, Chang FL, Moravek MB, Xu M, Padmanabhan V, Shikanov A. The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction* 2020;160:R25-R39. doi: 10.1530/REP-19-0501
105. Kniazeva E, Hardy AN, Boukaidi SA, Woodruff TK, Jeruss JS, Shea LD. Primordial Follicle Transplantation within Designer Biomaterial Grafts

Produce Live Births in a Mouse Infertility Model. *Sci Rep*. 2015;5:17709. doi: 10.1038/srep17709

106. Komatsu K, Masubuchi S. Increased supply from blood vessels promotes the activation of dormant primordial follicles in mouse ovaries. *J Reprod Dev*. 2020;66(2):105-113. doi: 10.1262/jrd.2019-091

107. Kong Q, Todorov P, Pei C, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann-Gottschalk N, Isachenko V. Positive Effect of Elevated Thawing Rate for Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: Transcriptomic Analysis of Fresh and Cryopreserved Cells. *Int J Mol Sci*. 2024;25(24):13747. doi: 10.3390/ijms252413747

108. Laronda MM, Duncan FE, Hornick JE, Xu M, Pahnke JE, Whelan KA, Shea LD, Woodruff TK. Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue. *J Assist Reprod Genet* 2014;31:1013-1028. doi: 10.1007/s10815-014-0252-x

109. Larsen EC, Devidas M, Chen S, Salzer WL, Raetz EA, Loh ML, Mattano LA Jr, Cole C, Eicher A, Haugan M, Sorenson M, Heerema NA, Carroll AA, Gastier-Foster JM, Borowitz MJ, Wood BL, Willman CL, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL. Dexamethasone and High-Dose Methotrexate Improve Outcome for Children and Young Adults With High-Risk B-Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From Children's Oncology Group Study AALL0232. *J Clin Oncol*. 2016;34(20):2380-8. doi: 10.1200/JCO.2015.62.4544

110. Lee S, Cho HW, Kim B, Lee JK, Kim T. The Effectiveness of Anti-Apoptotic Agents to Preserve Primordial Follicles and Prevent Tissue Damage during Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2534. doi: 10.3390/ijms22052534

111. Lee S, Ryu KJ, Kim B, Kang D, Kim YY, Kim T. Comparison between Slow Freezing and Vitrification for Human Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13):3346. doi: 10.3390/ijms20133346

112. Lengyel E, Li Y, Weigert M, Zhu L, Eckart H, Javellana M, Ackroyd S, Xiao J, Olalekan S, Glass D, Iyer S, Krishnan R, Bilecz AJ, Lastra R, Chen M, Basu A. A molecular atlas of the human postmenopausal fallopian tube and ovary from single-cell RNA and ATAC sequencing. *Cell Rep*. 2022;41(12):111838. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111838

113. Li L, Shi X, Shi Y, Wang Z. The Signaling Pathways Involved in Ovarian Follicle Development. *Front Physiol*. 2021;12:730196. doi: 10.3389/fphys.2021.730196

114. Li XY, Luo QF, Wei CK, Li DF, Li J, Fang L. MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(1):32-40. PMID: 24482686.
115. Lierman S, Bus A, Andries S, Trias E, Bols PEJ, Tilleman K. Passive slow freezing is an efficacious and cost-effective alternative to controlled slow freezing for ovarian tissue cryopreservation. *Cryobiology*. 2021;100:164-172. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.01.013
116. Lierman S, Tilleman K, Cornelissen M, De Vos WH, Weyers S, T'Sjoen G, Cuvelier CA, De Sutter P. Follicles of various maturation stages react differently to enzymatic isolation: a comparison of different isolation protocols. *Reprod Biomed Online*. 2015;30(2):181-90. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.10.009
117. Lins TLBG, Barberino RS, Monte APO, Pinto JGC, Campinho DSP, Palheta RC Jr, Matos MHT. Rutin promotes activation and reduces apoptosis of primordial follicles by regulating Akt phosphorylation after in vitro culture of ovine ovarian tissue. *Theriogenology*. 2021;173:64-72. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.07.018
118. Lliberos C, Liew SH, Mansell A, Hutt KJ. The inflammasome contributes to depletion of the ovarian reserve during aging in mice. *Front Cell Dev Biol* 2021;8:628473. doi: 10.3389/fcell.2020.628473
119. Logan S, Perz J, Ussher JM, Peate M, Anazodo A. Systematic review of fertility-related psychological distress in cancer patients: Informing on an improved model of care. *Psychooncology*. 2019;28(1):22-30. doi:10.1002/pon.4927
120. Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, Quinn G, Wallace WH, Oktay K; American Society of Clinical Oncology. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(19):2500-10. doi: 10.1200/JCO.2013.49.2678
121. Luo H, Jiang BH, King SM, Chen YC. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. *Nutr Cancer*. 2008;60(6):800-9. doi: 10.1080/01635580802100851
122. Macklon KT, De Vos M. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in breast cancer patients: time to stop? *Reprod Biomed Online*. 2024;49(1):103939. doi: 10.1016/j.rbmo.2024.103939
123. Macklon KT, Ernst E, Andersen AN, Andersen CY. Cryobanking of human ovarian tissue: Do women still want their tissue stored beyond 5 years? *Reprod Biomed Online*. 2014;29(4):452-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.06.016

124. Maeda A, Inoue N, Matsuda-Minehata F, Goto Y, Cheng Y, Manabe N. The role of interleukin-6 in the regulation of granulosa cell apoptosis during follicular atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev* 2007;53:481-490. doi: 10.1262/jrd.18149
125. Mahajan N. Fertility preservation in female cancer patients: An overview. *J Hum Reprod Sci.* 2015;8(1):3-13. doi:10.4103/0974-1208.153119
126. Maidarti M, Anderson RA, Telfer EE. Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt Signalling and DNA Damage in the Oocyte: Implications for Primordial Follicle Activation, Oocyte Quality and Ageing. *Cells.* 2020;9(1):200. doi: 10.3390/cells9010200
127. Marder W, Fisseha S, Ganser MA, Somers EC. Ovarian Damage During Chemotherapy in Autoimmune Diseases: Broad Health Implications Beyond Fertility. *Clin Med Insights Reprod Health* 2012;2012(6):9-18. doi: 10.4137/CMRH.S10415
128. Marin L, Bedoschi G, Kawahara T, Oktay KH. History, Evolution and Current State of Ovarian Tissue Auto-Transplantation with Cryopreserved Tissue: a Successful Translational Research Journey from 1999 to 2020. *Reprod Sci.* 2020;27(4):955-962. doi:10.1007/s43032-019-00066-9
129. Marneros AG, Olsen BR. Physiological role of collagen XVIII and endostatin. *FASEB J.* 2005;19(7):716-28. doi: 10.1096/fj.04-2134rev
130. Masciangelo R, Hossay C, Chiti MC, Manavella DD, Amorim CA, Donnez J, Dolmans MM. Role of the PI3K and Hippo pathways in follicle activation after grafting of human ovarian tissue. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37(1):101-108. doi: 10.1007/s10815-019-01628-1
131. McLaughlin M, Albertini DF, Wallace WHB, Anderson RA, Telfer EE. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Mol Hum Reprod.* 2018;24(3):135-142. doi: 10.1093/molehr/gay002
132. Meacham LR, Burns K, Orwig KE, Levine J. Standardizing Risk Assessment for Treatment-Related Gonadal Insufficiency and Infertility in Childhood Adolescent and Young Adult Cancer: The Pediatric Initiative Network Risk Stratification System. *J Adolesc Young Adult Oncol.* 2020;9(6):662-666. doi: 10.1089/jayao.2020.0012
133. Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol.* 2010;53(4):727-39. doi: 10.1097/GRF.0b013e3181f96b54
134. Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian

tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med.* 2005;353(3):318-21. doi: 10.1056/NEJMc055237

135. Moghassemi S, Dadashzadeh A, Camboni A, Feron O, Azevedo RB, Amorim CA. *Ex vivo* purging of cancer cells from ovarian tissue using photodynamic therapy: a novel strategy to restore fertility in leukemia patients. *Hum Reprod Open.* 2023;2023(2):hoad005. doi: 10.1093/hropen/hoad005

136. Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C, Monniaux D. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. *Horm Res* 1996;45:211-217. doi: 10.1159/000184790

137. Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update.* 2012;18(5):525-35. doi: 10.1093/humupd/dms022

138. Morris RT. A Case of Heteroplastic Ovarian Grafting, Followed by Pregnancy, and the Delivery of a Living Child, with Discussion. *Buffalo Med J.* 1907;62(7):393-402

139. Mouloungui E, Zver T, Roux C, Amiot C. A protocol to isolate and qualify purified human preantral follicles in cases of acute leukemia, for future clinical applications. *J Ovarian Res.* 2018;11(1):4. doi: 10.1186/s13048-017-0376-6

140. Mulder CL, Eijkenboom LL, Beerendonk CCM, Braat DDM, Peek R. Enhancing the safety of ovarian cortex autotransplantation: cancer cells are purged completely from human ovarian tissue fragments by pharmacological inhibition of YAP/TAZ oncoproteins. *Hum Reprod.* 2019;34(3):506-518. doi: 10.1093/humrep/dey384

141. Mulder RL, Font-Gonzalez A, Hudson MM, van Santen HM, Loeffen EAH, Burns KC, Quinn GP, van Dulmen-den Broeder E, Byrne J, Haupt R, Wallace WH, van den Heuvel-Eibrink MM, Anazodo A, Anderson RA, Barnbrock A, Beck JD, Bos AME, Demeestere I, Denzer C, Di Iorgi N, Hoefgen HR, Kebudi R, Lambalk C, Langer T, Meacham LR, Rodriguez-Wallberg K, Stern C, Stutz-Grunder E, van Dorp W, Veening M, Veldkamp S, van der Meulen E, Constine LS, Kenney LB, van de Wetering MD, Kremer LCM, Levine J, Tissing WJE; PanCareLIFE Consortium. Fertility preservation for female patients with childhood, adolescent, and young adult cancer: recommendations from the PanCareLIFE Consortium and the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group. *Lancet Oncol.* 2021;22(2):e45-e56. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30594-5

142. Muñoz C, Juárez G, Muñoz ML, Portnow J, Fineman I, Badie B, Mamelak A, Ferrell B. The quality of life of patients with malignant gliomas and their caregivers. *Soc Work Health Care*. 2008;47(4):455-78. doi: 10.1080/00981380802232396
143. Muñoz M, Santaballa A, Seguí MA, Beato C, de la Cruz S, Espinosa J, Fonseca PJ, Perez J, Quintanar T, Blasco A. SEOM Clinical Guideline of fertility preservation and reproduction in cancer patients (2016). *Clin Transl Oncol*. 2016;18(12):1229-1236. doi: 10.1007/s12094-016-1587-9
144. Nagashima T, Kim J, Li Q, Lydon JP, DeMayo FJ, Lyons KM, Matzuk MM. Connective tissue growth factor is required for normal follicle development and ovulation. *Mol Endocrinol*. 2011;25(10):1740-59. doi: 10.1210/me.2011-1045
145. Nakashima Y, Nahar S, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Toyoda Z, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Fujita J, Noguchi H. A liquid chromatography with tandem mass spectrometry-based proteomic analysis of the proteins secreted by human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2018;27:1469-1494. doi: 10.1177/0963689718795096
146. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod*. 1996;11(7):1487-1491. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a019423
147. Nguyen QN, Zerafa N, Liew SH, Morgan FH, Strasser A, Scott CL, Findlay JK, Hickey M, Hutt KJ. Loss of PUMA protects the ovarian reserve during DNA-damaging chemotherapy and preserves fertility. *Cell Death Dis*. 2018;9(6):618. doi: 10.1038/s41419-018-0633-7
148. Nogueira D, Fajau-Prevot C, Clouet M, Assouline P, Deslandres M, Montagut M. Outcomes of Different In Vitro Maturation Procedures for Oocyte Cryopreservation for Fertility Preservation and yet Another Live Birth in a Cancer Patient. *Life (Basel)*. 2023;13(6):1355. doi: 10.3390/life13061355
149. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 2004;363(9412):837-40. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15728-0
150. 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(12):1490-1493. doi:10.1001/jama.286.12.1490
151. Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS, Wallace WH, Wang ET, Loren AW. Fertility Preservation in Patients

- With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(19):1994-2001. doi: 10.1200/JCO.2018.78.1914
152. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med*. 2000;342(25):1919. doi: 10.1056/NEJM200006223422516
 153. Oktay K, Newton H, Gosden RG. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fertil Steril*. 2000;73(3):599-603. doi:10.1016/s0015-0282(99)00548-8
 154. Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*. 1998;13(5):1133-1138. doi:10.1093/humrep/13.5.1133
 155. Oktem O, Alper E, Balaban B, Palaoglu E, Peker K, Karakaya C, Urman B. Vitrified human ovaries have fewer primordial follicles and produce less antimüllerian hormone than slow-frozen ovaries. *Fertil Steril*. 2011;95(8):2661-4.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.12.057
 156. Olesen HØ, Pors SE, Adrados CS, Zeuthen MC, Mamsen LS, Pedersen AT, Kristensen SG. Effects of needle puncturing on re-vascularization and follicle survival in xenotransplanted human ovarian tissue. *Reprod Biol Endocrinol*. 2023;21(1):28. doi: 10.1186/s12958-023-01081-x
 157. Omani-Samani R, Vesali S, Navid B, Mohajeri M, Rafsanjani KA, Aghamaleki SZN, Mohammadi M. Adult cancer patients and parents of younger cancer patients have little information about fertility preservation: a survey of knowledge and attitude. *Middle East Fertil Soc J*. 2021;26(1):25. doi: 10.1186/s43043-021-00072-5
 158. Onions VJ, Mitchell MR, Campbell BK, Webb R. Ovarian tissue viability following whole ovine ovary cryopreservation: assessing the effects of sphingosine-1-phosphate inclusion. *Hum Reprod*. 2008 Mar;23(3):606-18. doi: 10.1093/humrep/dem414
 159. Ouni E, Nedbal V, Da Pian M, Cao H, Haas KT, Peaucelle A, Van Kerk O, Herinckx G, Marbaix E, Dolmans MM, Tuuri T, Ojala M, Amorim CA, Vertommen D. Proteome-wide and matrisome-specific atlas of the human ovary computes fertility biomarker candidates and open the way for precision oncofertility. *Matrix Biol*. 2022;109:91-120. doi: 10.1016/j.matbio.2022.03.005
 160. Ouni E, Peaucelle A, Haas KT, Van Kerk O, Dolmans MM, Tuuri T, Ojala M, Amorim CA. A blueprint of the topology and mechanics of the human ovary for next-generation bioengineering and diagnosis. *Nat Commun*. 2021;12(1):5603. doi: 10.1038/s41467-021-25934-4

161. Ovali E, Ozdemir F, Aydin F, Kavgaci H, Tekelioglu Y, Büyükcelik A, Yilmaz M. The effects of dexamethasone on leukemic cells derived from patients with AML. *J Exp Clin Cancer Res*. 2003 Mar;22(1):85-9. PMID: 12725327
162. Pampanini V, Sahlin L, Holopainen E, Taskinen M, Koskela M, Vettenranta K, Vettenranta J, Laine T, Anderson C, Jahnukainen K. Factors Influencing the Timing of Ovarian Tissue Cryopreservation in Young Girls. *Reprod Fertil*. 2024;5(4):e240032. doi: 10.1530/RAF-24-0032
163. Parrott JA, Vigne JL, Chu BZ, Skinner MK. Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology* 1994;135:569-575. doi: 10.1210/endo.135.2.8033804
164. Patel S, Henshaw CA, Alvarez IP, Dunn TN, McKenzie L, Woodard TL, Detti L. Reviewing the upper age limit for ovarian cryopreservation in oncologic and non-oncologic populations. *Fertil Steril*. 2024;122(4):e96. doi: 10.1016/j.fertnstert.2024.07.335
165. Peek R, Eijkenboom LL, Braat DDM, Beerendonk CCM. Complete Purging of Ewing Sarcoma Metastases from Human Ovarian Cortex Tissue Fragments by Inhibiting the mTORC1 Signaling Pathway. *J Clin Med*. 2021nulder;10(19):4362. doi: 10.3390/jcm10194362
166. Pellegrini FR, De Martino S, Fianco G, Ventura I, Valente D, Fiore M, Trisciuglio D, Degrassi F. Blockage of autophagosome-lysosome fusion through SNAP29 O-GlcNAcylation promotes apoptosis via ROS production. *Autophagy*. 2023;19(7):2078-2093. doi: 10.1080/15548627.2023.2170962
167. Poirot C, Abirached F, Prades M, Coussieu C, Bernaudin F, Piver P. Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 2012;379(9815):588. doi:10.1016/S0140-6736(11)61781-9
168. Póvoa A, Xavier P, Calejo L, Soares S, Sousa M, Silva J, Sousa S, Barros A, Beires J. First transplantation of cryopreserved ovarian tissue in Portugal, stored for 10 years: an unexpected indication. *Reprod Biomed Online*. 2016;32(3):334-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.12.002
169. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: asrm@asrm.org. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2019;112(6):1022-33. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.09.013
170. Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte

cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril*. 2013;99(1):37–43. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.09.028

171. Rahimi G, Isachenko V, Kreienberg R, Sauer H, Todorov P, Tawadros S, Mallmann P, Nawroth F, Isachenko E. Re-vascularisation in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;149(1):63–7. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.11.015

172. Ramos L, Galbinski S, Nacul A, Jiménez MF, Frantz N, Bos-Mikich A. Detailed Morphological Analysis of Cryoinjury in Human Ovarian Tissue Following Vitrification or Slow Freezing. *Reprod Sci*. 2022;29(8):2374–2381. doi: 10.1007/s43032-021-00716-x

173. Recommendations, N. Recommendations on Fertility preservation for girls and young women with childhood cancer. 2012 2015a; Available from: <https://pho.barnlakarforeningen.se/wp-content/uploads/sites/20/2019/11/PM-SALUB-Fertility-preservation-for-girls-and-young-women-1.2.pdf>

174. Recommendations, N. Recommendations on Fertility preservation for boys and young men with childhood cancer. 2012 2015b; Available from: <https://pho.barnlakarforeningen.se/wp-content/uploads/sites/20/2019/11/PM-SALUB-Fertility-preservation-for-boys-and-young-men-1.2.pdf>

175. Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(2):96–103. doi: 10.1016/j.tem.2009.10.001

176. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, Vanderpoel S, Racowsky C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2017;23(2):139–155. doi: 10.1093/humupd/dmw038

177. Rios PD, Kniazeva E, Lee HC, Xiao S, Oakes RS, Saito E, Jeruss JS, Shikanov A, Woodruff TK, Shea LD. Retrievable hydrogels for ovarian follicle transplantation and oocyte collection. *Biotechnol Bioeng*. 2018;115(8):2075–2086. doi: 10.1002/bit.26721

178. Rivas Leonel EC, Lucci CM, Amorim CA. Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: A Review. *Transfus Med Hemother*. 2019;46(3):173–181. doi: 10.1159/000499054

179. Rodrigues AQ, Picolo VL, Goulart JT, Silva IMG, Ribeiro RB, Aguiar BA, Ferreira YB, Oliveira DM, Lucci CM, de Bem AF, Paulini F. Metabolic activity in cryopreserved and grafted ovarian tissue using high-

resolution respirometry. *Sci Rep.* 2021;11: 21517.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-01082-z>

180. Ruan X. Chinese Society of Gynecological Endocrinology affiliated to the International Society of Gynecological Endocrinology Guideline for Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation. *Gynecol Endocrinol.* 2018;34(12):1005-1010. doi:10.1080/09513590.2018.1488957

181. Sanger N, John J, Einkenkel R, Schallmoser A. First report on successful delivery after retransplantation of vitrified, rapid warmed ovarian tissue in Europe. *Reprod Biomed Online.* 2024;103940. doi.org/10.1016/j.rbmo.2024.103940

182. Sarabadani M, Tavana S, Mirzaeian L, Fathi R. Co-culture with peritoneum mesothelial stem cells supports the in vitro growth of mouse ovarian follicles. *J Biomed Mater Res A* 2021;109:2685-2694. doi: 10.1002/jbm.a.37260

183. Schallmoser A, Einkenkel R, Färber C, Emrich N, John J, Sängner N. The effect of high-throughput vitrification of human ovarian cortex tissue on follicular viability: a promising alternative to conventional slow freezing? *Arch Gynecol Obstet.* 2023a;307(2):591-599. doi: 10.1007/s00404-022-06797-6

184. Schallmoser A, Einkenkel R, Färber C, Hüren V, Emrich N, John J, Sängner N. Comparison of angiogenic potential in vitrified vs. slow frozen human ovarian tissue. *Sci Rep.* 2023b;13(1):12885. doi: 10.1038/s41598-023-39920-x

185. Schallmoser A, Einkenkel R, Färber C, Sängner N. In vitro growth (IVG) of human ovarian follicles in frozen thawed ovarian cortex tissue culture supplemented with follicular fluid under hypoxic conditions. *Arch Gynecol Obstet* 2022;306:1299-1311. doi :10.1007/s00404-022-06672-4

186. Schröder CP, Timmer-Bosscha H, Wijchman JG, de Leij LF, Hollema H, Heineman MJ, de Vries EG. An in vitro model for purging of tumour cells from ovarian tissue. *Hum Reprod.* 2004;19(5):1069-75. doi: 10.1093/humrep/deh244

187. Scurry JP, Hamand KA, Astley SB, Leake RE, Wells M. Immunoreactivity of antibodies to epidermal growth factor, transforming growth factors alpha and beta, and epidermal growth factor receptor in the premenopausal ovary. *Pathology* 1994;26:130-133. doi: 10.1080/00313029400169351

188. Segers I, Bardhi E, Mateizel I, Van Moer E, Schots R, Verheyen G, Tournaye H, De Vos M. Live births following fertility preservation using in-

vitro maturation of ovarian tissue oocytes. *Hum Reprod.* 2020;35(9):2026-2036. doi: 10.1093/humrep/deaa175

189. Shapira M, Raanani H, Barshack I, Amariglio N, Derech-Haim S, Marciano MN, Schiff E, Orvieto R, Meirow D. First delivery in a leukemia survivor after transplantation of cryopreserved ovarian tissue, evaluated for leukemia cells contamination. *Fertil Steril.* 2018;109(1):48-53. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.09.001

190. Shin SY, Lee JY, Lee E, Choi J, Yoon BK, Bae D, Choi D. Protective effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) in frozen-thawed granulosa cells is mediated by inhibition of apoptosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;125(2):233-8. doi: 10.1016/j.ejogrb.2005.10.027

191. Shiratsuki S, Hara T, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Low oxygen level increases proliferation and metabolic changes in bovine granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;437:75-85. doi: 10.1016/j.mce.2016.08.010

192. Shiroma ME, Damous LL, Cotrim FP, Roa CL, Cipolla-Neto J, Reiter RJ, Baracat EC, Soares JM Jr. Pretreatment with melatonin improves ovarian tissue cryopreservation for transplantation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2021;19(1):17. doi: 10.1186/s12958-021-00705-4

193. Silber SJ, DeRosa M, Goldsmith S, Fan Y, Castleman L, Melnick J. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: results from one center in the USA. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(12):2205-2213. doi: 10.1007/s10815-018-1315-1

194. Simon LE, Kumar TR, Duncan FE. In vitro ovarian follicle growth: a comprehensive analysis of key protocol variables†. *Biol Reprod* 2020;103:455-470. doi: 10.1093/biolre/ioaa073

195. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. Aromatase--a brief overview. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:93-127. doi: 10.1146/annurev.physiol.64.081601.142703

196. Smith RM, Woodruff TK, Shea LD. Designing follicle-environment interactions with biomaterials. *Cancer Treat Res.* 2010;156:11-24. doi: 10.1007/978-1-4419-6518-9_2

197. Soares M, Sahrari K, Amorim CA, Saussoy P, Donnez J, Dolmans MM. Evaluation of a human ovarian follicle isolation technique to obtain disease-free follicle suspensions before safely grafting to cancer patients. *Fertil Steril.* 2015;104(3):672-80.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.05.021

198. Soares M, Saussoy P, Maskens M, Reul H, Amorim CA, Donnez J, Dolmans MM. Eliminating malignant cells from cryopreserved ovarian tissue

is possible in leukaemia patients. *Br J Haematol.* 2017;178(2):231-239. doi: 10.1111/bjh.14657

199. Society for Assisted Reproductive Technology. Clinic summary report 2021. https://www.sartcorsonline.com/rptCSR_PublicMultYear.aspx

200. Soliman NA, Yussif SM. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biol Med.* 2016;13(4):496-504. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066

201. Spears N, Lopes F, Stefansdottir A, Rossi V, De Felici M, Anderson RA, Klinger FG. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Hum Reprod Update.* 2019;25(6):673-693. doi: 10.1093/humupd/dmz027

202. Stukaite-Ruibiene E, Jurkonis M, Adomaitis R, Bumbuliene Z, Gudleviciene Z, Verkauskas G, Zagminas K, Vaiciuniene R, Rascon J. A crosscut survey on reproductive health in Lithuanian childhood cancer survivors. *Ginekol Pol.* 2021;92(4):262-270. doi: 10.5603/GP.a2021.0027

203. Stukaite-Ruibiene E, van der Perk MEM, Vaitkeviciene GE, Bos AME, Bumbuliene Z, van den Heuvel-Eibrink MM, Rascon J. Evaluation of oncofertility care in childhood cancer patients: the EU-Horizon 2020 twinning project TREL initiative. *Front Pediatr.* 2023;11:1212711. doi: 10.3389/fped.2023.1212711

204. Sullivan-Pyke CS, Carlson CA, Prewitt M, Gracia CR, Ginsberg JP. Ovarian tissue cryopreservation (OTC) in prepubertal girls and young women: an analysis of parents' and patients' decision-making. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(4):593-600. doi: 10.1007/s10815-018-1123-7

205. Sun TC, Liu XC, Yang SH, Song LL, Zhou SJ, Deng SL, Tian L, Cheng LY. Melatonin Inhibits Oxidative Stress and Apoptosis in Cryopreserved Ovarian Tissues via Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Front Mol Biosci.* 2020;7:163. doi: 10.3389/fmolb.2020.00163

206. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, Morimoto Y, Kawamura K. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2015;30(3):608-15. doi: 10.1093/humrep/deu353

207. Tagler D, Tu T, Smith RM, Anderson NR, Tingen CM, Woodruff TK, Shea LD. Embryonic fibroblasts enable the culture of primary ovarian follicles within alginate hydrogels. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1229-1238. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0418

208. Tagler DJ, Shea LD, Woodruff TK. Contributions of ovarian stromal cells to follicle culture. In: Donnez J, Kim SS, eds. Principles and Practice of Fertility Preservation. *Cambridge University Press*; 2011:409-420

209. Tan JX, Finkel T. A phosphoinositide signalling pathway mediates rapid lysosomal repair. *Nature*. 2022;609(7928):815-821. doi: 10.1038/s41586-022-05164-4
210. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod*. 2008;23(5):1151-8. doi: 10.1093/humrep/den070
211. Terenziani M, Spinelli M, Jankovic M, Bardi E, Hjorth L, Haupt R, Michel G, Byrne J; PanCare Network. Practices of pediatric oncology and hematology providers regarding fertility issues: a European survey. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(11):2054-8. doi: 10.1002/pbc.25163
212. The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation Anderson RA, Amant F, Braat D, D'Angelo A, Chuva de Sousa Lopes SM, Demeestere I, Dwek S, Frith L, Lambertini M, Maslin C, Moura-Ramos M, Nogueira D, Rodriguez-Wallberg K, Vermeulen N. ESHRE guideline: female fertility preservation. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(4): hoaa052, doi: 10.1093/hropen/hoaa052
213. Thuwanut P, Leonel ECR, Rocha Ruiz TF, Sirayapiwat P, Kristensen SG, Amorim CA. Human ovarian tissue xenotransplantation: advancements, challenges, and future perspectives. *Hum Reprod*. 2025;deae291. doi: 10.1093/humrep/deae291
214. Tian Y, Fu X, Li Q, Wang Y, Fan D, Zhou Q, Kuang W, Shen L. MicroRNA-181 serves an oncogenic role in breast cancer via the inhibition of SPRY4. *Mol Med Rep*. 2018 Dec;18(6):5603-5613. doi: 10.3892/mmr.2018.9572. Epub 2018 Oct 22. Retraction in: *Mol Med Rep*. 2022 May;25(5):157. doi: 10.3892/mmr.2022.12673
215. Tingen CM, Kiesewetter SE, Jozefik J, Thomas C, Tagler D, Shea L, Woodruff TK. A macrophage and theca cell-enriched stromal cell population influences growth and survival of immature murine follicles in vitro. *Reproduction* 2011;141:809-820. doi: 10.1530/REP-10-0483
216. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 1983;305(5936):707-9. doi:10.1038/305707a0
217. van Eyck AS, Bouzin C, Feron O, Romeu L, Van Langendonck A, Donnez J, Dolmans MM. Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. *Fertil Steril*. 2010;93(5):1676-85. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.04.048
218. van Eyck AS, Jordan BF, 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(1):374-81. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.05.012
219. van Kalsbeek RJ, Hudson MM, Mulder RL, Ehrhardt M, Green DM, Mulrooney DA, Hakkert J, den Hartogh J, Nijenhuis A, van Santen HM, Schouten-van Meeteren AYN, van Tinteren H, Verbruggen LC, Conklin HM, Jacola LM, Webster RT, Partanen M, Kollen WJW, Grootenhuis MA, Pieters R, Kremer LCM; International Childhood Cancer Outcome Project participants. A joint international consensus statement for measuring quality of survival for patients with childhood cancer. *Nat Med*. 2023;29(6):1340-1348. doi: 10.1038/s41591-023-02339-y
220. van Langendonck A, Romeu L, Ambroise J, Amorim C, Bearzatto B, Gala JL, Donnez J, Dolmans MM. Gene expression in human ovarian tissue after xenografting. *Mol Hum Reprod*. 2014;20(6):514-25. doi: 10.1093/molehr/gau015
221. Vanacker J, Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Amorim CA. First transplantation of isolated murine follicles in alginate. *Regen Med*. 2014;9(5):609-19. doi: 10.2217/rme.14.33
222. Vasse J, Fiscus J, Fraison E, Salle B, David L, Labrune E. Biomedical properties of the ovarian tissue and their impact on the activation of follicular growth: a narrative review. *Reprod Biomed Online*. 2024;104450. doi: 10.1016/j.rbmo.2024.104450
223. Vlieghe H, Leonel ECR, Asiabi P, Amorim CA. The characterization and therapeutic applications of ovarian theca cells: An update. *Life Sci*. 2023;317:121479. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121479
224. von Wolff M, Andersen CY, Woodruff TK, Nawroth F. FertiPROTEKT, Oncofertility Consortium and the Danish Fertility-Preservation Networks - What Can We Learn From Their Experiences?. *Clin Med Insights Reprod Health*. 2019;13:1179558119845865. doi:10.1177/1179558119845865
225. von Wolff M, Bruckner T, Strowitzki T, Germeyer A. Fertility preservation: ovarian response to freeze oocytes is not affected by different malignant diseases-an analysis of 992 stimulations. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(9):1713–1719. doi: 10.1007/s10815-018-1227-0
226. von Wolff M, Stute P, Flück C. Autologous transplantation of cryopreserved ovarian tissue to induce puberty-the endocrinologists' view. *Eur J Pediatr*. 2016;175(12):2007-2010. doi:10.1007/s00431-016-2771-1
227. Wagner M, Yoshihara M, Douagi I, Damdimopoulos A, Panula S, Petropoulos S, Lu H, Pettersson K, Palm K, Katayama S, et al. Single-cell

- analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells. *Nat Commun* 2020;11:1147. doi: 10.1038/s41467-020-14936-3
228. Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One*. 2010;5(1):e8772. doi: 10.1371/journal.pone.0008772
229. Wallace WH, Smith AG, Kelsey TW, Edgar AE, Anderson RA. Fertility preservation for girls and young women with cancer: population-based validation of criteria for ovarian tissue cryopreservation. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):1129-36. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70334-1
230. Wang TR, Yan LY, Yan J, Lu CL, Xia X, Yin TL, Zhu XH, Gao JM, Ding T, Hu WH, Guo HY, Li R, Qiao J. Basic fibroblast growth factor promotes the development of human ovarian early follicles during growth in vitro. *Hum Reprod*. 2014;29(3):568-76. doi: 10.1093/humrep/det465
231. Wang W, Pei C, Isachenko E, Zhou Y, Wang M, Rahimi G, Liu W, Mallmann P, Isachenko V. Automatic Evaluation for Bioengineering of Human Artificial Ovary: A Model for Fertility Preservation for Prepubertal Female Patients with a Malignant Tumor. *Int J Mol Sci*. 2022;23(20):12419. doi: 10.3390/ijms232012419
232. Wang W, Todorov P, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P, Wang M, Isachenko V. In vitro activation of cryopreserved ovarian tissue: A single-arm meta-analysis and systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021;258:258-264. doi: 10.1016/j.ejogrb.2021.01.014
233. Webb AE, Brunet A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(4):159-69. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.003
234. Wu Y, Sun Z, Wang Y, Chen H, Bian J. Human dermal fibroblasts support the development of human primordial/primary follicles in a 3-dimensional alginate matrix culture system. *Ann Transl Med* 2021;9:868. doi: 10.21037/atm-21-2125
235. Xiao S, Zhang J, Romero MM, Smith KN, Shea LD, Woodruff TK. In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation. *Sci Rep* 2015;5:17323. doi: 10.1038/srep17323
236. Xie H, Xiao R, He Y, He L, Xie C, Chen J, Hong Y. MicroRNA-100 inhibits breast cancer cell proliferation, invasion and migration by targeting FOXA1. *Oncol Lett*. 2021;22(6):816. doi: 10.3892/ol.2021.13077
237. Zhang D, Fang X, Xia W, Sun Q, Zhang X, Qi Y, Yu Y, Zhou Z, Du D, Tao C, Wang Z, Li J. Rutin enhances mitochondrial function and improves the developmental potential of vitrified ovine GV-stage oocyte.

- Theriogenology*. 2024;229:214-224. doi: 10.1016/j.theriogenology.2024.08.029
238. Zhang JM, Sheng Y, Cao YZ, Wang HY, Chen ZJ. Effects of cooling rates and ice-seeding temperatures on the cryopreservation of whole ovaries. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28(7):627-33. doi: 10.1007/s10815-011-9557-1
239. Zhang JM, Wang HC, Wang HX, Ruan LH, Zhang YM, Li JT, Tian S, Zhang YC. Oxidative stress and activities of caspase-8, -9, and -3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;166(1):52-5. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.09.011
240. Zobielaityė V, Vaitkevičienė GE, Rascon J, Bumbulienė Ž. Žinios ir požiūris į onkologinę ligą sergančių mergaičių vaisingumo išsaugojimą. *Lietuvo akušerija ir ginekologija*. 2022;22(2). doi: [10.37499/LAG.898](https://doi.org/10.37499/LAG.898)
241. Žilinskas K, Kairys I, Gudlevičienė Ž, Samalavičius NE. Jatrogeninės menopauzės prevencijos ir vaisingumo išsaugojimo būdai moterims, sergančioms kolorektaliniu vėžiu. *Lietuvos chirurgija*. 2016;15(2–3):90–5. doi: 10.15388/LietChirur.2016.2-3.10085

PRIEDAI



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. infor@cr.vu.lt.

Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.

Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705, el. p. mf@mf.vu.lt.

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2014-07-08 Nr.158200-14-743-260

Tyrimo pavadinimas:

Onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimo programa

Protokolo Nr.: III-2014-1

Versija: 2

Data: 2014-07-04

Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma :

Versija: 2

Data: 2014-07-04

Pagrindiniai tyrėjai: Živilė Gudlevičienė

Įstaigos pavadinimas: Vilniaus universiteto Onkologijos institutas (VUOI)

Adresas: Santariškių 1, Vilnius

Įstaigos pavadinimas: Biobankas

Adresas: P. Baublio 3b, Vilnius

Įstaigos pavadinimas: Vilniaus universiteto Biochemijos institutas (Bchl)

Adresas: Mokslininkų g. 12, Vilnius

Leidimas galioja iki: 2019-12-31

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2014/07), vykusio 2014 m. liepos mėn. 8 d., sprendimu.

Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. dr. Laimutė Jakavonytė	filosofija	taip
2	prof.dr. Jolanta Dadonienė	epidemiologija, medicina	ne
3	doc.dr. Jaunius Gumbis	teisė	ne
4	Genovaitė Bulzgytė	slauga	taip
5	Laura Linkevičienė	odontologija	taip
6	prof.dr. Augustina Jankauskienė	medicina	taip
7	dr. Laura Malinauskienė	medicina	taip
8	Eglė Zubienė	psichologija	ne
9	Ugnė Sakūnienė	pacientų teisės	ne

Pirmininkė



Laura Malinauskienė

P1 pav. Lietuvos regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas (Nr. 158500-14-743-260) atlikti biomedicininį tyrimą.

Biomedicininio tyrimo „Onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimo programa“ 2019-11-18 Nr. 2019-LP-53
pagrindinei tyrėjai Živilei Gudlevičienei.

Leidimo Nr. 158200-14-743-260 papildymo Nr. 1

PRITARIMAS

Vilniaus regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas susipažino su Jūsų prašymu leisti keisti/papildyti biomedicininio tyrimo „*Onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimo programa*“, leidimą Nr. 158200-14-743-260, išduotą 2014-07-08 d. Ekspertai pritaria, kad:

- Tyrimas būtų pratęstas iki 2023-12-31 d.;
- Įtraukta nauja tyrėja - Monika Grubliauskaitė;
- Iš tyrimo išbraukti tyrėjai, kurie jau nedirba NVI ir nedalyvauja tyrime - Gabrielis Kundrotas, Elona Jankauskaitė, Tatjana Rakovskaja, m. dr. Algimantas Sruogis, Arūnas Kulboka, Žygimantas Kardelis, Alvydas Vėželis, Rasa Jarašienė.

Pirmininkas



prof. dr. (HP) Saulius Vosylius

P2 pav. Lietuvos regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto leidimo Nr. 158500-14-743-260 papildymas Nr. 1.

VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA

LEIDIMAS
ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROJEKTĄ

2019-04-25 Nr. G2-107

Vilnius

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentinių ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. specialusis leidimas, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2019-04-09 išvada Nr. 6 „Dėl leidimo atlikti bandymo su gyvūnais projektą“,

leidžiama šiam ukiui subjektui atlikti bandymo su gyvūnais projektą:

duomenys apie ūkio subjektą:

pavadinimas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras,

adresas Saulėtekio al. 7, Vilnius,

kodas Juridinių asmenų registre 211950810;

duomenys apie bandymo su gyvūnais projektą:

pavadinimas „Onkologinių pacientų reprodukcinį audinių, skirtų retransplantacijai, saugumo tyrimas“;

vadovas Daiva Baltriukienė,

naudojami gyvūnai 15 pelių;

duomenys apie bandymo su gyvūnais projekto atlikimo vietą:

pavadinimas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras,

adresas Saulėtekio al. 7, Vilnius.

Duomenys apie veterinarinius vaistus, vaistinius preparatus ar kitas medžiagas (toliau – vaistai), kurie bus naudojami vykdant bandymo su gyvūnais projektą*:

Eil. Nr.	Vaisto pavadinimas	Gamintojas	Vaistinė forma	Kiekis, reikalingas vykdant bandymo su gyvūnais projektą
1.	ISOFLURIN 100 mg/ml	Chemical Iberica PV, S. L.	Injekcinis tirpalas	20 ml
2.	RYCARFA 50 mg/ml	KRKA	Injekcinis tirpalas	4ml
3.	LIQUIDB and Optima	Advanced Medical Solutions Limited	gelis	1 ml

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą (toliau – leidimas) galioja iki 2019 m. gegužės 31 d.

Direktoriaus pavaduotojas

Vidmantas Paulauskas

* – Nurodomi naudojamo (-ų) vaisto (-ų) pavadinimas (-ai), gamintojas (-ai), vaistinė (-ės) forma (-os), kiekis, reikalingas vykdant bandymo su gyvūnais projektą. Jei vykdant bandymo su gyvūnais projektą vaistai gyvūnams nenaudojami, leidime įrašomas žodis „Nenaudojami“.

P3 pav. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą Nr. G2-107.

VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA

LEIDIMAS ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROJEKTĄ

2022-06- Nr. G2-214
Vilnius

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. *specialusis leidimas*, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2022-05-19 išvada dėl 2022-04-25 Nr. B5-4143 Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto paraiškos dėl bandymo su gyvūnais procedūrų projekto „Onkologinių pacientų reprodukcinį audinių, skirtų vaisingumo atkūrimui, aktyvacijos ir saugumo tyrimai“.

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą:

duomenys apie ūkio subjektą (-us):

pavadinimas Vilniaus universitetas,

adresas Saulėtekio al. 7, Vilnius,

kodas Juridinių asmenų registre 211950810;

duomenys apie bandymo su gyvūnais projektą:

pavadinimas „Onkologinių pacientų reprodukcinį audinių, skirtų vaisingumo atkūrimui, aktyvacijos ir saugumo tyrimai“;

vadovas Monika Grubliauskaitė,

naudojami gyvūnai 10 pelių;

duomenys apie bandymo su gyvūnais projekto atlikimo vietą:

pavadinimas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras,

adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius.

Duomenys apie veterinarinius vaistus, vaistinius preparatus ar kitas medžiagas (toliau – vaistai),

kurie bus naudojami vykdančio bandymo su gyvūnais projektą*:

Eil. Nr.	Vaisto pavadinimas	Gamintojas	Vaistinė forma	Kiekis, reikalingas vykdančiam bandymui su gyvūnais
1.	Rycarfa, 50 mg/ml	KRKA (Slovenija)	Injekcinis tirpalas	1 fasuotė
2.	Isoflurin, 1000 mg/g	CHEMICAL IBERICA PV, S.L. (Ispanija)	Įkvėpjamieji garai, skystis	50 ml
3.	Paviršiniai odos klajai: Liquilind® Optima, 0,5 g	Advanced Medical Solutions Limited (Jungtinė Karalystė)	Klijai	2 fasuotės
4.	Artelac, gelis akims NIGHTTIME, 10 g	Bausch & Lomb (Vokietija)	Gelis	1 fasuotė

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą (toliau – leidimas) galioja nuo 2022-07-01 iki 2022-11-01.

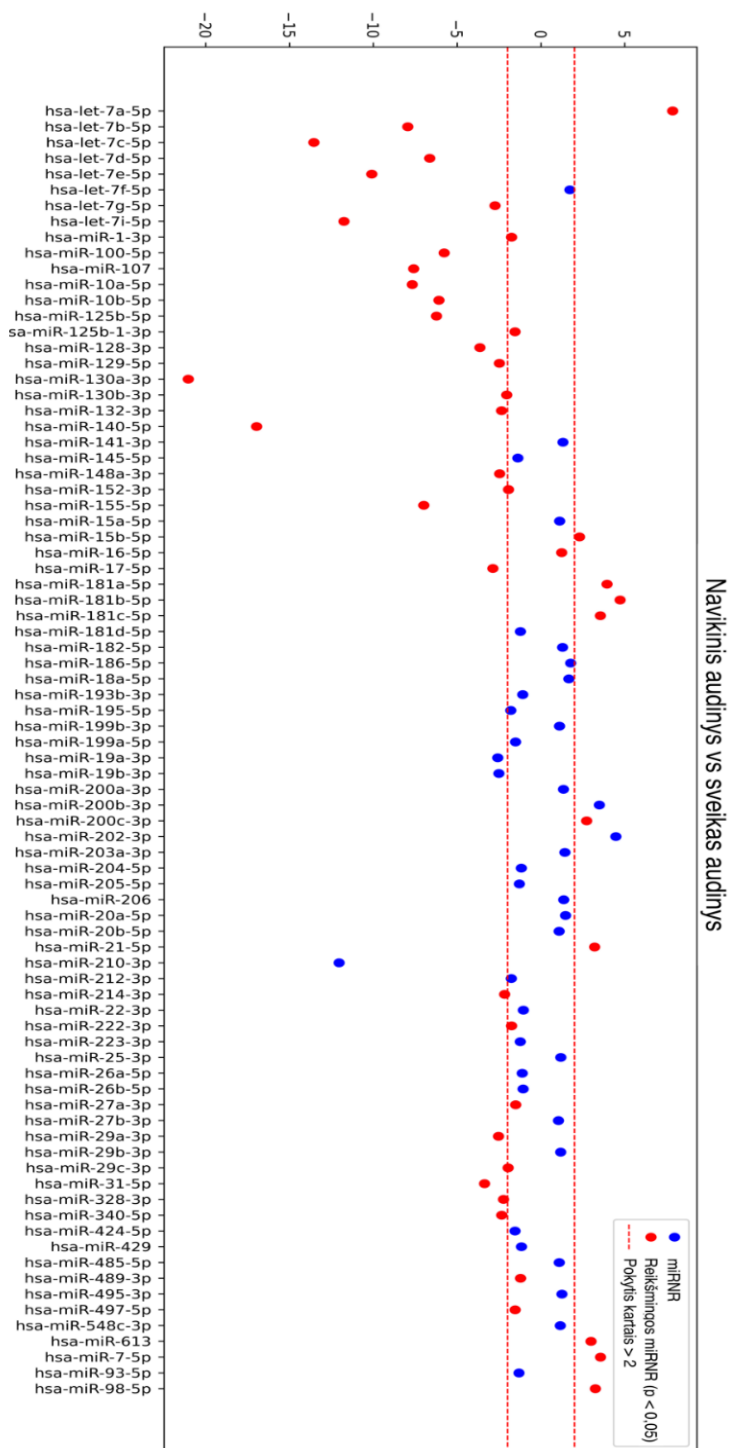
Direktoriaus pavaduotojas,
pavadojantis direktoriu



Deividas Kliučinskas

* – Nurodomi naudojami (-ų) vaistai (-ų) pavadinimas (-ai), gamintojas (-ai), vaistinė (-ės) forma (-os), kiekis, reikalingas vykdančiam bandymui su gyvūnais projektą. Jei vykdančiam bandymui su gyvūnais projektą vaistai gyvūnams nenaudojami, leidime įrašomas žodis „Nenaudojama“

P4 pav. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą Nr. G2-214.



P5 pav. Navikinio ir sveiko krūties audinio miRNR raiškos skirtumai. Raudona linija rodo miRNR raiškos pokytį bent 2 kartus, raudoni taškai rodo statistiškai reikšmingus pokyčius ($p < 0,05$), mėlyni – nereikšmingus.

P1 lentelė. MiRNR sąrašas, kurių raiškos pokytis yra reikšmingas (pokytis kartais > 4, $p < 0,05$), lyginant navikinį krūties audinį su sveiku krūties audinių ir atvirkščiai.

miRNR	Pokytis kartais (navikinis vs sveikas)	Pokytis kartais (sveikas vs navikinis)	p-reikšmė
hsa-let-7a-5p	7,86	-13,73	5×10^{-3}
hsa-let-7b-5p	-7,94	9,12	$1,49 \times 10^{-7}$
hsa-let-7c-5p	-13,54	14,12	$1,05 \times 10^{-7}$
hsa-let-7d-5p	-6,63	6,36	$1,72 \times 10^{-5}$
hsa-let-7e-5p	-10,09	6,77	1×10^{-3}
hsa-let-7i-5p	-11,75	8,63	4×10^{-4}
hsa-miR-100-5p	-5,77	4,4	1×10^{-3}
hsa-miR-107	-7,59	10,26	$7,21 \times 10^{-5}$
hsa-miR-10a-5p	-7,67	8,11	$8,16 \times 10^{-8}$
hsa-miR-10b-5p	-6,08	6,45	$9,04 \times 10^{-8}$
hsa-miR-125b-5p	-6,23	4,72	1×10^{-3}
hsa-miR-130a-3p	-21,03	16,91	$7,16 \times 10^{-5}$
hsa-miR-140-5p	-16,97	17,5	$1,57 \times 10^{-7}$
hsa-miR-155-5p	-6,98	6,72	$1,39 \times 10^{-5}$
hsa-miR-181b-5p	4,72	-4,16	$1,08 \times 10^{-7}$

P2 lentelė. Kiaušidės audinyje nustatytų miRNR sąrašas, kurių raiškos pokytis yra reikšmingas (pokytis kartais > 2, $p < 0,05$), lyginant su sveiko krūties audinio kontrole.

miRNR	Pokytis kartais	Pokytis reguliavimo*	p-reikšmė
hsa-miR-1-3p	18,98	18,98	0,03
hsa-miR-202-3p	27,66	27,66	2×10^{-3}
hsa-miR-204-5p	6,57	6,57	0,02
hsa-miR-222-3p	7,94	7,94	0,05
hsa-miR-495-3p	6,53	6,53	0,04
hsa-miR-15a-5p	0,34	-2,96	0,02

hsa-miR-182-5p	$4,93 \times 10^{-3}$	-202,76	$2,886 \times 10^{-11}$
hsa-miR-200a-3p	$1,66 \times 10^{-3}$	-600,61	$1,909 \times 10^{-5}$
hsa-miR-200b-3p	$2,84 \times 10^{-3}$	-351,8	$6,356 \times 10^{-6}$
hsa-miR-200c-3p	$1,38 \times 10^{-3}$	-722,55	$1,688 \times 10^{-14}$
hsa-miR-205-5p	$5,16 \times 10^{-5}$	-19375,48	$1,355 \times 10^{-5}$
hsa-miR-31-5p	0,04	-24,74	0,01
hsa-miR-429	0,01	-83,49	7×10^{-3}

*perskaiciuota panaudojus formulę $1/(-\text{pokytis kartais})$, siekiant atspindėti biologinę prasmę (kai pokyčio kartais reikšmė > 1).

P3 lentelė. Kiaušidės audinyje nustatytų miRNR sąrašas, kurių raiškos pokytis yra reikšmingas (pokytis kartais > 2 kartai, $p < 0,05$), lyginant su navikinio krūties audinio kontrole.

miRNR	Pokytis kartais	Pokytis reguliavimo*	p-reikšmė
hsa-miR-1-3p	22,39	22,39	0,02
hsa-miR-202-3p	4,16	4,16	8×10^{-3}
hsa-miR-204-5p	5,17	5,17	0,02
hsa-miR-222-3p	9,35	9,35	0,04
hsa-miR-495-3p	3,51	3,51	0,05
hsa-miR-15a-5p	0,20	-4,91	$3,47 \times 10^{-4}$
hsa-miR-181a-5p	0,39	-2,53	0,05
hsa-miR-182-5p	$2,57 \times 10^{-3}$	-388,55	$1,67 \times 10^{-6}$
hsa-miR-200a-3p	$8,31 \times 10^{-4}$	-1202,6	$1,65 \times 10^{-6}$
hsa-miR-200b-3p	$5,48 \times 10^{-4}$	-1824,91	$1,65 \times 10^{-6}$
hsa-miR-200c-3p	$3,41 \times 10^{-4}$	-2933,91	$1,64 \times 10^{-6}$
hsa-miR-203a-3p	0,24	-4,18	$4,22 \times 10^{-5}$
hsa-miR-205-5p	$4,47 \times 10^{-5}$	-22489,2	$1,64 \times 10^{-6}$
hsa-miR-206	0,38	-2,64	0,02
hsa-miR-31-5p	0,09	-10,93	$4,59 \times 10^{-5}$

hsa-miR-429	$9,34 \times 10^{-3}$	-107,04	$1,8 \times 10^{-6}$
hsa-miR-7-5p	0,18	-5,68	$4,41 \times 10^{-4}$
hsa-miR-96-5p	0,01	-81,97	$1,85 \times 10^{-6}$

*perskaiciuota panaudojus formulę $1/(-\text{pokytiis kartais})$, siekiant atspindėti biologinę prasmę (kai pokyčio kartais reikšmė > 1).

P4 lentelė. Nustatytų miRNR, kurių raiška (raiškos pokytis > 2 , $p < 0,05$) didesnė, genų-taikinių biologinių procesų GO terminų praturtinimo analizė. KAD – klaidingų atradimų dažnis.

KAD	Praturtinimo pokytis kartais	Biologinio proceso GO terminas	Genų-taikinių skaičius
$1,7 \times 10^{-4}$	5,5	Vystymosi reguliavimas	14
$1,84 \times 10^{-4}$	3,8	Raumenų struktūros vystymasis	20
$1,22 \times 10^{-4}$	3,4	Transferazės aktyvumo reguliavimas	25
$2,14 \times 10^{-4}$	2,7	Teigiamas vystymosi procesų reguliavimas	30
$4,67 \times 10^{-5}$	2,4	Ląstelių baltymų apykaitos procesų reguliavimas	47
$1,44 \times 10^{-4}$	2,2	Baltymų apykaitos procesų reguliavimas	47
$2,14 \times 10^{-4}$	2,2	Baltymų lokalizacija	44
$1,22 \times 10^{-4}$	2,1	Teigiamas azoto junginių apykaitos proceso reguliavimas	54
$1,7 \times 10^{-4}$	2,0	Teigiamas ląstelių medžiagų apykaitos proceso reguliavimas	55
$2,14 \times 10^{-4}$	1,8	Transportas	66

P5 lentelė. Nustatytų miRNR, kurių raiška (raiškos pokytis > 2 , $p < 0,05$) didesnė, genų-taikinių KEGG signalinių kelių praturtinimo analizė. KAD – klaidingų atradimų dažnis.

KAD	Praturtinimo pokytis kartais	Signalinis kelias	Genai
0,02	9,3	VEGF signalinis kelias	NFATC2 PIK3CB PIK3R1 PPP3R1
0,02	6,7	Progesterono sukeltas kiaušialąsčių brendimas	CPEB2 CPEB3 IGF1 PIK3CB PIK3R1
0,02	6,6	T-ląstelių receptorių signalinis kelias	IL10 NFATC2 PIK3CB PIK3R1 PPP3R1

0,02	6,6	C-tipo lektino receptoriaus signalinis kelias	IL10 NFATC2 PIK3CB PIK3R1 PPP3R1
0,02	6,3	HIF-1 signalinis kelias	CDKN1B EDN1 IGF1 PIK3CB PIK3R1
0,02	6,3	FoxO signalinis kelias	CDKN1B IGF1 IL10 PIK3CB PIK3R1 CCND2
0,02	6	miRNR vėžio atveju	CDKN1B TRIM71 PIK3CB PIK3R1 SOX4 TIMP3 CCND2
0,02	5,7	Pakitęs transkripcijos reguliavimas vėžio atveju	DKN1B DDX5 IGF1 MYCN PAX3 PAX7 CDK14 CCND2
0,02	5,3	Ląstelinis senėjimas	NFATC2 PIK3CB PIK3R1 PPP3R1 ZFP36L1 CCND2
0,02	3,5	PI3K-Akt signalinis kelias	CDKN1B ERBB4 GHR IGF1 KIT PIK3CB PIK3R1 BDNF CCND2

P6 lentelė. Nustatytų miRNR, kurių raiška (raiškos pokytis > 2, p < 0,05) mažesnė, genų-taikinių biologinių procesų GO terminų praturtinimo analizė. KAD – klaidingų atradimų dažnis.

KAD	Praturtinimo pokytis kartais	Biologinio proceso GO terminas	Genų-taikinių skaičius
$4,0 \times 10^{-9}$	2,8	Baltymų fosforilinimas	53
$3,47 \times 10^{-9}$	2,7	Fosforilinimas	59
$1,87 \times 10^{-7}$	2,6	Tarpląstelinis signalinimas	51
$4,54 \times 10^{-11}$	2,5	Anatominių struktūrų morfogenezė	78
$1,8 \times 10^{-8}$	2,3	Viduląstelių signalų transdukcija	71
$7,13 \times 10^{-7}$	2,0	Molekulinių funkcijų reguliavimas	74
$3,92 \times 10^{-7}$	2,0	Signalų perdavimo reguliavimas	79
$5,44 \times 10^{-7}$	2,0	Ląstelės komunikacijos reguliavimas	78
$4,05 \times 10^{-7}$	1,8	Ląstelių diferenciacija	92
$4,67 \times 10^{-7}$	1,8	Ląstelių vystymosi procesai	92

P7 lentelė. Nustatytų miRNR, kurių raiška (raiškos pokytis > 2, p < 0,05) mažesnė, genų-taikinių KEGG signalinių kelių praturtinimo analizė. KAD – klaidingų atradimų dažnis.

KAD	Praturtinimo pokytis kartais	Signalinis kelias	Genai
$4,0 \times 10^{-3}$	8,2	Epitelinų ląstelių bakterinė invazija	ACTR2 SEPTIN9 CLTC CRKL CTTN CD2AP SHC4
0,03	5,7	Endokrininis atsparumas	ADCY6 HBEGF MTOR DLL1 SHC4 PRKACB
0,03	5,3	Melanogenezė	DCY6 EDNRB GNAQ MITF PRKACB FZD3
0,01	5,3	Insulino signalinis kelias	FLOT1 SORBS1 CRKL MTOR SHC4 PRKACB PRKAR1A PRKAR2A
$8,0 \times 10^{-3}$	5,1	miRNR vėžio atveju	CRKL MTOR SHC4 MARCKS PRKCE ZEB1 FZD3 RECK ZEB2
0,04	4,8	Glutamaterginė sinapsė	ADCY6 GNAQ PPP3R1 PRKACB SLC1A1 SLC1A2
0,04	4,5	Augimo hormonų sintezė, sekrecija ir veikimas	ADCY6 CRKL MTOR GNAQ SHC4 PRKACB
0,03	4,3	Glaudžiosios jungtys	ACTR2 CTTN MSN CLDN11 PRKACB PRKCE RAP2C ARHGEF2
0,04	3,1	MAPK signalinis kelias	CRKL FGF7 NTF3 PPP3R1 PRKACB RASA1 RASA2 RPS6KA3 CACNA2D1 CACNB4
0,03	2,6	Signaliniai keliai vėžio atveju	ADCY6 EGLN3 CRKL EDNRB EPAS1 FGF7 MTOR GNAQ DLL1 MITF PMAIP1 EGLN1 PRKACB PTGER3 FZD3

P8 lentelė. Klausimynas, skirtas atnaujinti informaciją apie vaisingumo išsaugojimo galimybes Šiaurės ir Baltijos šalyse.

Bendrieji klausimai
Šalis
Darbo vaikų onkologijoje patirtis (metai)
Teisės aktai/Gairės
Ar yra nacionalinės onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimo gairės?
Taip
Ne
Vietinės gairės yra prieinamos

Bus paruoštos
Nežinau
Pasirinkite, kurios vyrų vaisingumo išsaugojimo strategijos yra taikomos jūsų šalyje (galimi keli atsakymo variantai):
Sėklidžių audinio šaldymas iki lytinės brandos
Sėklidžių audinio šaldymas po lytinės brandos
Spermos užšaldymas
TESA / PESA
Reprodukcinį audinių ekranavimas
Spermos donorystė
Suogacija
Įsivaikinimas
Pasirinkite, kurios moterų vaisingumo išsaugojimo strategijos yra taikomos jūsų šalyje (galimi keli atsakymo variantai):
Kiaušidžių audinio šaldymas iki lytinės brandos
Kiaušidžių audinio šaldymas po lytinės brandos
<i>In vitro</i> brandinimas
GnRH antagonistų terapija
Kiaušialąsčių užšaldymas
Embrionų šaldymas
Reprodukcinį audinių ekranavimas/transpozicija
Kiaušialąstės šaldymas
Embrionų donorystė
Suogacija
Įsivaikinimas
Ar jūsų centras turi gaires dėl (galimi keli atsakymo variantai):
Spermos surinkimos ir užšaldymo?
Sėklidžių audinio surinkimo ir užšaldymo?
Kiaušidės žievinio audinio surinkimo ir užšaldymo?
Kiaušidžių stimuliacijos ir kiaušialąsčių užšaldymo?
Neturime jokių gairių
Bus paruoštos
Jei į bent vieną klausimą atsakėte 'taip', ar turite patvirtintas vaisingumo išsaugojimo gaires pagal gaunamą gydymą, amžių ar kokį kitą kriterijų? Jeigu taip, kokias?
A) Terapiniai junginiai (pvz. kiaušidės žievinio audinio užšaldymas prieš HKLT, jei mergaitė nėra sulaukusi lytinės brandos)
B) Paciento amžius (pvz. spermos užšaldymas, jei berniukui daugiau nei 15 metų)
C) Kiti kriterijai
Praktika
Pasirinkite vaisingumo išsaugojimo strategijas, taikomas jūsų centre (galimi keli atsakymo variantai):
Spermos surinkimas ir užšaldymas
Sėklidžių audinio surinkimas ir užšaldymas
Kiaušidės žievinio audinio surinkimas ir užšaldymas
Kiaušidžių stimuliacija ir kiaušialąsčių užšaldymas
Netaikome jokių vaisingumo išsaugojimo strategijų
Vaisingumo išsaugojimas procedūra vyksta kitame centre
Ar jūsų centras naudoja kitų teikiamas paslaugas (galimi keli atsakymo variantai):

Spermos surinkimui ir užšaldymui?
Sėklidžių audinio surinkimui ir užšaldymui?
Kiaušidės žievinio audinio surinkimui ir užšaldymui?
Kiaušidžių stimuliacijai ir kiaušialąsčių užšaldymui?
Ruošiamas bendradarbiavimas.
Nebendradarbiaujame.
Ar naudojate spermos / sėklidžių audinio / kiaušidžių audinio / kiaušialąsčių šaldymą pacientams su šiomis diagnozėmis? (galimi keli atsakymo variantai)
Hodžkino limfoma
Ne Hodžkino limfoma
Ūminė limfoblastinė leukemija, diagnozės metu
Ūminė mieloidinė leukemija, diagnozės metu
Vilmso navikas
Juingo / minkštųjų audinių sarkoma
Osteosarkoma
CNS navikai
Lytinių ląstelių navikai
Prieš kamieninių ląstelių transplantaciją
Kiti
Ar prisimenate paskutinio paciento, kuriam siūlėte spermos / sėklidžių audinio / kiaušidžių žievinio audinio / kiaušialąsčių šaldymą, amžių, lytį ir diagnozę? Nurodykite, kada tai įvyko.
Ar jūsų centre vyksta pacientų ir jų tėvų konsultacijos vaisingumo išsaugojimo tema?
Taip, visiems
Taip, kai kuriems
Taip, tiems, kurie atitinka vaisingumo išsaugojimo indikacijas
Ne
Nežinau
Jei taip, kada jūsų centre vyksta pacientų ir jų tėvų konsultacijos vaisingumo išsaugojimo tema?
Ar jūsų centre yra teikiama informacija apie vaisingumo išsaugojimą pacientams ir jų tėvams prieš ir po gydymo?
Taip
Ne
Informacija ruošiama
Nežinau
Turėtų būti aptariama centro viduje šiuo klausimu
Jei taip, kokių būdu yra teikiama ši informacija? (galimi keli atsakymo variantai)
Internetinėje svetainėje
Leidiniukais
Knygomis
Visomis išvardintomis
Kita
Ar jūsų centre vyksta pacientų ir jų tėvų konsultacijos su vaisingumo problemomis susijusia tema?
Taip, visus pacientus ir jų tėvus
Taip, kai kuriems
Ne

Nežinau
Jei taip, kada jūsų centre vyksta pacientų ir jų tėvų konsultacijos su vaisingumo problemomis susijusia tema?
Kodėl ne visiems pacientams ir jų tėvams yra siūloma konsultacija? (galimi keli atsakymo variantai)
Mūsų centras nesiūlo konsultacijos visiems pacientams ir jų tėvams
Trūksta laiko iki gydymo pradžios
Kalbos / bendravimo barjeras
Pacientų / tėvų nedomina ar gėdijasi kalbėti
Amžius (per jaunas / senas)
Religiniai / kultūriniai aspektas
Seksualinė orientacija
Svarbūs kiti klausimas
Informacija nepateikta
Kas atsakingas už vaisingumo konsultaciją? (galimi keli atsakymo variantai)
Onkologijos slaugytoja
Onkologas
Ginekologas
Andrologas
Endokrinologas
Kiti
Konsultacija neteikiama
Vyrų vaisingumo išsaugojimas
Kas atsakingas už spermos surinkimą? (galimi keli atsakymo variantai)
Onkologas
Onkologijos slaugytoja
Endokrinologas
Andrologas
Ginekologas
Kiti
Pagal ką nusprendžiate, kad berniukas yra pakankamai subrendęs spermos surinkimui?
Kur yra produkuojamas spermos mėginys? (galimi keli atsakymo variantai)
Spermos laboratorijoje
Paciento namuose
Paciento ligoninės palatoje
Kitur
Ką darote, jeigu pacientas negali produkuoti spermos mėginio? Prašome nurodyti.
Ar jūsų centras siūlo spermos / sėklidžių audinio šaldymą po gydymo?
Taip, visiems
Taip, kai kuriems
Ne
Nežinau
Moterų vaisingumo išsaugojimas
Ar jūsų centras siūlo kiaušidžių žievinio audinio ir / ar kiaušialąsčių šaldymą po gydymo?
Taip, viso
Taip, kai kurioms

Ne
Nežinau
Ar jūsų centre yra įprastinė gydymo praktika mergaitėms, kurios atsigavo po kiaušidžių nepakankamumo? Prašome nurodyti.

Kita

Ar yra kas nors, su kuo negalite sutikti vėžiu sergančių pacientų vaisingumo išsaugojimo srityje?

Ar turite daugiau informacijos ar pasiūlymų?

GnRH – gonadotropiną atpalaiduojantis hormonas (angl. *gonadotropin releasing hormone*), HKLT – hematopoetinių kamieninių ląstelių transplantacija, TESA – sėklidžių spermos aspiravimo procedūra (angl. *testicular sperm aspiration procedure*), PESA – perkutaninė spermos aspiracija (angl. *percutaneous epididymal sperm aspiration*).

P9 lentelė. Apklausos atsakymai į klausimą „Ar turite patvirtintas vaisingumo išsaugojimo gaires pagal gaunamą gydymą, amžių ar kokį kitą kriterijų?“

Šalis	Terapiniai junginiai	Paciento amžius	Kiti kriterijai
Danija	KA užšaldymas prieš HKLT ir ifosfamido aukštos dozės	Spermos užšaldymas sulaukusiems lytinės brandos pacientams	N/A
Danija	N/A	Spermos užšaldymas sulaukusiems lytinės brandos pacientams	N/A
Estija	NA	NA	N/A
Islandija	Ne	Vertina pagal lytinę brandą	N/A
Latvija	N/A	N/A	N/A
Lietuva	N/A	N/A	N/A
Lietuva	N/A	Spermos užšaldymas vyresniems nei 14 metų ir lytinės brandos sulaukusiems pacientams	N/A
Norvegija	Priklauso nuo gaunamo gydymo	Sulaukus lytinės brandos	N/A
Norvegija	N/A	N/A	Tarptautinės gairės + Oslo gairės audinių užšaldymui
Norvegija	KA užšaldymas, kai gauna alkilinančių medžiagų > 6 g/m ² dozę ir kiaušidžių radiaciją; spermos užšaldymas, kai gauna alkilinančių medžiagų > 4 g/m ² dozę ir sėklidžių radiaciją	Nėra amžiaus limito mergaitėms; spermos užšaldymas lytinės brandos sulaukusiems berniukams	Individualus sprendimas; netaikoma leukemija sergantiems pacientams

Suomija	Prieš HKLT ar reprodukcinių audinių radiaciją, ar aukštų dozių alkilinančios medžiagos	Mergaitėms > 16 metų, taiko KA užšaldymą (tyrimų tikslais) ir kiaušialąsčių užšaldymą; spermos užšaldymas 3 st. ar didesnės lytinės brandos sulaukusiems berniukams	Atskirai aptariamai hematologiniai piktybiniai navikai
Suomija	N/A	N/A	N/A
Suomija	Kiaušialąsčių kartu su KA užšaldymas prieš HKLT ir kiaušidžių radiaciją; spermos užšaldymas prieš bet koki gydymą	Sulaukusiems lytinės brandos pacientams	Kiaušialąsčių kartu su KA užšaldymas prieš HKLT ir kiaušidžių radiaciją; spermos užšaldymas prieš bet koki gydymą
Švedija	N/A	N/A	N/A
Švedija	Aukšta nevaisingumo rizika (prieš HKLT ir/ar aukštų dozių chemoterapiją)	Sėklidžių audinio užšaldymas beveik visiems lytinės brandos nesulaukusiems berniukams	N/A
Švedija	N/A	N/A	N/A
Švedija	Pagal protokolą	Vertina pagal lytinę brandą	N/A

HKLT – hematopoetinių kamieninių ląstelių transplantacija, KA – kiaušidės audinys, N/A – nepateiktas atsakymas.

P10 lentelė. Apklausos atsakymai į klausimą „Pagal ką nusprendžiate, kad berniukas yra pakankamai subrendęs spermos surinkimui?“

Šalis	Atsakymai
Danija	Apklausiant pacientą
Danija	Apklausiant pacientą
Estija	Diskusijų su pacientu ir šeima metu
Islandija	Klinikinis įvertinimas ir apklausiant pacientą
Latvija	Įvertinant brendimo stadiją pagal Tanerį
Lietuva	Įvertinant lytinės brandos stadiją
Lietuva	Jeigu berniukui > 14 metų, visada siūlomas spermos surinkimas
Norvegija	Įvertinant lytinės brandos stadiją
Norvegija	Atsakymas nepateiktas
Norvegija	Diskusijų su pacientu ir šeima metu
Suomija	Įvertinant brendimo stadiją pagal Tanerį, jeigu sėklidės > 10-12 ml
Suomija	Įvertinant brendimo stadiją pagal Tanerį, jeigu sėklidės > 10-12 ml
Suomija	Įvertinant brendimo stadiją pagal Tanerį
Švedija	Fizinio išsivystymo įvertinimas ir diskusijų su pacientu ir šeima metu
Švedija	Apklausiant pacientą ir klinikinį įvertinimą
Švedija	Įvertinant brendimo stadiją pagal Tanerį
Švedija	Diskusijų su pacientu ir šeima metu

SUMMARY

The number of young people with cancer has been gradually increasing since the 1950s. An average of 1,300,000 adolescent and young adults are diagnosed worldwide each year (Hughes *et al.*, 2024) with survival rate of 85 % (Keegan *et al.*, 2024). Cancer treatment includes medical, radiation, surgical and bone marrow transplantation (Kim *et al.*, 2018) however these treatments often damage or destroy not only cancerous cells but also healthy tissue cells. The survival rate of these patients is increasing thanks to the latest cancer treatments (Silber *et al.*, 2016; Gertosio *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018) but often reproductive tissues remain damaged due to the effects of chemotherapy or radiation (Gertosio *et al.*, 2018), thus individuals who have had cancer at a young age often become partially or completely infertile (Stukaite-Ruibiene *et al.*, 2021) with deteriorating quality of life due to persistent psychological stress and feelings of inferiority (Logan *et al.*, 2019). It is important to inform patients or their parents about the consequences of cancer therapy on fertility before administering gonadotoxic therapy and allowing them to make independent decisions about their own or their children's reproductive future (Sullivan-Pyke *et al.*, 2018; Anazodo *et al.*, 2019; Zobielaite *et al.*, 2022). During counselling with reproductive medicine specialists' fertility-preserving technologies should be discussed (Oktay *et al.*, 2018; Logan *et al.*, 2019).

Depending on the age of the patient, the type of disease and the likelihood of relapse different fertility preservation (FP) methods are approved and recommended worldwide (Gertosio *et al.*, 2018). Shielding or transposition of the gonads is used for patients who have not yet reached sexual maturity (Oktay *et al.*, 2018), while egg or embryo freezing is used for sexually matured patients. However, these methods require delaying of cancer treatment for at least a few weeks until the eggs have matured through hormonal stimulation which is a contraindication for some cancer patients (Muñoz *et al.*, 2016). While freezing of ovarian tissue (OT) does not require a delay in treatment and has been an approved FP technology worldwide only for sexually mature adults in 2019 (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2019), the first experimental trial of frozen-thawed OTs in Lithuania was initiated that year (Gudlevičienė *et al.*, 2020). However, the use of freezing OTs for FP in patients who have not reached sexual maturity is at an experimental stage worldwide (Mulder *et al.*, 2021).

The first experiment of human frozen-thawed OT transplantation was performed more than two decades ago (Oktay *et al.*, 2000). OT

autotransplantation during remission is a well-established treatment in numerous countries worldwide for women with solid tumors, such as breast cancer (Bastings *et al.*, 2013). Research supports that the risk of retransplanting metastasized tumour cells within the frozen OT is moderate for this cancer type (Grubliauskaitė *et al.*, 2023a), thus reliable biomarkers are needed to assess the presence of malignant cells in the tissue. However, malignant cells from hematological tumours can infiltrate reproductive tissues even more easily, consequently, retransplantation carries a high risk of relapse (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2019; Grubliauskaitė *et al.*, 2023a). Retransplantation of OT is not recommended for these women, therefore, they could benefit from other fertility restoration approaches, such as *in vitro* maturation (IVM) of thawed OT and its components or artificial ovary construction (Muñoz *et al.*, 2016; Oktay *et al.*, 2018).

Relevance

In 2020, the European Committee has announced the European Horizon mission – CANCER. The European Cancer Plan aims to save more than 3 million people with cancer, extend their life expectancy and improve their quality of life by 2030 (<https://europoshorizontas.lt/>). Reproductive potential – fertility – is an integral indicator of quality of life during remission.

Survivors face reduction in their physiological, social, psychological and spiritual well-being, those have been shown to be influenced by fertility, physical health, hopes of starting a family and romantic relationships (Muñoz *et al.*, 2008). However, surveys of patients or parents of children show that they are not sufficiently counselled about FP options and face a lack of knowledge (Omani-Samani *et al.*, 2021; Zobielaite *et al.*, 2022). Incorporation of harmonized FP guidelines into clinical practice, including counselling, infertility risk stratification and recommendations for FP strategies, could address these issues and ease the burden of counselling on clinicians (Mulder *et al.*, 2021, Asadi-Azarbajjani *et al.*, 2024).

After cancer diagnosis, FP becomes an urgent issue – there is the lack of time before starting gonadotoxic treatment and the risks associated with hormonal stimulation. Nonetheless, the oocytes matured during stimulation are not especially resistant to low temperatures (Gertosio *et al.*, 2018). Embryo freezing represents another FP strategy, however, FP is also relevant for young women, adolescents and girls, who may not yet have a life partner (Oktay *et al.*, 2018). Research suggests that freezing reproductive tissue may help to address this issue. The tissue is obtained during the same surgical procedure

in which the tumor is excised. This employs a freezing technique that targets the immature follicles and oocytes within the ovary, thereby eliminating the necessity for hormonal stimulation and ensuring that no time is lost in the process (Muñoz *et al.*, 2016). In addition, immature follicles and oocytes within the tissue are more resistant to the effects of low temperatures. Once needed, the tissue can be thawed and retransplanted back into the women or used for follicle isolation and construction of artificial ovaries, or for *in vitro* maturation. The most recent strategies for FP still require optimization of the protocols for OT transplantation and isolation of follicles, which includes a more thorough understanding of follicular development and ovarian processes. Despite the apparent clarity of the procedures, there are numerous safety questions, thus reproduction researchers from all around the globe gather to address them.

Aim and objectives

This aim of this study was to develop safe fertility restoration strategies by employing *in vivo* ovarian tissue transplantation, *in vitro* activation and artificial ovary construction models.

Objectives:

1. To assess the viability and structural integrity of reproductive tissues frozen and stored for over 5 years using xenotransplantation and molecular assays;
2. To determine the effect of *in vitro* ovarian tissue culture and supplementation with vascular endothelial growth factor A and antioxidant rutin for *in vivo* engraftment and gene, related to tissue integrity, folliculogenesis and tissue damage expression changes;
3. To assess *in vitro* the potential of low developmental stage (primordial and intermediate) follicles and their maturation to higher developmental stage follicles in different artificial ovary models;
4. To assess fertility care and FP methods in the Nordic-Baltic region for cancer patients before and after sexual maturity through a survey.

SCIENTIFIC NOVELTY

The novelty of this work lies in the development and implementation of biotechnologies for the freezing of reproductive tissues, transplantation, molecular testing, *in vitro* maturation of follicles and the construction of artificial ovaries in Lithuania. In addition, this work evaluated and

summarized the state of FP guidelines and strategies in Nordic and Baltic oncology centers.

Within the framework of this PhD thesis, a biomedical study was carried out to test an OT slow freezing protocol, which according to the literature and the first tissue freezing studies at the beginning of 2014, can preserve viability of the reproductive tissue. Therefore, the aim of this study was to assess the viability, overall quality and safety of the first-ever slowly frozen / rapidly thawed human OTs collected in Lithuania for future retransplantation using modern biotechnological testing methods. Our results showed that slow freezing is an effective method of freezing OTs that does not cause harmful tissue damage. We have shown that the 35 days of tissue xenotransplantation study in immunodeficient mice could be replaced by time-dependent histological, immunohistochemical or molecular studies.

Moreover, molecular miRNA expression studies have allowed the identification of a breast tumour tissue miRNA expression profile, which could be used to make assumptions about whether an OT from a woman with breast cancer is safe for retransplantation. Although further validation studies are still needed to demonstrate the reliability of this approach by analyzing a larger amount of breast tumours and OTs using this miRNA expression profile. The initial results suggest that such an approach could be successfully applied in clinical practice in the future prior to OT retransplantation.

Furthermore, our study is the first to test the *in vitro* activation of human OT by supplementing the culture medium with VEGF-A 165 and the antioxidant rutin prior to xenotransplantation, in order to improve the tissue revascularization process, to reduce structural changes and oxidative stress damage, and to preserve the maximum number of follicles. However, initial results showed that the addition of these components did not have a substantial positive effect on long-term xenotransplantation.

Freezing and retransplantation of OTs are not used for patients at high risk of tumour metastasis due to the potential disease recurrence. One possible strategy to address this problem is the construction of a 3D artificial ovary, e.g. isolation of ovarian follicles with somatic cells from OT and embedding them into a scaffold. The results of this study proved that even the inclusion of somatic cells from menopausal OT in the artificial ovary had a positive effect on the growth, quality, development and hormone secretion of primordial and intermediate follicles *in vitro*. These successful results on the activation and maturation of the low developmental stage follicles to secondary follicles, published for the first time, suggest that this technique may be effective in improving assisted reproduction techniques and FP strategies for oncology patients.

All these studies on slow freezing and rapidly thawing of OT, their xenotransplantation, *in vitro* follicle maturation and the assessment of the safety, reliability and potential risks of these procedures will lead to the development of technologies that will allow the launch of a new field of regenerative medicine for reproductive tissues in Lithuania. Currently, slow freezing protocol of OT is already used not only at the National Cancer Centre but also at Vilnius University Hospital Santaros Clinics to preserve fertility for oncology patients. The safety of OT slow freezing / rapid thawing and retransplantation technologies will also help to achieve another important goal – the implement the FP guidelines, in line with international recommendations, which will be applied throughout Lithuania. A survey of pediatric oncology centers in the Nordic-Baltic region revealed that not all countries had approved national guidelines for FP (including Lithuania) in 2022. There was also determined need to update the existing guidelines to standardize fertility care and to improve the quality of life for patients.

The findings of this study offer both theoretical insights and practical evidence supporting the feasibility of implementing the slow freezing method of OT in clinical settings. The major benefit of this work lies in the introduction of this technology to children and adolescent girls who have not yet reached sexual maturity.

In the future, OT technologies for freezing, long-term storage, retransplantation and *in vitro* maturation of follicles have the potential to be used not only for cancer patients but also for individuals who have suffered from complex injuries, such as spinal injuries, and for those who wish to have children at an older age or to delay the onset of menopause.

THE STATEMENTS OF DEFENCE

1. Slow freezing of ovarian tissue and long-term storage at low temperature is an effective strategy to preserve fertility for reproductive age oncology patients.

2. *In vitro* activation of ovarian tissue (enrichment of standard culture medium with a combination of growth factor VEGF-A 165 and antioxidant rutin) prior to xenotransplantation slightly improves tissue revascularization, reduces tissue structural changes and oxidative stress damage, preserving a greater number of primordial and developing follicles.

3. Incorporation of ovarian stromal cells into an artificial ovary model helps to mature low developmental stage follicles to secondary follicles, increases their viability, quality and steroidogenesis *in vitro*.

4. The criteria for fertility preservation screening and counselling in Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology member countries vary according to the age and maturity of the patient, the planned treatment and the method of fertility preservation.

METHODS

All materials are listed in Section 2.1 (page 36).

The biomedical study "Fertility preservation programme for oncology patients" conducted at the National Cancer Institute (NCI) was approved by the Vilnius Regional Biomedical Research Ethics Committee (2014-07-08, No. 158200-14-743-260) (Fig. P1). The authorization to collect patients' biological material and to perform research was valid until 31-12-2019. All women signed Informed Consent forms. An Addendum of the study till 31-12-2023 was approved (Addendum No.1, No. 2019-LP-53) (Fig. P2).

Two approvals from the State Food and Veterinary Service were obtained for experimental studies with laboratory animals at Vilnius University Life Sciences Centre (VU LSC): 23-04-2019, No. G2-107 (Fig. P3) and 10-06-2022, No. G2-214 (Fig. P4).

Control breast tissues (healthy and tumour) were obtained from the Biobank of NCI, after signing standardized Biobank Informed Consent Form. The Biobank consent form was approved by the Lithuanian Bioethics Committee, the State Service for Accreditation of Healthcare Activities and the Director of the NCI.

Donor OTs from post-menopausal women were also used in the study. The use of these tissues was based on the approval of the Review Board of the Université Catholique de Louvain (KLU) (Belgium) 2012/23MAR/125.

Ovarian tissue

Thirty-six women with oncological disease were enrolled to the biomedical study of "Fertility Preservation Programme for Oncology Patients" until 2022. The mean age of the patients was 31 ± 5 years. The diagnosis was breast (22/36), ovarian (6/36), cervical (6/36), rectal (1/36) and vulvar (1/36) cancer. Three patients with borderline tumours were included while the rest of the cancers were stage I-III with different degrees of cellular differentiation (G1, G2, G3). None of the included patients had metastasis to other organs. Ten of them are deceased (data updated in the NCI Cancer Registry database).

Study design

This thesis can be divided into five parts: (1) *in vitro* evaluation of slowly frozen / rapidly thawed OTs; (2) ability of OTs to engraft after thawing; (3) ability of OTs to engraft after 36 h of *in vitro* culture; (4) construction of artificial ovary and (5) a survey of Nordic and Baltic countries oncology centres on FP guidelines and FP strategies in these countries.

Ovarian tissue collection, cryopreservation and thawing

On a day of operation, the transporting medium consisting of 199 Earl's Medium enriched with 5% v/v of Human Serum Albumin (HSA), and 1% v/v penicillin/streptomycin/amphotericin B solution was prepared.

Directly after the transportation to the Biobank, the OT was cut into small pieces ~0,5 x 0,5 cm. Cryopreservation of the pieces was performed using slow freezing according to Herraiz *et al.* protocol (2014). The freezing medium consisted of M199 media enriched with 5 % v/v HSA, 1 % v/v penicillin/streptomycin/amphotericin B solution and 10 % v/v dimethylsulfoxide. Tissue pieces were transferred to the cryotubes with cryoprotective solution, placed to the Mr. Frosty Cryobox, transferred immediately to –80 °C freezer and kept overnight. The next day, the cryotubes were placed in a –150 °C freezer for long term storage.

Cryotubes with OT pieces were removed from the ultra-low temperature freezer and transferred on the ice. In the laboratory, cryotubes were immersed in a water bath at 37 °C for several minutes until they started melting. The cryoprotective solution was diluted 1:1 with thawing solution and kept for 5 min at room temperature 2 times. A thawing solution consisted of M199 media supplemented with 5 % v/v HSA and 1 % v/v penicillin/streptomycin/amphotericin B solution.

Preparation of OT for xenotransplantation

First xenotransplantation experiment is described in detail in Gudlevičienė *et al.*, 2020. Xenotransplantation was performed subcutaneously, dorsolateral near the vertebral column of NOD.SCID female immunodeficient mice (n = 13). OTs from 5 women were thawed for xenotransplantation – an experimental group. First control group was five pieces of fresh OT from one woman who had her OT frozen. Two mice in second control group had human breast cancer cells (MCF 7) injected under the skin. One mouse was a healthy control. Animals from experimental, 1st control, and 3rd control groups were killed by cervical dislocation at the end of the 35-day post-xenotransplantation and 2nd control group animals were sacrificed after 14 days post-

xenotransplantation due to rapid growth of tumors and signs of distress. OT grafts were collected for pathological evaluation.

Before second xenotransplantation, OT were cultured *in vitro* for cytotoxicity (lactate dehydrogenase, LDH) and steroidogenesis (progesterone secretion) evaluation. OTs (n = 16) were thawed using a rapid tissue thawing method, cut in half and divided into 4 groups. The OTs were cultured for 72 h in standard and experimental *in vitro* culture medium. The control medium consisted of McCoy's medium supplemented with 3 mM glutamine, 0.1 % HSA, 2.5 µg/ml transferrin, 4 ng/ml selenium, 50 µg/ml ascorbic acid, 30 µg/ml penicillin G, 50 µg/ml streptomycin, 10 ng/ml human insulin and 1 ng/ml FSH, while experimental medium was enriched with 50 ng/ml of VEGF-A 165 (VEGF-A), 1 µg/ml rutin (R) or combination of both (V+R).

For second xenotransplantation, 10 NMRI-Foxn1^{nu} immunodeficient mice were used. OTs cultured were either in standard medium (n = 10) or enriched with V+R (n = 10) and grafted as described above except two pieces per mice were transplanted. After 28 days, OT grafts were collected and divided for pathological and gene expression evaluation.

For histological and immunohistochemical staining, KA were fixed in formalin and embedded in paraffin. Staining of hematoxylin and eosin, Ki-67 or alfa-smooth muscle actin (α -SMA) was performed at the UAB Pathology Diagnostics (first xenotransplantation study) and at the State Pathology Centre, a branch of the Vilnius University Hospital, Santaros Clinics (second xenotransplantation study).

miRNA and gene expression analysis

Total RNA from OTs was isolated using Qiazol solution. For total RNA isolation miRNeasy Mini and RNase-free DNase Set kits were used according to manufacturer's recommendations.

Copy DNA (cDNA) for Human Breast Cancer miScript miRNA arrays was synthesized using miScript II RT and miScript HiSpec Buffer kits. Real time PCR (RT-PCR) was performed using miScript SYBR Green PCR Kit in Rotor-Gene Q thermocycler according to manufacturer's recommendations. cDNA for gene expression analysis was synthesized using High-Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor kit. TaqManTM probes (listed in 2.1 section, page 37) along with TaqManTM Fast Advanced Master Mix kit were used for gene expression in QuantStudioTM 5 thermocycler according to manufacturer's recommendations.

The relative expression of each miRNA and gene in the samples was assessed by $\Delta\Delta$ CT and normalized by endogenous controls. The relative fold

change in experimental sample was compared to controls and calculated according to the formula: fold change (compared to controls) = $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Target-genes of miRNAs with significant change in expression (fold change ≥ 2 , $p < 0.05$) were identified using miRDB (www.mirdb.org) and TargetScan 7.2 (www.targetscan.org/vert_72) databases. Target-genes with a target score ≥ 90 were selected from the miRDB database and targets with a cumulative weighted context score (CWCS) < -0.4 from the TargetScan database. Enrichment analysis of signaling pathways from Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was performed using the ShinyGO v0.08 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) online tool with a false discovery rate (FDR) of < 0.05 .

Artificial ovary construction

Construction of different artificial ovary models is described in detail in Grubliauskaite *et al.*, 2023b. Shortly, ovarian stromal cells (oSCs) were isolated from 5 menopausal patients and allowed to grow *in vitro* to form a confluent monolayer. Preantral follicles were isolated from frozen-thawed biopsies from 6 patients collected at NCI. Both isolations were performed using mechanical and enzymatic digestions. Pre-antral follicles (primordial and intermediate developmental stage) were embedded in 1 % alginate matrix. The models were *in vitro* cultured for 7 days, either with or without the feeder layer of OSCs in culture medium containing DMEM/F12 supplemented with 10 % FBS, 1 % Anti-Anti, 1 % ITS (insulin, transferrin, selenium), 50 mg/ml pyruvic acid, 0.2 % *Menopur* and 30 ng/ml recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF), 50 ng/ml insulin-like growth factor 1 (IGF1), 30 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 40 ng/ml growth differentiation factor 9 (GDF-9), 100 ng/ml stem cell factor (SCF). Follicle viability was measured by staining with calcein AM and ethidium homodimer-I. The follicles were classified into four categories (V1 to V4) depending on oocyte and granulosa cell (GC) viability according to Martinez-Madrid *et al.*, 2004. Follicle growth was measured at days 0, 3 and 7 and classified according to Lierman *et al.* (2015) as primordial, primary, and secondary. Secondary follicles were further classified into early/mid ($75 < x \leq 100 \mu\text{m}$), mid/late ($100 < x \leq 150 \mu\text{m}$) and late stages ($150 < x \mu\text{m}$) (Kristensen *et al.*, 2011). Estradiol hormone production was measurements using ELISA assay.

Survey of paediatric oncology centres in the Nordic-Baltic region

In collaboration with NOPHO, an anonymous questionnaire was distributed electronically to the heads of 23 major paediatric oncology centres in the Nordic and Baltic countries. The questionnaire consists of 22 multiple-choice and open-ended questions covering topics such as guidelines, possible FP options, clinical indications, implementation of fertility preservation in practice and counselling, as described in Grubliauskaite *et al.*, 2025. The data were collected anonymously and electronically in 2022 using the online questionnaire Nettskjema, which is contracted to the University of Oslo (<https://www.uio.no/english/services/it/adm-services/nettskjema/>).

Statistical analysis

Analysis of miRNA expression data was performed using miScript miRNA PCR Array Data Analysis or Python v3.12. Statistically significant differences in miRNA expression between the treatment group (frozen-thawed OT samples) and the control groups (healthy breast and tumorous tissue samples) were determined using the two-way Student's t test. A statistically significant change in miRNA expression was considered when the fold change in expression was more than 2-fold and differences were considered statistically significant when the p-value < 0.05.

Statistical analysis of the other analyses was performed using GraphPad Prism, v9.1.2. Quantitative data presented as mean $\pm$ SD (standard deviation), mean $\pm$ SEM (standard error of the mean) or median $\pm$ IQR (interquartile range) and analyzed using Student's t test, ANOVA with Tukey post-hoc criterion or Mann-Whitney U test. Qualitative data was analyzed by Chi-square goodness of fit or Fisher's exact criterion. Differences were considered statistically significant when the p-value < 0.05.

The results of the survey were analyzed with Microsoft Excel 365 using descriptive statistics.

RESULTS

Assessment of tissue structure, viability, engraftment and presence of malignant cells

The histological evaluation (Fig. 1) showed an unchanged OT structure and integrity. The cells and their nuclei are clearly defined, the tissue is dense without distinct areas of cell-free areas. Visible primordial / intermediate follicles (arrows in Fig. 1, 2 and 3) showed normal or slightly receding cytoplasm from the granulosa cells.

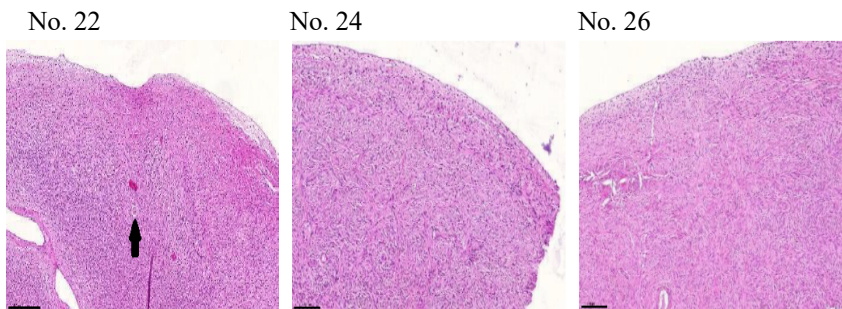


Figure 1. Histological assessment of structural integrity in ovarian tissues (No. 22, 24, 26) after slow freezing / rapid thawing. Staining with hematoxylin and eosin: nuclei, violet; cell cytoplasm, pink. Arrows indicate follicles. Scale bar 100 μ m.

The Masson trichrome staining can reveal connective tissue elements which is important as it can show fibrotic areas that are rich in collagen deposits and areas of reduced cellularity. Only one of the evaluated tissues (Fig. 2, No. 26) had some fibrotic features. Analysis of three random sections of No. 26 OT showed only 1 % of fibrotic area.

In all analyzed OTs Ki-67 expression (Fig. 3) was found to be less than 5 % (higher expression could indicate proliferation of metastatic cancerous cells). Although the proliferation marker was detected in a few follicles (Fig. 3, No. 22, middle arrow), most of the follicles detected did not express this proliferation marker.

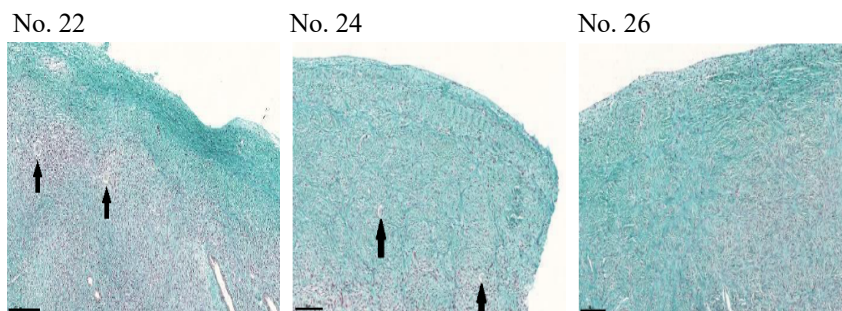


Figure 2. Evaluation of connective tissue elements in ovarian tissues (No. 22, 24, 26) after slow freezing / rapid thawing. Masson's trichrome staining: collagen, green; nuclei, purple; cytoplasm, pink. Arrows indicate follicles. Scale bar 100 μ m.

Histological and immunohistochemical evaluation suggests that pre-freezing processes, slow freezing and rapid thawing protocols did not compromise tissue integrity, did not lead to accumulation of connective tissue elements and did not cause mass activation of primordial follicles.

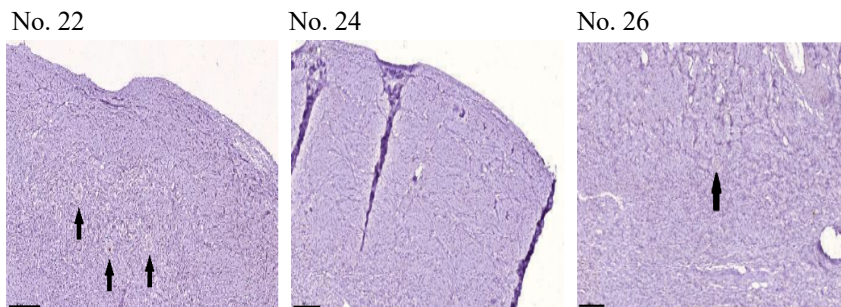


Figure 3. Evaluation of proliferating cells in ovarian tissues (No. 22, 24, 26) after slow freezing / rapid thawing. Immunohistochemical staining for Ki-67: nuclei, purple; Ki-67, brown. Arrows indicate follicles. Scale bar 100 μ m.

Following the structural analysis of the tissue, the next step was to verify whether the slow freezing / rapid thawing protocols used preserve viability and ability of the OTs to engraft (Fig. 4). Macroscopic analysis revealed the ability of the tissues to engraft and to restore blood flow. In the experimental group, 4 out of 5 frozen-thawed tissues successfully engrafted (80 %) while the control group of fresh OTs engrafted 100 % successfully. In control group of mice with injected cancer cells grew rapidly and developed high vascular system after 14 days thus were sacrificed.

Histological analysis (Fig. 4, a–c) showed a successful transplantation of OTs and cancer cells. In the OT samples, an intermediate zone of connective tissue was observed (Fig. 4, d'), as well as neovascularization elements (Fig. 4, f') between the mouse and OTs.

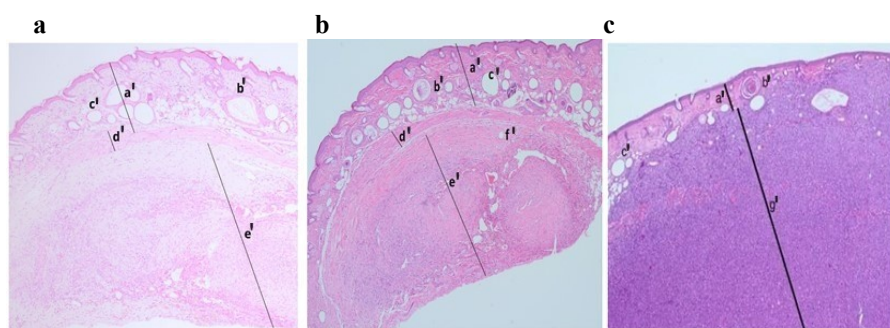


Figure 4. Histological evaluation of ovarian tissues after 35 days of xenotransplantation. **(a)** fresh grafted ovarian tissue; **(b)** slowly frozen / rapidly thawed grafted ovarian tissue; **(c)** tumourous tissue. a' - mouse skin; b' - mouse hair follicle; c' - fatty deposits; d' - intermediate zone between ovarian tissue and mouse skin; e' - human ovarian tissue; f' - blood vessel; g' - formed tumour tissue. Zoom $\times$ 40.

An assay to identify presence of malignant cells (Ki-67) revealed an expression of less than 5 % in both fresh and frozen-thawed transplanted OTs,

showing no abnormal cell proliferation, whereas in the control group of cancer cells, an expression of more than 10 % Ki-67 protein was observed (figures not shown).

miRNA expression assessment and in silico analysis

A differential analysis of miRNA expression was conducted between healthy (n = 2) and tumor breast (n = 2) tissues to create a tissue-specific miRNA expression profile for breast tumors. This profile could help determine if the frozen OTs of women with stage III breast cancer contain metastatic cells from the primary tumor. Using a Human Breast Cancer miScript miRNA PCR array, 39 miRNAs showed significant expression differences (at least 2-fold) in tumor tissue compared to healthy tissue. Of these, 15 miRNAs had at least a 4-fold change and were selected to build the tumor tissue miRNA profile (Fig. 5, a).

A similar profile was created for healthy breast tissue. The analysis revealed larger differences in miRNA expression between tumor tissue and the OTs (Fig. 5, b), suggesting that metastatic cells were not present in the OTs. This conclusion was further supported by macroscopic, microscopic, histological, and immunohistochemical examinations of the transplanted tissues (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4)

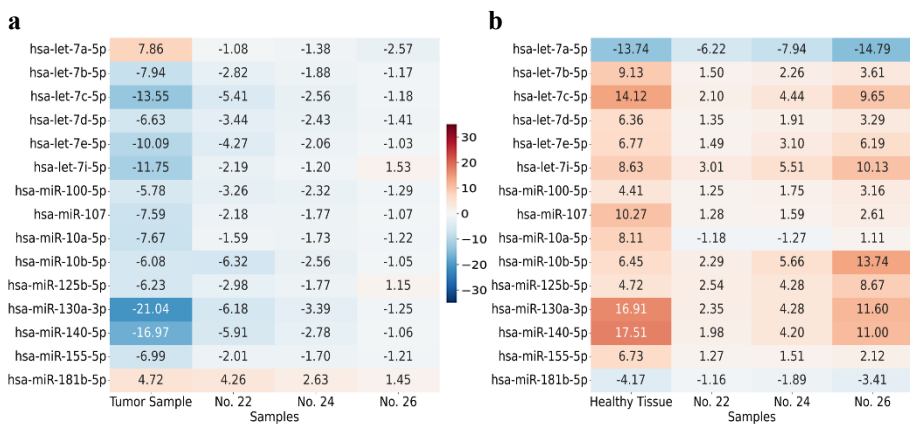


Figure 5. miRNA expression profiles. **(a)** miRNA expression profile of breast cancer tissue and its comparison with the miRNA profiles of the frozen-thawed ovarian tissues; **(b)** miRNA expression profile of healthy breast tissue and its comparison with the miRNA profiles of the ovarian tissues. The miRNAs with a statistically significant ($p < 0.05$) change in expression by at least 4-fold were used.

Next, we aimed to compare the miRNA expression profiles of OTs to both healthy and cancerous breast tissue, identifying 13 miRNAs with a significant

($p < 0.05$) 2-fold change in expression compared to healthy tissue and 18 miRNAs with 2-fold change in expression compared to cancerous tissue. Among these, 5 miRNAs – hsa-miR-1-3p, hsa-miR-202-3p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-495-3p – were upregulated, and 9 miRNAs – hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-429 and hsa-miR-96-5p – were downregulated. *In silico* analysis of their target-genes resulted in 172 target genes for upregulated miRNAs and 235 for downregulated miRNAs. An enrichment analysis of KEGG signaling pathways was conducted to investigate the mechanisms of these target-genes, helping to assess the impact of the slow freezing and rapid thawing protocols on OTs.

The enrichment analysis of upregulated miRNA target-genes has shown regulation through signaling pathways such as VEGF and HIF, PI3K-Akt, FoxO, and progesterone-dependent oocyte maturation, which are linked to angiogenesis and oxidative stress, follicle and oocyte activation or maturation (Fig. 6). The upregulation of these miRNAs suggests that these signaling pathways and biological processes may be suppressed.

The enrichment analysis of downregulated miRNA target-genes has shown regulation through signaling pathways such as MAPK, tight junction, growth hormone, endocrine and insulin resistance, which are essential for ovarian functions such as hormone sensitivity, increased metabolic activity, and signal transduction between follicle cells (Fig. 7).

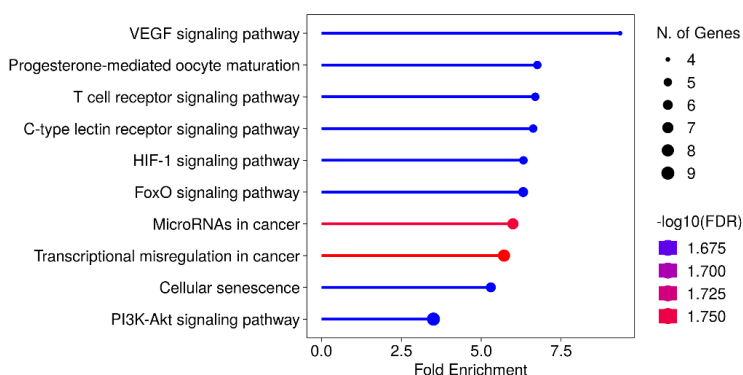


Figure 6. Top 10 identified KEGG signaling pathways after enrichment analysis of target-genes of upregulated miRNAs (fold change > 2 , $p < 0.05$). Akt, protein kinase B; FoxO, forkhead box protein O; HIF1, hypoxia-inducible factor 1; FDR, false discovery rate; KEGG, Kyoto Encyclopaedia of Genes and the Genome; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; VEGF, vascular endothelial growth factor.

This comprehensive histological (Fig. 1, Fig. 2), immunohistochemical (Fig. 3), engraftment (Fig. 4) and molecular (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7) evaluation of OTs suggests that the tissue slow freezing / rapid thawing protocols we evaluated are effective and safe. The viability and integrity of the tissues were preserved without causing any tissue harm.

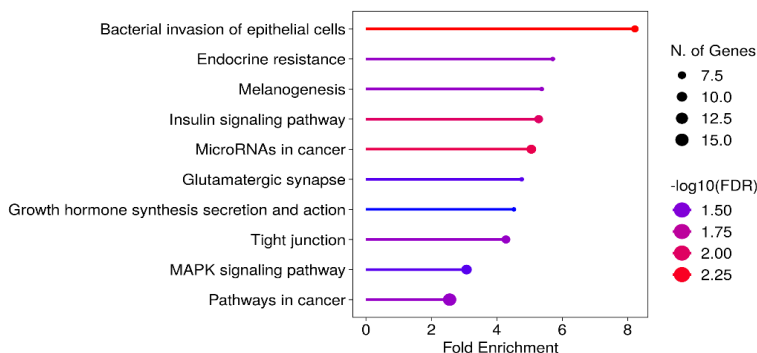


Figure 7. Top 10 identified KEGG signaling pathways after enrichment analysis of target-genes of downregulated miRNAs (fold change > 2, $p < 0.05$). FDR, false discovery rate; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome; MAPK, mitogen-activated protein kinase.

Assessment of in vitro culture of OTs prior to xenotransplantation

Based on the results of *in silico* and literature analysis, investigation on the effects of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A, V), antioxidant rutin (R) or a combination of both to the *in vitro* culture of OTs.

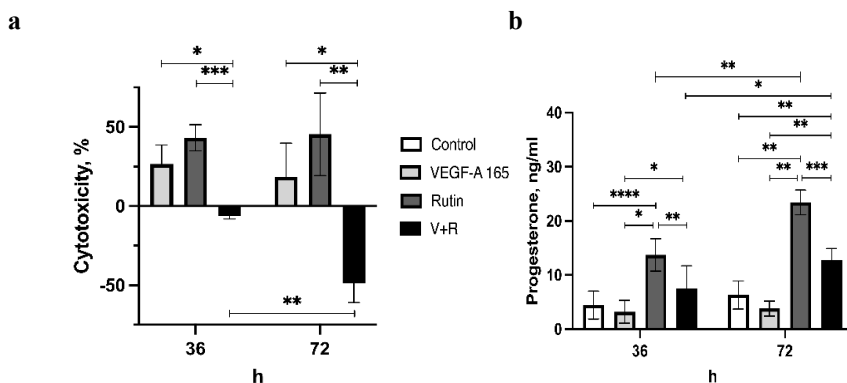


Figure 8. Assessment of ovarian tissue (OTs) cytotoxicity and steroidogenesis in *in vitro* culture. **(a)** viability of OTs cultured in different supplementation medium; **(b)** progesterone secretion of OTs cultured in different supplementation medium. Reference – OTs in standard *in vitro* culture medium ($n = 8$ in all groups). LDH, lactate dehydrogenase; OT, ovarian tissue; R, rutin; V, vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). Significant differences indicated as follow: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Cytotoxicity, LDH activity, and progesterone secretion assays were performed to identify the optimal medium for xenotransplantation, evaluating OT viability and steroidogenesis after thawing. The control medium was standard while experimental mediums included rutin, VEGF-A, or both (V+R). Cytotoxicity was the highest in OTs in medium with rutin or VEGF-A alone, while in V+R medium showed the lowest cytotoxicity (Fig. 8, a). Statistically significant differences were observed between rutin and V+R groups (36 h $43 \% \pm 8 \%$ vs $-6 \% \pm 1 \%$, $p = 0.0006$, 72 h $38 \% \pm 26 \%$ vs $-42 \% \pm 12 \%$, $p = 0.006$, accordingly) and between VEGF-A and V+R groups (36 h $27 \% \pm 12 \%$ vs $-6 \% \pm 1 \%$, $p = 0.028$, 72 h $16 \% \pm 21 \%$ vs $-42 \% \pm 12 \%$, $p = 0.039$, accordingly) at both time points. No significant differences were found between rutin and VEGF-A. Only V+R group showed a significant reduction in cytotoxicity from 36 to 72 hours ($p = 0.002$).

Granulosa and theca cell activity, assessed by progesterone secretion, showed that progesterone concentration increased over time in all *in vitro* culture groups, following the trend: rutin > V+R > control > VEGF-A (Fig. 8, b). After 36 hours, OTs in rutin group had significantly higher progesterone concentration than OTs in VEGF-A, control, and V+R groups. OTs in V+R group also produced significantly more progesterone than OTs in VEGF-A group ($p = 0.034$). After 72 hours, OTs in rutin group produced significantly more progesterone than OTs in VEGF-A, control, and V+R groups, with V+R group outperforming OTs in both VEGF-A and control groups. Significant differences in progesterone concentration were observed within rutin ($13.7 \text{ ng/ml} \pm 3.0 \text{ ng/ml}$ vs $23.4 \text{ ng/ml} \pm 2.3 \text{ ng/ml}$, $p = 0.002$) and V+R ($7.5 \text{ ng/ml} \pm 4.2 \text{ ng/ml}$ vs $12.8 \text{ ng/ml} \pm 2.1 \text{ ng/ml}$, $p = 0.02$) groups between the two time points.

After evaluation of these results, standard OT *in vitro* culture medium (control group) and standard medium enriched with 50 ng/ml VEGF-A and 1 $\mu\text{g/ml}$ rutin (V+R) were chosen for the second xenotransplantation study.

Effect of in vitro activation of OTs before xenotransplantation on revascularization and expression of genes related to folliculogenesis, maintenance of tissue integrity and damage

After 28 days of xenotransplantation, grafts were evaluated for human mature blood vessels using α -SMA staining. Non-grafted OTs served as controls. The number of α -SMA-positive vessels in the periphery of the tissues was counted to assess vascular network reconstitution between the graft and the host. Grafted OTs (both control and V+R) had significantly more mature blood

vessels than non-grafted OTs. OTs in V+R group showed an average of 18 mature vessels compared to 14 in the control grafted group, though no significant differences were found ($p = 0.289$) (Fig. 9, a). Additionally, mouse *Cd31* gene expression, which indicates host vascular endothelial cell invasion, was assessed. V+R OT grafts had a lower ΔCt value (2.3 cycles), indicating earlier and higher expression of *Cd31* gene, suggesting better vascularization compared to control grafted OTs (ΔCt of 3.2 cycles) (Fig. 9, b).

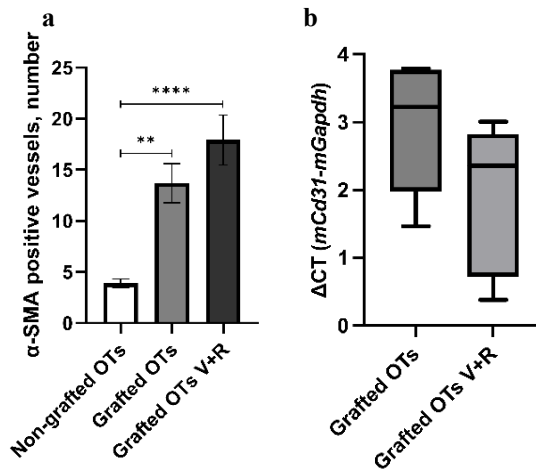


Figure 9. Assessment of vascularization in ovarian tissues (OTs) after 28 days of xenotransplantation. **(a)** quantification of α -SMA in the periphery (0-500 μ m) of OTs. Three randomly selected fields of views were analyzed for each OT; **(b)** comparison of normalized expression (ΔCt) values of mouse *Cd31* gene after xenotransplantation. Results are shown median $\pm$ IQR, whiskers represent the minimum and maximum value. Ct, amplification cycle; IQR, interquartile region; OT, ovarian tissue; R, rutin; V, vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). Significant differences indicated as follow: ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

After 28 days of xenotransplantation, the impact of enriching the *in vitro* medium with V+R prior to grafting was analyzed for tissue integrity, folliculogenesis, and tissue damage in OT grafts. While no significant differences were observed in the expression of structural genes like *collagen 6*, *collagen 18* and *fibronectin 1* between grafted groups, both showed a downregulation compared to non-grafted OTs.

When assessing follicular development, the V+R group showed a smaller downregulation in the expression of *FOXL2* (a marker for primordial and intermediate follicles) and *CYP19A1* (a marker for secondary follicles), suggesting that the V+R group preserved more follicles. Furthermore, the V+R group had less variation in gene expression, indicating more stable follicular preservation.

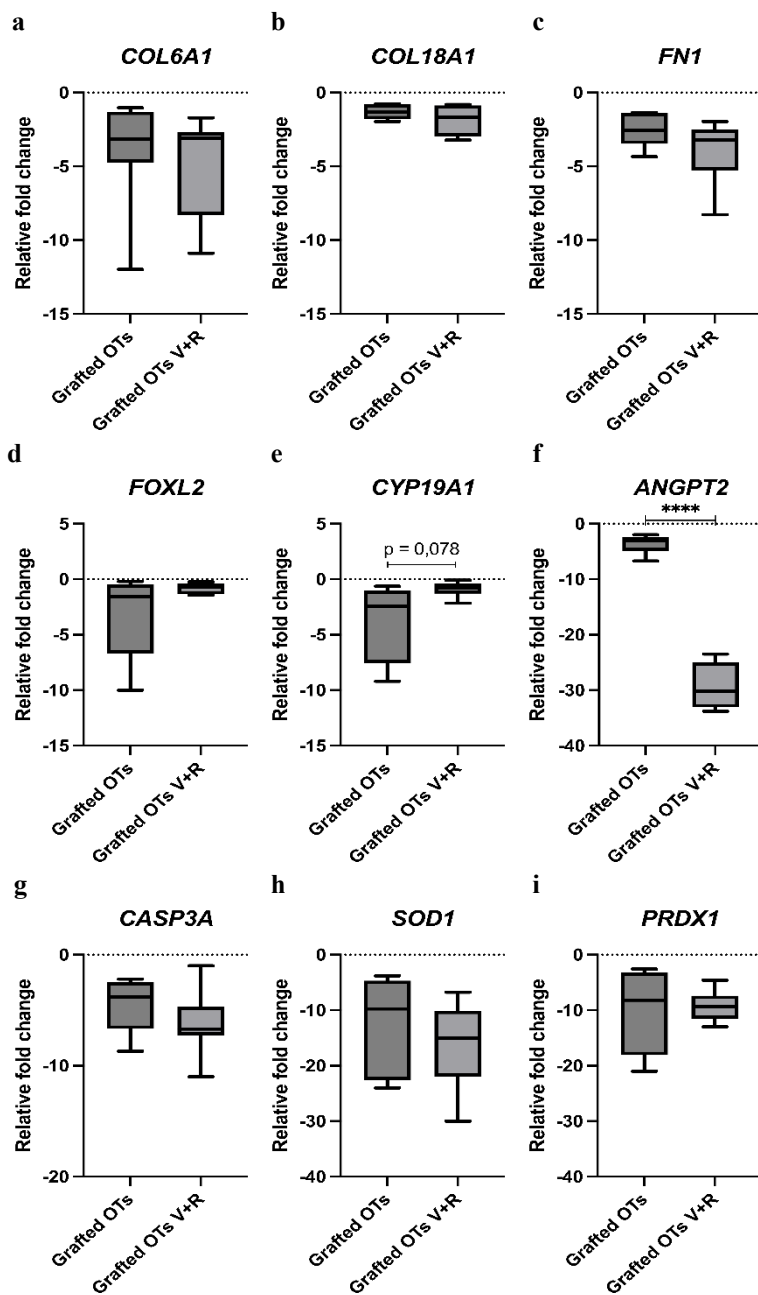


Figure 10. Evaluation of gene expression between grafted ovarian tissues after 28 days of xenotransplantation. Genes related to tissue integrity ((a) *COL6A1*, (b) *COL18A1* and (c) *FN1*), folliculogenesis ((d) *FOXL2* and (e) *CYP19A1*) and damage ((f) *ANGPT2*, (g) *CASP3A*, (h) *SOD1* and (i) *PRDX1*). OT, ovarian tissue; R, rutin; V, vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). Significant differences indicated as follow: **** $p < 0.0001$.

In terms of tissue damage, genes associated with cell damage (*CASP3A*, *SOD1*, *PRDX1*) were downregulated in both grafted groups, with the V+R group showing a slightly greater downregulation in expression, which could imply better protection against damage. Additionally, in V+R group 27-fold lower expression of *angiopoietin 2*, a gene linked to vascular instability and inflammation, was detected ($p < 0.0001$), suggesting reduced inflammation.

Overall, while there were no major statistical differences between the grafted groups, the results suggest that the V+R-enriched medium prior to transplantation potentially helped preserve tissue integrity and follicles more efficiently with less tissue damage and inflammation.

Influence of ovarian stromal cells on human follicle growth

A total of 382 follicles were isolated from 18 ovarian tissue fragments. Most follicles were primordial (97 %; 370/382) while only 3 % were at the primary stage (12/382). Immediately after isolation, 96 % of the follicles were viable.

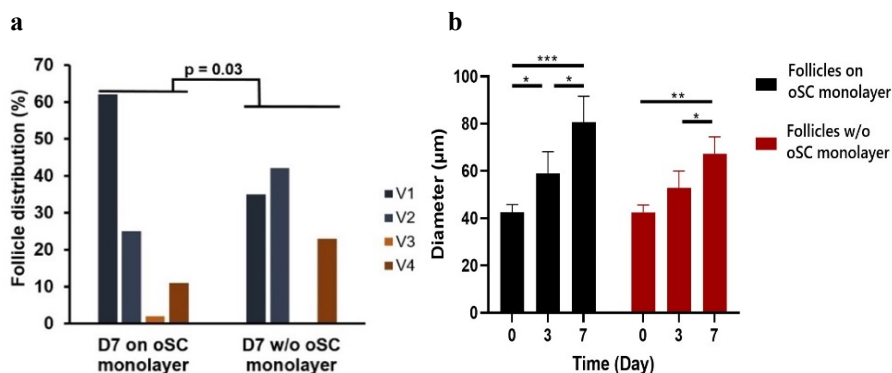


Figure 11. Viability and growth of follicles through *in vitro* culture on oSC monolayer or no without. **(a)** distribution of the follicles into viability classes on day 7 of *in vitro* culture: V1: viable follicle; V2: viable follicle with minimal damage < 10 % of dead granulosa cells; V3: moderate damaged follicle with 10–50 % of dead granulosa cells; V4: dead follicle with > 50 % of granulosa cells and/or dead oocyte; **(b)** follicle diameter growth on days 0, 3 and 7 of *in vitro* culture. Significant differences indicated as follow: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

After 7 days of *in vitro* culture viability assay was performed once more. The analysis showed no significant difference in the proportion of viable (V1 + V2) and damaged (V3 + V4) follicles between the two groups. However, when compared to day 0, we observed a significant decrease in the viability of the follicles grown without oSC monolayer (96 % / 13 % vs 77 % / 23 %, $p = 0.043$), while those grown on oSC monolayer did not experience significant damage ($p = 0.232$). Interestingly, there was a significant

difference in the distribution pattern of V1, V2, V3 and V4 follicles between the two groups on day 7 (Fig. 11, a).

During culture, a significant increase in the mean diameter of the follicles was observed within both groups on different days of *in vitro* culture (Fig. 11, b). On day 7, follicles on the oSC monolayer tended to grow faster and larger ($80.65 \pm 10.98 \mu\text{m}$) compared to those without the oSC monolayer ($67.30 \pm 7.19 \mu\text{m}$). However, no significant difference was observed ($p = 0.07$). Throughout the 7 days of *in vitro* culture, we found a significantly higher number of growing follicles after 3 and 7 days of *in vitro* culture on oSC monolayer compared to the group without oSC (Table 1).

Table 1. Primordial/intermediate, primary, and secondary follicle distribution before and after *in vitro* culture. oSC – ovarian stromal cells.

Day 0	Primordial / intermediate	Primordial	Secondary
With oSC monolayer	96 % (184/191)	4 % (7/191)	- (0/191)
Without oSC monolayer	97 % (186/191)	3 % (5/191)	- (0/191)
Day 3			
With oSC monolayer	70 % (124/177)	14 % (25/177)	16 % ^a (28/177)
Without oSC monolayer	81 % (141/175)	12 % (21/175)	7 % ^b (13/175)
Day 7			
With oSC monolayer	35,5 % (51/144)	20 % (29/144)	45,5 % ^c (64/144)
Without oSC monolayer	56 % (84/149)	14 % (21/149)	30 % ^d (44/144)

Distributions (primordial/intermediate, primary and secondary) with different superscripts differ significantly between the groups on the exact day (^{a,b} $p < 0.05$; ^{c,d} $p < 0.001$).

This indicates that more primordial follicles developed into primary and secondary follicles in the group with oSC monolayer after 3 and 7 days of *in vitro* culture (Table 1). On day 3, we observed that 23 of the 28 secondary follicles grown on the oSC monolayer group, were at the early/mid-stage and 5 were at the mid/late stage. In contrast, all 13 secondary follicles in the group without oSC were at the early/mid-stage during the same period. On day 7, we found 46 early/mid, 16 mid/late, and 2 late ($170 \mu\text{m}$ and $200 \mu\text{m}$) secondary

follicles after culture on the oSC monolayer, whereas 36 early/mid, 7 mid/late and one late (170 μ m) secondary follicle grew without oSC.

The measurement of estradiol in spent medium on day 7 revealed that follicles cultured on oSC monolayer secreted a significantly higher amount of this hormone compared to those cultured without oSC (54.1 ± 14.2 pg/ml vs 29.9 ± 4.0 pg/ml; $p = 0.006$).

A survey of guidelines, counselling practices and FP on the Nordic-Baltic region

A total of 17 pediatric oncology centers responded to the questionnaire, yielding a response rate of 74%. More than half of the respondents (65%) indicated that their country has established national guidelines on FP for cancer patients. While some centers reported the existence of approved national guidelines, others within the same country were either unaware of them (e.g., Norway and Sweden) or indicated their absence (e.g., Finland). Additionally, three countries — Estonia, Iceland, and Latvia — reported the absence of approved national FP guidelines.

Altogether, 65 % of centers reported having guidelines for one or more FP options based on therapeutic agents, patient age or other criteria, there was clear consensus regarding guidelines for offering sperm and oocyte cryopreservation based on pubertal maturation.

Most centers stated that FP is performed before high gonadotoxic treatments, such as hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), gonad-exposing radiation, and in some cases, high-dose alkylating agents. The majority offer FP for patients with Hodgkin's disease (88 %), non-Hodgkin lymphoma (82 %), Ewing's sarcoma/soft tissue sarcoma (82 %), osteosarcoma (82 %), and those undergoing stem cell transplantation (88 %). However, fewer than half provide FP for patients with leukemias (45 %), Wilms' tumor (35 %), or germ cell tumors (35 %).

While majority (88 %) of centers offer counseling on fertility issues, some patients and parents lack access due to factors like age (35 %), language barriers (29 %) or time constraints (24 %). Counseling is mostly provided by pediatric oncologists (88 %) or gynecologists (65 %).

Predominantly, sperm cryopreservation is offered across all centers for pubertal boys, while testicular tissue cryopreservation is provided at 41 % of pediatric oncology centers for pre-pubertal boys. Oocyte cryopreservation is offered to pubertal girls at 88 % of the centers, and ovarian tissue cryopreservation is offered to prepubertal and pubertal girls at 82 % of the questioned centers.

DISCUSSION

Advancements in cancer treatment have significantly increased patient survival rates, leading to a growing focus on improving post-treatment quality of life, particularly FP. As chemotherapy and radiotherapy are known to cause premature ovarian failure, preserving fertility is a critical concern for cancer survivors (Wallace *et al.*, 2010). Various international guidelines recommend embryo, oocyte and OT cryopreservation as key FP strategies (Oktay *et al.*, 2018; von Wolff *et al.*, 2019; The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation *et al.*, 2020). However, while these methods have shown promise, further validation is needed to ensure their effectiveness and safety in clinical practice.

This study evaluated the impact of passive slow freezing and rapid thawing on OT, aiming to determine whether this method preserves OT integrity and functionality. Though passive slow freezing is not a common slow freezing method, recent pre-clinical study revealed it being a cheaper and low-risk alternative to a controlled environment slow freezing using freezing machines (Asadi *et al.*, 2024), while some time ago a autotransplantation of OT frozen using passive slow freezing showed a successful tissue engraftment and functionality (Póvoa *et al.*, 2016). However, the risk of uncontrolled ice forming remains (Zhang *et al.*, 2011). Histological and molecular analyses confirmed that slow freezing maintains tissue structure and stromal cell viability, aligning with findings from previous studies (Rodrigues *et al.*, 2021; Ouni *et al.*, 2022; Grosbois *et al.*, 2023; Candelaria *et al.*, 2024). Importantly, no evidence of malignant cell contamination was found, reinforcing the safety of this approach for cancer patients. Furthermore, xenotransplantation experiments conducted for the first time in Lithuania (Gudlevičienė *et al.*, 2020) demonstrated high tissue viability (80 %) and successful vascular network restoration post-transplantation, supporting the potential clinical application of this method (Lierman *et al.*, 2021).

Despite these promising results, molecular analyses revealed changes in miRNA expression related to stress response, apoptosis, and hormonal signaling. These alterations could influence follicular development and hormone regulation after transplantation (Das and Arur, 2017; Li *et al.*, 2021; Kong *et al.*, 2024), highlighting the need for further research. Specifically, the observed downregulation of angiogenic pathways suggests potential challenges in restoring OT blood supply, which may impact long-term tissue survival and functionality (Maidarti *et al.*, 2020). Overall, this study supports slow freezing as a cost-effective and reliable method for FP, particularly for cancer patients at risk of ovarian failure.

The study highlights the critical challenge of hypoxia and oxidative stress during the first week after OT xenotransplantation, which persists until revascularization is restored (van Eyck *et al.*, 2009 and 2010). Gene expression analysis has shown that upregulated genes during this phase are linked to tissue remodeling, adhesion, migration, and vascularization (van Langendonck *et al.*, 2014). Consequently, researchers have increasingly focused on pre-activating OT before transplantation using fragmentation, encapsulation, or culture medium enrichment with growth factors, hormones, and antioxidants to minimize damage (Cacciottola *et al.*, 2021).

In this study, OT was activated *in vitro* for 36 hours using various culture medium compositions. The combination of 50 ng/mL VEGF-A and 1 µg/mL rutin yielded the best results in maintaining OT viability and progesterone production compared to standard culture conditions. While previous research indicated that rutin alone in high concentrations can have pro-apoptotic effects (Lins *et al.*, 2021; Sirotkin *et al.*, 2021), the results of this study align with other research (Araújo *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2024) that when used at the right concentration, it promoted primordial follicle activation and growth while minimizing apoptosis through the PI3K-Akt signaling pathway. On the other hand, VEGF-A plays a crucial role in reducing hypoxia and apoptosis of the cells (Shin *et al.*, 2008). Interestingly, the results suggest a potential antagonistic relationship between VEGF-A and rutin (Luo *et al.*, 2008) in progesterone synthesis, but a synergistic effect in improving OT viability, which had not been demonstrated before.

The second part of the study investigated the impact of V+R on vascular network restoration post-xenotransplantation. The OT pre-treated with V+R exhibited enhanced vascularization, with a greater number of functional and mature blood vessels compared to untreated OT. The presence of VEGF-A appeared to promote early angiogenesis, while its interaction with *angiopoietin-1* contributed to vessel maturation and stabilization (Youm *et al.*, 2016; Olesen *et al.*, 2023). This suggests that the V+R combination not only accelerates revascularization but also ensures the formation of a more stable vascular network, which is critical for successful transplantation outcomes.

Furthermore, previous studies have confirmed that freezing / thawing does not significantly alter OT, but *in vitro* culture does by reducing collagen levels, triggering extracellular matrix remodeling (Grosbois *et al.*, 2023; Candelaria *et al.*, 2024). Xenotransplantation also induces extracellular matrix changes, with alterations in collagen VI, XVIII, and fibronectin expression, suggesting an adaptive response prioritizing tissue viability over structure (Gavish *et al.*, 2015; Chiti *et al.*, 2023) which correlates with the results in this study. Successful revascularization was achieved, and follicular depletion did

not occur, indicating OTs remained functional post-transplantation. Oxidative stress and apoptosis markers decreased post-xenotransplantation compared to frozen / thawed OTs, highlighting the benefits of antioxidants in mitigating ROS-related damage (Sun *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2024). Decreased expression of angiopoietin-2, CTGF, and LOX can suggest restored physiological conditions (Nagashima *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2013; Ouni *et al.*, 2021) within 28 days.

In vitro OT activation with V+R preserved viability and steroidogenesis, with xenotransplantation showing a trend toward a more stable vascular network. However, some studies question the clinical relevance of pre-transplant manipulations (Dolmans *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2021; Shiroma *et al.*, 2021; Azevedo *et al.*, 2022; Olesen *et al.*, 2023), leaving uncertainty about whether such techniques will replace standard thawed OT transplantation.

Another achievement of this study was demonstrated rapid development of human ovarian primordial and intermediate follicles into secondary follicles within just one week using a 3D *in vitro* co-culture system. This approach presents a significant improvement over traditional ovarian cortex cultures (Laronda *et al.*, 2014; Younis *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2021; Schallmoser *et al.*, 2022), which contain a heterogeneous mix of preantral follicles, making it difficult to track the precise activation of primordial follicles.

A key aspect of this research was the use of oSCs derived from post-menopausal women as a feeder layer, an approach that more accurately reflects the ovarian environment of cancer patients who have undergone treatment. The study highlights the potential for developing an artificial ovary using preantral follicles isolated from cryopreserved OT before cancer treatment and oSCs obtained from patients in remission. This method may provide fertility restoration options for young girls and women affected by hematological malignancies and other cancer with high-risk of ovarian metastasis (Grubliauskaitė *et al.*, 2023a) and those undergoing gonadotoxic treatments for autoimmune diseases (Marder *et al.*, 2012).

It is known that cellular composition of the ovarian stroma from post-menopausal ovarian tissue primarily consists of endothelial, immune, lymphatic endothelial, perivascular, smooth muscle and stromal cells (Lengyel *et al.*, 2022), with an inflammatory environment that may contribute to follicle depletion (Ansere *et al.*, 2021; Lliberos *et al.*, 2021; Ouni *et al.*, 2022). However, cells isolated from post-menopausal ovaries demonstrated remarkable plasticity *in vitro*, showing the ability to survive, proliferate, and secrete extracellular matrix components (Asiabi *et al.*, 2020; Maruhashi *et al.*, 2020). While this study did not fully characterize the isolated cell populations,

our previous research (Dadashzadeh *et al.*, 2022) suggests that most of these cells are fibroblasts and mesenchymal cells.

Although the study found that oSCs did not directly enhance follicle growth, the oSC feeder layer appeared to support follicular development, likely by enriching the culture medium with growth factors and cytokines. This led to a higher survival rate and an increased transition of non-growing follicles into actively developing follicles over the 7-day culture period. The findings align with previous research demonstrating the beneficial effects of feeder layers on preantral follicle survival and growth in mice (Tingen *et al.*, 2011; Itami *et al.*, 2011; Tagler *et al.*, 2012; Sarabadani *et al.*, 2021), cows (Itoh and Hoshi, 2000) and humans (Wu *et al.*, 2021), emphasizing the importance of cell-cell interactions in folliculogenesis.

Future research will focus on identifying specific bioactive factors and signaling pathways involved in follicle development. Advanced techniques such as single-cell RNA sequencing (Fan *et al.*, 2019; Wagner *et al.*, 2020) and proteomic analyses of spent culture media (Chiswick *et al.*, 2012; Nakashima *et al.*, 2018) could help clarify the mechanisms by which oSCs influence follicle survival and growth. These findings have important implications for assisted reproductive technologies and FP strategies, particularly for cancer patients and individuals undergoing treatments that impact ovarian function.

With advancements in FP technologies, pediatric oncology centers must ensure they are adequately prepared to offer these services. A survey of Baltic-Nordic pediatric oncology centers assessed the availability of FP strategies, patient counseling, and adherence to guidelines. The results showed that while sperm freezing is available in all centers, oocyte and OT freezing is offered by 80% while testicular tissue freezing by only 40%. These differences suggest an uneven implementation of FP strategies across the region.

A major challenge lies in the variation of national guidelines and physician awareness. While most centers follow Nordic Network recommendations (Recommendations, 2015a and 2015b), some have begun to adopt alternative guidelines such as those from the PanCareLIFE consortium (Stukaite-Ruibiene *et al.*, 2023). However, inconsistencies remain in risk stratification, particularly regarding chemotherapy doses. Unlike European (Mulder *et al.*, 2021a and 2021b) and American guidelines (Meacham *et al.*, 2020) that set specific dosage thresholds, the Nordic guidelines take a more generalized approach, leading to disparities in patient eligibility criteria (Recommendations, 2015a and 2015b). Additionally, patient and parent education remain a significant barrier. Studies indicate that many families do not receive comprehensive information about fertility risks,

and even when they do, the emotional stress of a cancer diagnosis often prevents full comprehension (Sullivan-Pyke *et al.*, 2018; Anazodo *et al.*, 2019; Omani-Samani *et al.*, 2021; Zobielaite *et al.*, 2022; Stukaite-Ruibiene *et al.*, 2023; Pampanini *et al.*, 2024). Only 41% of surveyed centers confirmed they provide written materials to patients, and factors such as young patient age, language barriers, and time constraints further limit effective counseling.

In conclusion, addressing the discrepancies in FP services requires better standardization of guidelines, improved physician education, and more effective patient communication. Strengthening collaboration among pediatric oncology centers will be crucial in ensuring that all young cancer patients have equal access to FP options. Both globally and in this dissertation, efforts have been made to develop new strategies for restoring fertility in the most vulnerable patient groups. However, further validation and research are essential to enable their broader application in clinical practice.

CONCLUSIONS

1. The ovarian tissue slow freezing / rapid thawing protocol evaluated in this study is effective and safe method: histological, immunohistochemical, molecular, and xenotransplantation studies showed no damage to tissue integrity and extracellular matrix components, no massive activation of stromal and follicular cells, and no malignancy. Ovarian tissues retain viability and ability to safely engraft during transplantation.

2. *In vitro* culture of ovarian tissues using different medium components and combinations thereof improves the recovery of ovarian tissues after freezing / thawing:

a. Enrichment of standard culture medium with VEGF-A 165 and rutin combination significantly reduces *in vitro* culture cytotoxicity and successfully restores progesterone secretion after both 36 h and 72 h of cultivation.

b. Enrichment of standard culture medium with VEGF-A 165 and rutin prior to xenotransplantation has no significant effect on ovarian tissue transplantation, yet ovarian tissues treated with VEGF-A 165 and rutin exhibit improved hybrid vascularization and show a slight advantage in protecting tissue structure (*COL6A1*, *COL18A1*, *FNI*) and follicles at different developmental stages (*FOXL2*, *CYP19A1*) from damage (*CTFG*, *LOX*, *CASP3A*, *SOD1*) when compared to the effects of standard culture medium.

3. *In vitro* construction of artificial ovary is an effective alternative to ovarian tissue transplantation:

a. Incorporation of ovarian stromal cells into the artificial ovary model significantly improves growth and viability of primordial and intermediate follicles: follicles on ovarian stromal cells monolayer retain ~2-fold higher numbers of the highest viability category follicles and are found dead at a rate 2-fold lower than in artificial ovary model without ovarian stromal cells.

b. Primordial and intermediate follicles in the artificial ovary model on ovarian stromal cells monolayer develops a significantly higher number of follicles of higher – primary and secondary – developmental stage, which are characterized by higher hormone secretion *in vitro*.

4. The results of the survey showed that fertility care for oncology patients and / or approved fertility preservation clinical practice guidelines, indications and strategies vary between Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology member countries and need to be standardized to introduce consistent patient counselling, a unified standardized system for fertility risk assessment and to strengthen international cooperation.

RECOMMENDATIONS

1. A slow freezing / rapid thawing protocol can be used to preserve female fertility by preserving structure, viability, functionality, follicular development and restoring steroidogenesis *in vitro*.

2. A faster and ethically acceptable method for searching for metastatic breast tumour cells in ovarian tissue is recommended: identification of a specific miRNA profile, out of 15 miRNAs significantly ($p < 0.05$, fold change > 4) altered in expression.

PADĖKA

Dėkoju visiems, kurie nors kruopelyte prisidėjo prie šio darbo įgyvendinimo.

Dėkoju ir išreiškiu didžiausią pagarbą vadovei. Dėkoju už suteiktą galimybę prisidėti prie vaisingumo išsaugojimo projekto, situacijos Lietuvoje gerinimo, ilgos ir labai naudingos komandiruotės bei laisvės plėstis už laboratorijos ribų. Dėkoju už rūpestį, pasitikėjimą ir užtikrintą išleidimą į mokslininkės gyvenimą.

Dėkoju Nacionalinio vėžio instituto Biobanko darbuotojoms, studentėms ir kolegoms iš kitų mokslinių padalinių, institucijų – Vilniaus universiteto, VUL Santaros klinikų, Šiaurės šalių pediatriinės hematologijos ir onkologijos draugijai bei Katalikiškojo Liuvono universiteto – už pagalbą, patarimus, diskusijas ir problemų sprendimus visu disertacijos rengimo periodu.

Dėkoju TREL projekto kolegoms už supažindinimą ir įtraukimą į didelės reikšmės turintį projektą. Be jo nebūtų susipažinta su bendraminčiais mokslininkais bei gydytojais iš kitų Europos šalių, kurie padeda atvesti naujoves į Lietuvą.

Dėkoju šeimai. Jūsų supratingumas, palaikymas ir rūpestis leido man pilnai atsiduoti šiai kelionei ir ją išpildyti. Ši patirtis leido augti ne tik kaip mokslininkei, bet ir asmenybei.

Bet didžiausią padėką skiriu “Onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimo programos“ dalyvėms, kurios sutiko dalyvauti šiame biomedicininame tyrime ir leido dalį kiaušidės audinių panaudoti mokslui. Be jų nebūtų šio disertacijos darbo ir nebūtų priartėta prie galimybės išsaugoti vaisingumą užšaldant kiaušidės audinį kitoms pacientėms. Be jų noro bei motyvacijos nebūtų artėjama prie retransplantacijos įgyvendinimo Lietuvoje, kuris bus šio darbo pratęsimas.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Remiantis disertacijos rezultatais paskelbtos publikacijos:

Grubliauskaite M, Prokofjeva V, Breimelyte D, Petroska D, Rascon J, Gudleviciene Z. In vitro culture of ovarian tissue before xenotransplantation – is it beneficial? Priduotas rankraštis į žurnalą.

Disertacijos autorė yra pagrindinė tyrimo idėjos įgyvendintoja ir tyrimo tyrėja. Autorė planavo tyrimus, atliko eksperimentus, ruošė dokumentus Valstybės vaistų ir veterinarijos tarnybai dėl leidimo atlikti eksperimentus su laboratoriniais gyvūnais. Autorė analizavo, apdorojo ir interpretavo gautus rezultatus, juos pristatė tarptautinėse mokslinėse konferencijose bei jų pagrindu su bendraautoriais parengė publikaciją.

Grubliauskaite M, Gudleviciene Z, Oskam IC, Asadi-Azarbaijani B, Jahnukainen K. Guidelines, counseling practices and fertility preservation options for childhood cancer patients in the Nordic-Baltic region. Priimtas į *JCO Oncology Practice*. <https://doi.org/10.1200/OP-24-00623>

Disertacijos autorė yra tyrimo tyrėja. Autorė analizavo, apdorojo ir interpretavo gautus apklausos rezultatus bei jų pagrindu su bendraautoriais parengė publikaciją.

Grubliauskaitė M, Vlieghe H, Moghassemi S, Dadashzadeh A, Camboni A, Gudlevičienė Ž, Amorim CA. Influence of ovarian stromal cells on human ovarian follicle growth in a 3D environment. *Human Reproduction Open*. 2023;2024(1):hoad052. <http://doi.org/10.1093/hropen/hoad052>

Disertacijos autorė yra pagrindinė tyrimo idėjos įgyvendintoja ir tyrimo tyrėja. Autorė planavo tyrimus, atliko eksperimentus. Autorė analizavo, apdorojo ir interpretavo gautus rezultatus, juos pristatė tarptautinėse mokslinėse konferencijose bei jų pagrindu su bendraautoriais parengė publikaciją.

Gudlevičienė Ž, Žilinskas K, Kundrotas G, **Grubliauskaitė M**, Baltriukienė D, Bukelskienė V. Slow-Freezing Cryopreservation Ensures High Ovarian Tissue Quality Followed by In Vivo and In Vitro Methods and Is Safe for Fertility Preservation. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(10):547. <https://doi.org/10.3390/medicina56100547>

Disertacijos autorė yra tyrimo tyrėja. Autorė atliko eksperimentus su pelėmis. Autorė analizavo, apdorojo ir interpretavo rezultatus, juos pristatė tarptautinėse mokslinėse konferencijose bei jų pagrindu su bendraautoriais parengė publikaciją.

Kitos disertacijos tema paskelbtos publikacijos:

Grubliauskaite M, van der Perk MEM, Bos AME, Meijer AJM, Gudleviciene Z, van den Heuvel-Eibrink MM, Rascon J. Minimal infiltrative disease identification in cryopreserved ovarian tissue of girls with cancer for future use – a systematic review. *Cancers (Basel)*. 2023;15(17), 4199. <https://doi.org/10.3390/cancers15174199>

Disertacijos autorė yra sisteminės apžvalgos idėjos įgyvendintoja ir pirmoji bendraautorė kartu su van der Perk. Autorė atliko publikacijų atranką, analizę ir gautų rezultatų interpretaciją bei jų pagrindu su bendraautoriais parengė publikaciją.

KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

Grubliauskaite M, Prokofjeva V, Breimelyte D, Petroska D, Rascon J, Gudleviciene Z. In vitro culture with rutin and VEGF-A before xenotransplantation protects ovarian tissue from ischemia and oxidative damage but not from growing follicle depletion. Stendinis pranešimas. 40th European Society of Reproduction and Embryology (ESHRE) konferencija, 2024 m. liepos 8-10 d., Amsterdamas, Nyderlandų Karalystė. DOI: 10.1093/humrep/dead093.758

V. Prokofjeva, **M. Grubliauskaitė**. Changes in human ovarian tissue treated with rutin and VEGF-A after xenotransplantation. Stendinis pranešimas. The COINS 2024 konferencija, 2024 m. balandžio 15-18 d., Vilnius, Lietuva.

M. Grubliauskaitė. Update on the situation of clinical and basic research on fertility preservation in Lithuania. Žodinis pranešimas. 10th Meeting of the Nordic Centre for Fertility Preservation in Children after Childhood Cancer Treatment metinis susitikimas, 2023 m. lapkričio 16-17 d., Krapihovi, Suomija.

M. Grubliauskaitė, H. Vlieghe, S. Mighassemi, Ž. Gudlevičienė, C. A. Amorim. Stromal cell feeder layer promotes growth, survival, and development of pre-antral human follicles in alginate scaffolds. Žodinis pranešimas. International Federation of Fertility Societies 2023 pasaulio kongresas, 2023 m. rugsėjo 10-13 d., Atėnai, Graikijos Respublika.

M. Grubliauskaite, H. Vlieghe, S. Mighassemi, Ž. Gudlevičienė, C. A. Amorim. Artificial ovary construction: short-term in vitro culture of human primordial and primary follicles in a 3D environment on a stromal cell feeder layer. Stendinis pranešimas. 39th European Society of Reproduction and Embryology (ESHRE) konferencija, 2023 m. birželio 25-28 d., Kopenhaga, Danijos Karalystė. DOI: 10.1093/humrep/dead093.758

M. Grubliauskaitė. Update on the situation of clinical and basic research on fertility preservation in Lithuania. Nuotolinis žodinis pranešimas. 9th Meeting of the Nordic Centre for Fertility Preservation in Children after Childhood Cancer Treatment metinis susitikimas, 2021 m. lapkričio 22-24 d., Borgarbyggð, Islandija.

Grubliauskaitė, M., Gudlevičienė, Ž., Kundrotas, G. Quality control methods for thawed ovarian tissue after cryopreservation. Nuotolinis stendinio pranešimo žodinis prastatymas. International Young Scientists Conference on Molecular and Cell Biology 2021 konferencija, 2021 m. vasario 25-26 d., Varšuva, Lenkija.

M. Grubliauskaitė. Update on the situation of clinical and basic research on fertility preservation in Lithuania. Žodinis pranešimas. 8th Meeting of the Nordic Centre for Fertility Preservation in Children after Childhood Cancer Treatment metinis susitikimas, 2020 m. vasario 6-7 d., Ryga, Latvija.

GYVENIMO APRAŠAS

Vardas Pavardė Monika Grubiauskaitė

Adresas Gyvybės mokslų centras, Saulėtekio al. 7, 10257,
Vilnius, Lietuva

El. paštas monika.grubliauskaite@gmc.vu.lt

IŠSILAVINIMAS

2019 – 2025 Doktorantūros studijos, gamtos mokslai, biologija,
Vilniaus universitetas

2016 – 2018 Magistro studijos, molekulinė biologija, Vilniaus
universitetas

2012 – 2016 Bakalauro studijos, molekulinė biologijos, Vilnius
universitetas

DARBINĖ VEIKLA

2025 04 iki dabar Produkto specialistė, NV Fertiga

2023 11 – 2025 02 Tyrėja, biomedicininis tyrimas “Predikcinių bei
prognostinių biožymenų paieška metastatine
melanoma bei inkstų karcinoma sergantiems
pacientams, gydomiems imunoterapija
(BIOMELKID)“ (leidimo nr. L-23-10), Nacionalinis
vėžio institutas

2020 01 – 2025 02 Jaunesniojo mokslo darbuotoja, Nacionalinis vėžio
institutas

2023 03 – 2023 08 Tyrėja, biomedicininis tyrimas “Gimdos gleivinės
(endometriumo) vėžio nustatymas taikant gimdos
kaklelio DNR metilino tyrimus (Endo-Cancer-
2022)” (leidimo nr. 2023/02-1486-956), Nacionalinis
vėžio institutas

2021 06 – 2023 12 Projekto specialistė, projektas “Mokslinių tyrimų ir
švietimo bendradarbiavimo projektas, siekiant
pagerinti vaikų, sergančių piktybiniais navikais,
išgyvenamumą Lietuvoje (TREL)“ (projekto nr.
952438), VUL Santaros klinikos

2020 06 – 2022 05	Jaunesnioji mokslo darbuotoja, projektas “Genetinių gyvūnų modeliavimo centras“ (projekto nr. 01.2.2-CPVA-K-703-03-0032), Vilniaus universitetas
2019 12 – 2023 12	Tyrėja, biomedicininis tyrimas “Onkologinių pacientų vaisingumo išsaugojimo programa” (leidimo nr. 158500-14-743-260 papildymas Nr. 1), Nacionalinis vėžio institutas
2019 07 – 2020 04	Vyresnioji klinikinių tyrimų asistentė, UAB AbbVie
2018 04 – 2019 07	Klinikinių tyrimų ir medicinos reikalų asistentė, UAB AbbVie
2017 07 – 2018 04	Klinikinių tyrimų asistentė, UAB AbbVie

STAŽUOTĖS

2022 06 – 2022 07	Princess Maxima vaikų onkologijos centras (Utrechtas, Nyderlandų Karalystė)
2020 11 – 2021 06	Katalikiškojo Liuvono Universiteto Reprodukcinės patofiziologijos laboratorija (Briuselis, Belgijos Karalystė)

KITŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Dadashzadeh A, Moghassemi S, **Grubliauskaitė M**, Vlieghe H, Brusa D, Amorim CA. Medium supplementation can influence the human ovarian cells in vitro. *J Ovarian Res.* 2022. <https://doi.org/10.1186/s13048-022-01081-2>
2. Balčiūnas E, Baldock SJ, Driežė N, **Grubliauskaitė M**, Coultas S, Rochester DL, Valius M, Hardy JG, Baltriukienė D. 3D Printing Hybrid Organometallic Polymer-Based Biomaterials Via Laser Two-Photon Polymerization. *Polymer International.* 2019. <https://doi.org/10.1002/pi.5909>
3. Balčiūnas E, Driežė N, **Grubliauskaitė M**, Urnikytė S, Šimoliūnas E, Coultas S, Bukelskienė V, Valius M, Baldock SJ, Hardy JG, Baltriukienė D. Biocompatibility investigation of hybrid organometallic polymers for sub-micron 3D printing via laser two-photon polymerization. *Materials (Basel).* 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12233932>

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.