



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej

mgr Anna Niwińska

Ocena wpływu osocza bogatopłytkowego na  
autologiczny przeszczep jajnika  
w procedurze zachowania płodności na  
modelu szczurzym

*Assessment of the effect of platelet-rich plasma on autologous  
ovarian transplant in a fertility preservation procedure in a rat  
model*

Praca doktorska  
*Doctoral Thesis*

Praca wykonana pod kierunkiem  
dr hab. Sławomira Gizińskiego  
i Promotora Pomocniczego  
dr n. wet. Ewy Kautz  
Katedra Chorób Dużych Zwierząt i Klinika  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej



### **Oświadczenie promotora pracy**

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia tej pracy w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data .....

Podpis promotora pracy. ....

### **Oświadczenie autora pracy**

Świadom odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. Nr 90 poz. 631 z późn. zm.)

Oświadczam, że przedstawiona praca nie była wcześniej podstawą procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną. Przyjmuję do wiadomości, że praca dyplomowa poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data .....

Podpis autora pracy.....



## **Źródła finansowania**

Oświadczam, że praca została częściowo sfinansowana z środków pochodzących z grantu Konsorcjum Naukowego KNOW przyznanego na drodze konkursu ESR (Early Stage Research) o numerze KNOW2018/CB/ESR5/7. pod tytułem „Wpływ osocza bogatopłytkowego na angiogenezę i przyjęcie przeszczepu autologicznego tkanki jajnika po kriokonserwacji u szczura” pod kierunkiem dr n.wet. Ewy Kautz.



**Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiodący**



Składam serdeczne podziękowania:

**dr hab. Sławomirowi Gizińskiemu**  
za wsparcie, poświęcony czas, cierpliwość oraz cenne wskazówki

**dr n.wet. Ewie Kautz**  
za współorganizację projektu, pomoc i wsparcie na każdym etapie pracy

**dr n. wet. Ricardo Faundezowi**  
za opiekę mentorską i merytoryczną oraz za wprowadzanie mnie w tajniki technik  
wspomagane go rozrodu

a także:  
zwierzętom laboratoryjnym,  
dzięki którym możliwe jest wykonywanie badań translacyjnych  
i postęp nauk medycznych i biotechnologicznych





## Streszczenie

**Ocena wpływu osocza bogatopłytkowego na autologiczny przeszczep jajnika w procedurze zachowania płodności na modelu szczurzym.** Metoda autologicznego przeszczepu tkanki pobranej i zamrożonej przed rozpoczęciem terapii przeciwnowotworowej jest alternatywą dla witrifikacji oocytów, służąc nie tylko jako technika zachowania płodności, ale także jako szansa na przywrócenie fizjologicznej równowagi hormonalnej i zapobieganie przedwczesnej menopauzie. Efektywność i wydajność tej metody nadal jest stosunkowo niska, ponieważ przeszczepiona do organizmu tkanka zostaje poddana okresowi niedokrwienia i niedotlenienia zanim zostanie wytworzona *de novo* sieć naczyń krwionośnych łącząca tkankę z organizmem, co powoduje obniżenie żywotności tkanki, a także utratę rezerwy pęcherzyków pierwotnych. Celem podjętych badań była ocena fizjologicznej funkcji jajnika szczura po autologicznym przeszczepie oraz przydatności osocza bogatopłytkowego jako katalizatora neowaskularyzacji w procesie przyjęcia się przeszczepu, w szczególności w aspekcie degeneracji rezerwy pęcherzyków. Doświadczenie zostało przeprowadzone na 18 samicach szczurów szczepu WAG. Samice zostały poddane owariektomii, a jajniki poddano witrifikacji z zastosowaniem DMSO (dimetylosulfotlenek), glikolu etylenowego i sacharozy. Po 30 dniach rekonwalescencji szczury poddano zabiegowi autologicznej transplantacji. Po rozmrożeniu prawe jajniki inkubowano przez 15 minut w roztworze soli fizjologicznej typu Dulbecco (DPBS) z dodatkiem osocza bogatopłytkowego (PRP), a lewe jajniki inkubowano w DPBS jako próbę kontrolną. Jajniki przeszczepiono na najbardziej unaczyniony brzeg więzadła szerokiego macicy w modelu jajnik prawy+PRP, jajnik lewy-kontrolny. Po prawej stronie przeszczepu również wstrzyknięto ok 100-200  $\mu$ l PRP. Zwierzęta uśmiercono po 2 (D2), 7 (D7) i 30 (D30) dniach i pobrano tkanki. Liczbę pęcherzyków i analizę histopatologiczną wykonano za pomocą barwienia trójbarwnego typu Massona. Wykonano ocenę apoptozy (immunofluorescencyjne barwienie TUNEL) i unaczynienia tkanki (immunohistochemiczne barwienie PECAM-1). Analizę względnej ekspresji mRNA przeprowadzono dla: ESR $\alpha$ , ESR $\beta$ , AMH, AMHR2, PGR i TNF $\alpha$  za pomocą sond TaqMan techniką rt PCR. Stwierdzono większą liczbę pęcherzyków pierwotnych (D2,  $p=0,003$ ; D7,  $p=0,0047$ ), pierwszorzędowych (D2,  $p=0,006$ ; D7,  $p=0,004$ ), drugorzędowych (D2,  $p=0,0016$ ; D7,  $p=0,0002$ ) i antralnych (D2,  $p=0,0048$ ; D7,  $p=0,0031$ ) w grupie badanej względem grupy kontrolnej. Stwierdzono niższą wartość wskaźników apoptozy w grupie badanej niż w grupie kontrolnej, w obydwóch grupach krótkoterminowych (D2, D7,  $p<0,0001$ ). Stwierdzono większą liczbę i gęstość naczyń w grupie z PRP niż w grupie kontrolnej po 7 dniach od przeszczepu (D7,  $p=0,03$ ), a także wykazano istotne statystycznie korelacje pomiędzy liczbą pęcherzyków a gęstością naczyń. Wykazano różnicę ekspresji mRNA PGR ( $p=0,0098$ ), ESR $\beta$  ( $p=0,038$ ) i ESR $\alpha$  ( $p=0,0046$ ) pomiędzy grupami badaną i kontrolną w grupie D7. Stwierdzono wyższą ekspresję AMH w grupie z PRP w grupie D2 ( $p=0,001$ ) i D7 ( $p=0,02$ ). W świetle wyników można przypuszczać, że osocze bogatopłytkowe podawane bezpośrednio przed oraz w czasie samej procedury autologicznego przeszczepu jajnika wpływa pozytywnie na zachowanie prawidłowej struktury i funkcji tkanki. Długofalowe działanie metody (grupa D30) wymaga dalszych badań, ponieważ badana grupa wykazała niejednorodne wyniki. Uzyskane dane pozwalają lepiej zrozumieć procesy zachodzące w autologicznie przeszczepionej tkance jajnika pod wpływem osocza bogatopłytkowego, a także stanowią podstawę do dalszych badań nad procedurami zachowania płodności.

**Słowa kluczowe:** jajnik, zachowanie płodności, model szczurzy, oncofertility, witrifikacja

## Summary

**Evaluation of the effect of platelet-rich plasma on autologous ovarian transplantation in a fertility preservation procedure in a rat model.** The study evaluates the effect of platelet-rich plasma on autologous ovarian transplantation in a rat model. The method of autologous transplantation of tissue harvested and frozen prior to anticancer therapy is an alternative to oocyte vitrification, serving not only as a fertility preservation technique but also as an opportunity to restore physiological hormonal balance and prevent premature menopause. The efficiency of this method is still relatively low, as the tissue transplanted into the body depends on the period of ischemia and hypoxia before the *de novo* formation of the blood vessels network. The network connects the tissue to the body resulting in a decrease in tissue viability, as well as a loss of primary follicle reserve. The study aimed to evaluate the physiological function of rat ovary after autologous transplantation and the usefulness of platelet-rich plasma as a catalyst for neovascularization in the process of graft acceptance, particularly in terms of degeneration of the follicle reserve. Eighteen female rats of the WAG strain were used in the study. The females were ovariectomized, and the ovaries were vitrified with the use of dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol and sucrose. After 30 days of recovery, the rats underwent autologous transplantation. After thawing, the right ovaries were incubated for 15 minutes in Dulbecco-type saline (DPBS) with platelet-rich plasma (PRP), and the left ovaries were incubated in DPBS as a control. The ovaries were transplanted to the most vascularized edge of the uterine broad ligament in a right ovary+PRP, left ovary-control model. Approximately 250 $\mu$ l of PRP was also injected on the right side of the graft. Animals were sacrificed after 2 (D2), 7 (D7) and 30 (D30) days, and tissues were collected. Vesicle count and histopathological analysis were performed using Masson's trichrome staining. Assessment of apoptosis (immunofluorescent TUNEL staining) and tissue vascularization (immunohistochemical PECAM-1 staining) was performed. Relative mRNA expression analysis was performed for: ESR $\alpha$ , ESR  $\beta$ , AMH, AMHR2, PGR and TNF $\alpha$  using TaqMan probes by rtPCR technique. A higher number of primordial (D2,  $p=0.003$ ; D7,  $p=0.0047$ ), primary (D2,  $p=0.006$ ; D7,  $p=0.004$ ), secondary (D2,  $p=0.0016$ ; D7,  $p=0.0002$ ) and antral (D2,  $p=0.0048$ ; D7,  $p=0.0031$ ) vesicles in the study group relative to the control group was found. Apoptosis rates were found to be lower in the PRP-treated group than in the control group, in both short-term groups (D2, D7,  $p<0.0001$ ). The results indicated the presence of higher number and density of vessels in the PRP group than in the control group at seven days after transplantation (D7,  $p=0.03$ ), and there were statistically significant correlations between the number of vesicles and vessel density. There was a difference in mRNA expression of PGR ( $p=0.0098$ ), ESR $\beta$  ( $p=0.038$ ) and ESR $\alpha$  ( $p=0.0046$ ) between the study and control groups in D7 group. The AMH expression was higher in the +PRP model at both time groups (D2,  $p=0.001$ ; D7,  $p=0.02$ ). The results can indicate that platelet-rich plasma administered immediately before and during the autologous ovarian transplantation procedure has a positive effect on maintaining tissue structure and function. The long-term impact of the method (D30 group) requires further study, as the group showed heterogeneous results. The data obtained allow a better understanding of the processes occurring in autologous transplanted ovarian tissue under the influence of platelet-rich plasma and provide a basis for further research into the procedures of fertility preservation.

**Keywords:** ovary, fertility preservation, rat model, oncofertility, vitrification

## ***Spis treści:***

|      |   |    |
|------|---|----|
| 1.   | Wstęp do dysertacji i przegląd literatury naukowej .....  | 19 |
| 1.1  | „Cesarz wszech chorób”, czyli częstość występowania nowotworów u kobiet .....   | 19 |
| 1.2  | Gonadotoksyczność terapii przeciwnowotworowych .....  | 21 |
| 1.3  | Procedury zachowania płodności .....  | 24 |
| 1.4  | Transpozycja gonad.....   | 24 |
| 1.5  | Mrożenie oocytów i zarodków .....   | 25 |
| 1.6  | Zastosowanie analogów gonadoliberyny .....  | 27 |
| 1.7  | Kriokonserwacja i autologiczny przeszczep tkanki jajnika .....  | 28 |
| 1.8  | Czynniki różnicujące efektywność przeszczepu tkanki jajnika: kriokonserwacja tkanki .....                                 | 31 |
| 1.9  | Czynniki różnicujące efektywność przeszczepu tkanki jajnika: miejsce wszczepu .....                                       | 33 |
| 1.10 | Kierunki rozwoju eksperymentalnych technik związanych z kriokonserwacją tkanki jajnika. ....                              | 34 |
| 1.11 | Modele zwierzęce: czynniki stymulujące neowaskularyzację .....  | 36 |
| 1.12 | Modele zwierzęce: kriokonserwacja i przeszczep całego jajnika .....   | 37 |
| 1.13 | Modele zwierzęce: hodowla pęcherzyków in vitro .....  | 37 |
| 1.14 | Modele zwierzęce: sztuczny jajnik.....  | 38 |
| 1.15 | Modele zwierzęce: inne eksperymentalne strategie zwiększania bezpieczeństwa transplantacji tkanki jajnika.....            | 39 |
| 1.16 | Osocze bogatopłytkowe jako czynnik wspomagający neowaskularyzację przeszczepionej tkanki kriokonserwowanego jajnika ..... | 40 |
| 1.17 | Budowa płytek krwi .....  | 41 |
| 1.18 | Terapie osoczem bogatopłytkowym w medycynie rozrodu.....  | 44 |
| 2.   | Hipoteza pracy:.....  | 49 |
| 3.   | Cel badań: .....  | 51 |
| 4.   | Materiały i metody. ....  | 53 |
| 4.1  | Zwierzęta .....   | 53 |
| 4.2  | Protokół procedury autologicznego przeszczepu tkanki jajnika. Postępowanie ze zwierzętami.....                            | 54 |
| 4.3  | Przygotowanie osocza bogatopłytkowego .....   | 56 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.4   | Witryfikacja i proces ogrzewania tkanki jajnika.....  | 56 |
| 4.5   | Przygotowanie preparatów do oceny histologicznej.....   | 57 |
| 4.6   | Liczenie pęcherzyków.....   | 58 |
| 4.7   | Wyznaczanie obszarów włóknistych w tkance.....  | 59 |
| 4.8   | Barwienie immunohistochemiczne i wyznaczanie obecności naczyń<br>(PECAM 1).....   | 61 |
| 4.9   | Analiza stopnia nasilenia apoptozy komórek tkanki jajnika (TUNEL).....  | 62 |
| 4.10  | Analiza ekspresji mRNA w tkance jajnika: hormonu atymulerowskiego<br>(AMH), receptora dla hormonu antymulerowskiego (AMHR) receptora<br>progesteronowego (PGR) oraz receptorów estrogenowych typu alpha (ESR $\alpha$ ) i<br>beta (ESR $\beta$ ), a także czynnika martwicy nowotworów alpha (TNF $\alpha$ )..... | 64 |
| 4.11  | Analiza statystyczna.....   | 65 |
| 5.    | Wyniki i analiza statystyczna.....  | 67 |
| 5.1   | Analiza histologiczna tkanki jajnika.....   | 67 |
| 5.1.1 | Morfologia pęcherzyków jajnikowych po przeszczepie.....   | 67 |
| 5.2   | Analiza statystyczna: Ogólna liczba pęcherzyków.....  | 69 |
| 5.2.1 | Ogólna liczba pęcherzyków poszczególnych stadiów dojrzałości w<br>tkankach jajników pochodzących z grup krótko, średnio i długoterminowej<br>w porównaniu do grupy porównawczej D0.....   | 70 |
| 5.3   | Analiza liczebności pęcherzyków danych typów względem przynależności do<br>grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym i kontrolnej w porównaniu do<br>grupy D0.....  | 70 |
| 5.3.1 | Grupa krótkoterminowa (po dwóch dniach od przeszczepu).....   | 71 |
| 5.3.2 | Grupa średnioterminowa (po siedmiu dniach od przeszczepu).....  | 72 |
| 5.3.3 | Grupa długoterminowa (po trzydziestu dniach od przeszczepu).....  | 72 |
| 5.4   | Analiza statystyczna: Porównanie par tkanek jajników tego samego zwierzęcia<br>pod względem liczby i rodzaju pęcherzyków w zależności od przynależności<br>do grup traktowanych osoczem bogatopłytkowym i grup kontrolnych.....   | 73 |
| 5.4.1 | Grupa krótkoterminowa (po dwóch dniach od przeszczepu).....   | 73 |
| 5.4.2 | Grupa średnioterminowa (po siedmiu dniach od przeszczepu).....  | 74 |
| 5.4.3 | Grupa długoterminowa (po trzydziestu dniach od przeszczepu).....  | 75 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 5.5   | Analiza statystyczna: Porównanie obszarów fibrotycznych i nekrotycznych w tkankach poddanych tylko mrożeniu (D0), oraz przeszczepionych po dwóch (D2), siedmiu (D7) i trzydziestu (D30) dniach od operacji. ....  | 76 |
| 5.6   | Ocena poziomu apoptozy komórek tkanki jajnika metodą TUNEL .....  | 77 |
| 5.6.1 | Analiza statystyczna: porównanie odsetka jąder apoptotycznych w zależności od grupy .....   | 77 |
| 5.7   | Ocena neowaskularyzacji w tkance jajnika. Ekspresja CD-31 (PECAM-1) na preparacie barwionym metodą immunohistochemiczną. ....   | 79 |
| 5.7.1 | Analiza statystyczna: liczba i gęstość naczyń w tkankach jajnika w zależności od grupy .....  | 79 |
| 5.7.2 | Analiza korelacji występowania naczyń i pęcherzyków danego typu w tkankach jajników poddanych przeszczepowi. ....   | 80 |
| 5.8   | Analiza ekspresji mRNA: receptorów steroidozależnych ( $ESR\alpha$ , $ESR\beta$ , PGR), hormonu antymullerowskiego (AMH) i jego receptora (AMH2), a także markera zapalenia $TNF\alpha$ w tkankach jajników poddanych przeszczepom oraz w jajnikach porównawczych poddanych procedurze witrifikacji. .... | 83 |
| 5.8.1 | Analiza ekspresji receptorów steroidozależnych: receptora progesteronowego oraz estrogenowego alpha i beta. ....  | 83 |
| 5.8.2 | Analiza relatywnej ekspresji hormonu antymullerowskiego (AMH) i receptora dla AMH (AMHR2) w jajnikach.....  | 85 |
| 5.8.3 | Analiza relatywnej ekspresji markera zapalenia $TNF\alpha$ .....  | 87 |
| 5.9   | Wyniki badania cyklu rujowego u szczurów z grupy długoterminowej. ....  | 88 |
| 6.    | Omówienie wyników i dyskusja .....  | 90 |
| 6.1   | Ocena rewaskularyzacji przeszczepionej tkanki jako miernika żywotności i prędkości przyjęcia się przeszczepu. Wpływ osocza bogatopłytkowego na przyspieszenie procesu budowy naczyń.....  | 90 |
| 6.2   | Ocena liczby pęcherzyków oraz typów pęcherzyków jajnikowych w poszczególnych próbach. Wpływ osocza bogatopłytkowego na rezerwę jajnikową przeszczepionych tkanek jajnika. ....  | 95 |
| 6.3   | Ocena żywotności tkanki. Występowanie obszarów zmienionych fibrotycznie i nekrotycznie. Apoptoza w komórkach przeszczepionych tkanek jajników. Wpływ osocza bogatopłytkowego zachowanie żywotności przeszczepionej tkanki.....  | 99 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 6.4 | Ekspresja mRNA genów związanych ze endokrynną funkcją jajnika. Ocena wpływu osocza bogatopłytkowego na zachowanie funkcjonalności osi podwzgórze-jajnik oraz na wewnętrzne procesy regulacyjne jajnika. .... | 103 |
| 6.5 | AMH – marker rezerwy jajnikowej.....   | 107 |
| 6.6 | Ocena efektów długofalowych: grupa D30.....  | 109 |
| 7.  | Wnioski: .....   | 117 |
| 8.  | Spis fotografii, rycin i tabel .....   | 119 |
| 8.1 | Fotografie .....   | 119 |
| 8.2 | Ryciny .....   | 119 |
| 8.3 | Tabele .....   | 120 |
| 9.  | Bibliografia i odniesienia .....   | 121 |

**Wykaz skrótów używanych w pracy:**

| <b>Skrót</b>      | <b>Rozwinięcie Ang./Łać.</b>   | <b>Rozwinięcie Pl.</b>  |
|-------------------|--|---|
| <b>3D</b>         | three-dimensional space  | przestrzeń trójwymiarowa  |
| <b>ADP</b>        | adenosine diphosphate  | adenozynodifosforan   |
| <b>AFC</b>        | antral follicle count  | liczba pęcherzyków antralnych   |
| <b>AGs</b>        | <i>alpha</i> granules  | granulki typu alfa  |
| <b>Akt (PKB)</b>  | protein kinase B   | kinaza białkowa B   |
| <b>AMH</b>        | anti-Müllerian hormone   | hormon anty-Mullerowski   |
| <b>AMHR2</b>      | anti-Müllerian hormone receptor type 2   | receptor dla hormonu anty-Mulerowskiego typu 2  |
| <b>Ang-2</b>      | angiopoietin-2   | angiopoetyna-2  |
| <b>ANOVA</b>      | analysis of variance   | analiza wariancji   |
| <b>ART</b>        | assisted reproductive technology   | techniki wspomaganego rozrodu   |
| <b>ASRM</b>       | American Society for Reproductive Medicine   | Amerykańskie Stowarzyszenie Medycyny Reprodukcyjnej   |
| <b>AT</b>         | adipose tissue   | tkanka tłuszczowa   |
| <b>ATP</b>        | adenosine triphosphate   | adenozynotrifosforan  |
| <b>bFGF</b>       | fibroblast growth factor <i>beta</i>   | czynnik wzrostu fibroblastów beta   |
| <b>BMP2</b>       | bone morphogenetic protein 2   | białko morfogenetyczne kości 2  |
| <b>BMPs</b>       | bone morphogenetic proteins  | białka morfogenetyczne kości  |
| <b>BSA</b>        | bovine serum albumin   | albumina surowicy bydlęcej  |
| <b>CXCL4/PF 4</b> | chemokine (C-X-C motif) ligand 4/ platelet factor 4  | chemokina CXCL4 / płytkowy czynnik 4  |
| <b>cAMP</b>       | cyclic adenosine monophosphate   | cykliczny monofosforan adenozyiny   |
| <b>CCL5</b>       | chemokine (C-C motif) ligand 5; RANTES (Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) | chemokina, która jest syntetyzowana przez limfocyty T i wykazuje działanie prozapalne poprzez aktywację, chemotaksję, adhezję limfocytów T oraz ich migrację poprzez endothelium. |

|                              |   |   |
|------------------------------|---|---|
| <b>CL</b>                    | <i>corpus luteum</i>                                  | ciałko żółte  |
| <b>CPA's</b>                 | cryoprotective agents                                 | krioprotektanty   |
| <b>CT</b>                    | connective tissue                                     | tkanka łączna   |
| <b>DAB</b>                   | 3,3'-diaminobenzine                                   | 3,3'- diaminobenzydyna                                  |
| <b>DAPI</b>                  | 4',6-diamidino-2-phenylindole                         | 4',6-diamidyno-2-fenyloindol                            |
| <b>DF</b>                    | degenerated follicle                                  | pęcherzyk atrezyjny                                     |
| <b>DGs</b>                   | $\delta$ -granules                                    | granule typu delta                                      |
| <b>DMSO</b>                  | dimethyl sulfoxide                                    | dimetylosulfotlenek                                     |
| <b>DNA</b>                   | deoxyribonucleic acid                                 | kwasy deoksyrybonukleinowy                              |
| <b>DPBS</b>                  | Dulbecco's phosphate buffered saline                  | buforowana fosforanem sól fizjologiczna typu Dulbecco   |
| <b>EG</b>                    | ethylene glycol                                       | etylen glikolowy  |
| <b>EGF</b>                   | epidermal growth factor                               | nabłonkowy (epidermalny) czynnik wzrostu                |
| <b>ER<math>\alpha</math></b> | estrogen receptor <i>alpha</i>                        | receptor estrogenowy alfa                               |
| <b>ER<math>\beta</math></b>  | estrogen receptor <i>beta</i>                         | receptor estrogenowy beta                               |
| <b>ESHRE</b>                 | European Society of Human Reproduction and Embryology | Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii |
| <b>et al.</b>                | <i>et alia</i>  | wraz z innymi   |
| <b>FBS</b>                   | fetal bovine serum                                    | serum płodowe z cieląt                                  |
| <b>FGF</b>                   | fibroblast growth factor                              | czynnik wzrostu fibroblastów                            |
| <b>FSH</b>                   | follicle-stimulating hormone                          | hormon folikulotropowy                                  |
| <b>GAPDH</b>                 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase              | dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego             |
| <b>GFP</b>                   | green fluorescent protein                             | Białko zielonej fluorescencji                           |
| <b>GnRH</b>                  | gonadotropin-releasing hormone                        | gonadoliberyna  |
| <b>HMG</b>                   | human menopausal gonadotropin                         | ludzka gonadotropina menopauzalna                       |
| <b>HPRT</b>                  | hypoxanthine phosphoribosyltransferase                | fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa       |
| <b>IGF1</b>                  | insulin like growth factor type 1                     | insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1                  |



|                           |  |   |
|---------------------------|--|---|
| <b>IL-18</b>              | Interleukin 18   | interleukina 18   |
| <b>IL-6</b>               | Interleukin 6  | interleukina 6  |
| <b>IL-8</b>               | Interleukin 8  | interleukina 8  |
| <b>IVF</b>                | <i>in vitro</i> fertilization  | zapłodnienie pozaustrojowe  |
| <b>LF</b>                 | <i>liquor folliculi</i>  | płyn pęcherzykowy   |
| <b>LH</b>                 | luteinizing hormone  | hormon luteinizujący  |
| <b>m.in.</b>              | -  | między innymi   |
| <b>mRNA</b>               | messenger ribonucleic acid   | informacyjny/matrycowy kwas rybonukleinowy                            |
| <b>N</b>                  | <i>nucleus</i>   | jądro komórkowe   |
| <b>O</b>                  | <i>ovum</i>  | komórka jajowa  |
| <b>OHSS</b>               | ovarian hyperstimulation syndrome  | zespół hiperstymulacji jajników                                       |
| <b>PBS</b>                | phosphate-buffered saline  | buforowana fosforanem sól fizjologiczna                               |
| <b>PCOS</b>               | polycystic ovary syndrome  | zespół policystycznych jajników                                       |
| <b>PCR</b>                | polymerase chain reaction  | reakcja łańcuchowa polimerazy   |
| <b>PDGF</b>               | platelet derived growth factor   | płytkopochodny czynnik wzrostu  |
| <b>PECAM-1/CD31</b>       | platelet endothelial cell adhesion molecule1/cluster of differentiation 31 | płytkowa cząsteczka adhezji komórek śródbłonna-1                      |
| <b>PF</b>                 | primordial follicle  | pęcherzyk pierwotny   |
| <b>PGR</b>                | progesterone receptor  | receptor progesteronowy   |
| <b>pHRTs</b>              | pharmacological hormonal replacement therapies                             | zastępcza terapia hormonalna  |
| <b>PI3K</b>               | phosphoinositide 3-kinase  | kinaza fosfoinozytolu 3'  |
| <b>POF</b>                | premature ovarian failure  | zespół przedwczesnego wygaszania czynności jajników                   |
| <b>PrOH</b>               | 1,2-propanediol  | 1,2-propanodiol   |
| <b>PRP</b>                | platelet rich plasma   | osocze bogatopłytkowe   |
| <b>Real-time PCR/qPCR</b> | real-time polymerase chain reaction/quantitative polymerase chain reaction | reakcja PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym |

|   |   |   |
|---|---|---|
| <b>RNA</b>                                  | ribonucleic acid  | kwas rybonukleinowy   |
| <b>S1P</b>                                  | sphingosine-1-phosphate   | sfingozyno-1-fosforan   |
| <b>SDF1-<math>\alpha</math>/<br/>CXCL12</b> | stromal cell-derived factor<br>1/C-X-C motif chemokine 12   | czynnik produkowany przez komórki<br>zrębu 1 $\alpha$ /chemokina CXCL12   |
| <b>TdT</b>                                  | terminal deoxynucleotidyl<br>transferase  | transferaza nukleotydów terminalnych                                      |
| <b>TE</b>                                   | <i>theca externa</i>  | osłonka pęcherzyka  |
| <b>TGF-<math>\beta</math>1</b>              | transforming growth factor<br><i>beta</i> 1   | transformujący czynnik wzrostu beta 1                                     |
| <b>TIMP 4</b>                               | Tissue inhibitor of<br>metalloproteinase 4  | tkankowy inhibitor metaloproteazy 4                                       |
| <b>tj.</b>                                  | -   | to jest   |
| <b>TNF</b>                                  | tumor necrosis factor   | czynnik martwicy nowotworów   |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b>               | tumor necrosis factor <i>alpha</i>  | czynnik martwicy nowotworów alpha   |
| <b>TSP-1</b>                                | thrombospondin 1  | trombospondyna -1   |
| <b>TUNEL</b>                                | terminal deoksynukleotydyl<br>transferase mediated d-UTP<br>(2'-deoxyuridine 5'-<br>triphosphate) nick end-labeling | znakowanie białka d-UTP z użyciem<br>transferazy nukleotydów terminalnych |
| <b>VEGF</b>                                 | vascular endothelial growth<br>factor   | czynnik wzrostu śródbłonna<br>naczyniowego                                |
| <b>VS</b>                                   | <i>vasa sanguinea</i>   | naczynia krwionośne   |
| <b>ZG</b>                                   | <i>zona granulosa</i>   | komórki warstwy ziarnistej  |
| <b>ZP</b>                                   | <i>zona pellucida</i>   | osłonka przejrzysta   |

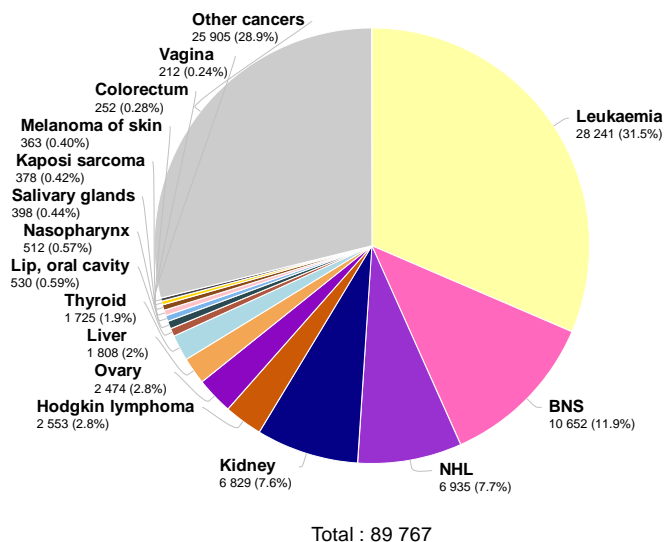
## ***1. Wstęp do dysertacji i przegląd literatury naukowej***

### ***1.1 „Cesarz wszech chorób”, czyli częstość występowania nowotworów u kobiet***

W 2020 roku liczba zdiagnozowanych przypadków wystąpienia chorób nowotworowych dotyczy prawie 20 milionów ludzi na całym świecie. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (ang.: *The International Agency for Research on Cancer*) określiła przewidywaną liczbę osób do 39 roku życia dotkniętych nowotworem na około 3 956 815. Prawdopodobieństwo zachorowania na nowotwór przed 44 rokiem życia jest statystycznie istotnie wyższe u kobiet (65%) niż u mężczyzn (35%). Prawie 90 tysięcy pacjentów onkologicznych to dziewczynki w wieku do 14 lat, a ponad milion to młode kobiety w wieku od 15 do 39 lat (Rycina 1: Ferlay J *et al.* n.d. strona internetowa International Agency for Research on Cancer World Health Organization: "cancer today", dane uzyskane 28.09.2022, adres strony: <https://gco.iarc.fr/>). Rosnący postęp medycyny oraz coraz sprawniejsza diagnostyka zwiększają szanse pacjentów na remisję choroby oraz na dłuższe przeżycie. Dzięki temu niewątpliwemu osiągnięciu medycyny coraz częściej zwraca się uwagę na jakość życia pacjentów onkologicznych po chorobie. W tym kontekście, szczególnie istotną dla kobiet, wydaje się dbałość o zachowanie właściwego profilu hormonalnego, a także i możliwość urodzenia dziecka. Troska o pacjentów w aspekcie utrzymania płodności i możliwości planowania rodziny po zakończeniu walki z chorobą doprowadziła do powstania nowej gałęzi nauki łączącej lekarzy i różnych specjalistów z dziedziny onkologii i wspomaganego rozrodu: *oncofertility*. Nazwa „*oncofertility*” to połączenie słów „onkologia” (ang.: *oncology*) i „płodność” (ang.: *fertility*). Przedstawiona w poniższej dysertacji praca należy do tematyki *oncofertility*, a jej osią tematyczną jest zwierzęcy model przeszczepu kriokonserwowanej tkanki jajnika.

Ryc. 1. A)

Estimated number of new cases in 2020, World, females, ages 0-14

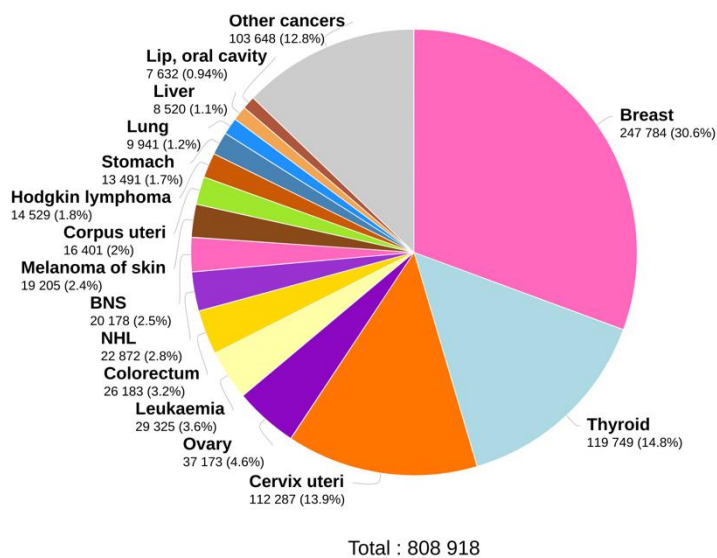


Data source: Globocan 2020  
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer  
World Health Organization

B)

Estimated number of new cases in 2020, World, females, ages 15-39

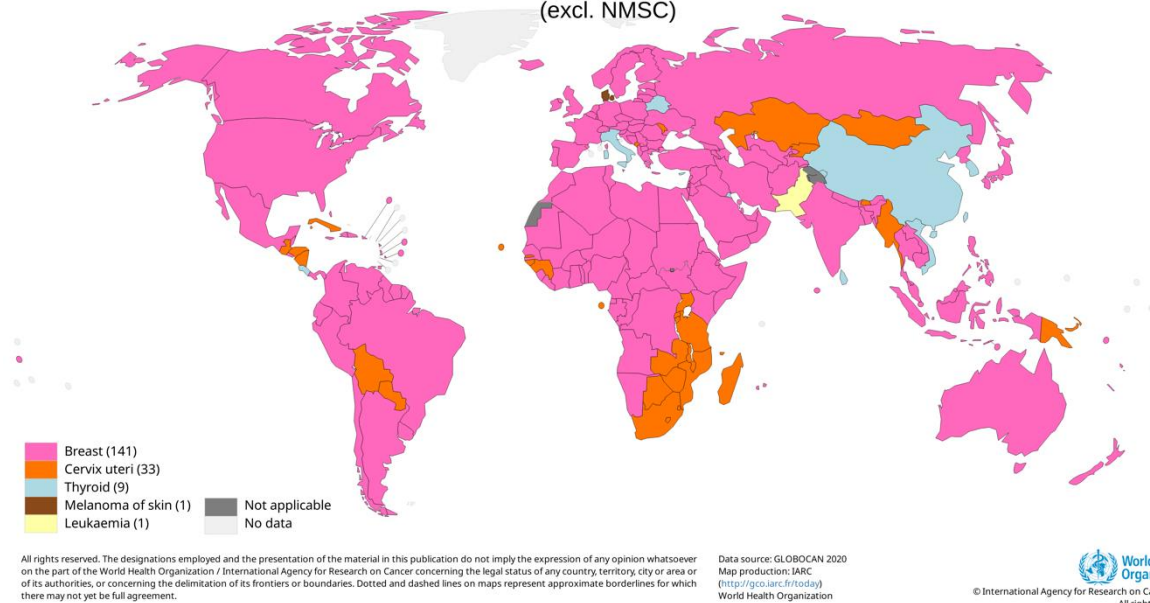


Data source: Globocan 2020  
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer  
World Health Organization

C)

Top cancer per country, estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, females, ages 0-39 (excl. NMSC)



Rycina 1. Graficzne przedstawienie liczby zdiagnozowanych przypadków wystąpienia chorób nowotworowych z podziałem na nowotwory różnych typów wśród kobiet w wieku A) do 14 roku życia, B) młodych kobiet 15-39 lat C) przedstawia częstość występowania nowotworów danego typu (legenda) w danych obszarach geograficznych. Dane przedstawione są dla kobiet do 39 roku życia (Ferlay J et al. n.d., strona internetowa International Agency for Research on Cancer World Health Organization: "cancer today", dane uzyskane 28.09.2022; adres strony: <https://gco.iarc.fr/>).

## 1.2 Gonadotoksyczność terapii przeciwnowotworowych

Terapie przeciwnowotworowe, takie jak radioterapia i chemioterapia powodują znaczne zniszczenie tkanki germinalnej, a więc częściową lub całkowitą utratę płodności. Ryzyko zmniejszenia lub całkowitej utraty płodności w wyniku terapii przeciwnowotworowej u dzieci szacowane jest na 12% do 66% pacjentów (Hudson *et al.*, 2013). W przypadku zastosowania terapii przeciwnowotworowej u dojrzewających lub dojrzałych płciowo kobiet stwierdzono, że nawet niskie dawki promieniowania w trakcie radioterapii prowadzą do obniżenia płodności i przyspieszenia pojawienia się menopauzy. Zauważono także odwrotnie proporcjonalną zależność wrażliwości tkanki jajnika na gonadotoksyczność radioterapii, wynikiem czego u 30 letniej kobiety dawka wyniszczająca rezerwę jajnikową to 14,3 Gy, co stanowi 30–57% dawki standardowo stosowanej w leczeniu, określonej na 25-50 Gy w zależności od użytego protokołu oraz rodzaju nowotworu (Rubino *et al.* 2003; Wallace *et al.* 2005; Gracia *et al.* 2012).

Podobnie gonadotoksycznym efektem charakteryzują się substancje cytotoksyczne, w tym te najczęściej stosowane w chemioterapii przeciw nowotworom piersi, a więc najczęściej występującym nowotworom u kobiet w wieku rozrodczym (Rycina 1 B).

Do środków chemioterapeutycznych, o których wiadomo, że działają szkodliwie na tkankę germinalną, należą środki alkilujące wysokiego ryzyka, takie jak cyklofosfamid, mechloretamina, chlorambucil, busulfan, i melfalan, których aktywne metabolity prowadzą do zatrzymania funkcji i syntezy chromatyny w komórkach poprzez rozerwanie dwuniciowego DNA, prowadząc do apoptozy indukowanej przez białko p63 (Petrillo *et al.*, 2011; Soleimani *et al.*, 2011a). Z kolei cisplatyna i karboplatyna powodują zahamowanie funkcji syntezy i transkrypcji białek poprzez doprowadzenie do przerwania nici podczas replikacji DNA w jądrze komórek. Substancje te zaliczane są do grupy średniego ryzyka, chociaż badania na zwierzętach wskazują na bezpośredni wpływ wyżej wymienionych substancji na pęcherzyki pierwotne jajników (Yucebilgin *et al.* 2004; Anderson *et al.* 2006) i oocyty (Gonfloni *et al.*, 2009). Cytostatyki takie jak metotreksat, 5-fluorouracyl i cytarabina są zaliczane do grupy niskiego ryzyka. Podobnie w przypadku alkaloidów barwinka pospolitego (*Vinca minor*) m.in. winkrystyny i winblastyny. Substancje te, powodujące zatrzymanie mitotycznych podziałów komórkowych poprzez polimeryzację tubuliny, nie wykazały istotnego wpływu na gonady ludzi. Badania przeprowadzone na myszach wskazują na ich szkodliwe działanie na pęcherzyki wzrastające, ale nieistotny wpływ na pęcherzyki pierwotne (Winship *et al.* 2019). Antybiotyki antracyklinowe, takie jak daunorubicyna i bleomycyna, hamują syntezę DNA, a także powodują powstawanie wolnych rodników tlenowych, są jednak zaliczane do grupy niskiego ryzyka utraty płodności, chociaż badania jasno wskazują wpływ stosowanej terapii na obniżenie wskaźników rezerwy jajnikowej (Policiano *et al.*, 2020). Ponadto, doksorubicyna, także zaliczana do antracyklin, jest jednym ze środków wysoko gonadotoksycznych, ze względu na udowodniony wpływ zarówno na korę jajnika jak i na zrąb, w tym pęcherzyki wszystkich typów, wliczając w to pęcherzyki pierwotne (Yucebilgin *et al.* 2004; Morgan *et al.* 2012; Lopes *et al.* 2020)

Badania Garcia i *et al.* wykazały znaczne obniżenie markerów płodności i rezerwy jajnikowej u pacjentek w wieku rozrodczym, u których zastosowano chemioterapię w wysokich dawkach, aż do poziomu naturalnego dla kobiety w wieku menopauzalnym (Gracia *et al.* 2012). Badania przesiewowe dotyczące pacjentek stosujących tamoksyfen, lek stosowany jako antyestrogen w terapiach przeciwko nowotworom piersi, również

wskazują na obniżenie płodności, a także na doświadczanie objawów związanych z przedwczesną menopauzą, będącą wynikiem gonadotoksycznego działania chemioterapii (Gupta *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2022).

Utrata funkcjonalności gonad w wyniku radio- i/lub chemioterapii jest szczególnie istotna w przypadku jakości życia dzieci, które zostały skierowane na terapię przeciwnowotworową przed okresem dojrzewania, a także dorastających i młodych kobiet, u których tkanka jajnika jest szczególnie aktywna hormonalnie.

W przypadku uszkodzenia gonad u dzieci przed okresem dojrzewania obserwuje się m. in.: nieprawidłowości procesu dojrzewania płciowego poprzez obniżone stężenia hormonów płciowych i obniżone libido i płodność w wieku dojrzałym (Hudson *et al.*, 2013).

W przypadku kobiet konsekwencje utraty hormonalnej funkcjonalności przybierają formę zespołu przedwczesnej menopauzy (ang. *premature menopause syndrome*), a więc mają negatywny wpływ nie tylko na układ moczowo-płciowy, ale także krwionośny, szkieletowy, a nawet na funkcje poznawcze i prawidłowość działania systemu nerwowego (Gupta *et al.* 2006; Wallace and Kelsey 2010; Sung *et al.* 2022). Problem wystąpienia objawów przedwczesnej menopauzy jest coraz częściej poruszany w kontekście zapewnienia godnej jakości życia młodych pacjentek po remisji choroby nowotworowej (Hardy and Kuh 2002; Bryson *et al.* 2022). Przedwczesna menopauza, prowokowana obniżeniem poziomu jajnikowych hormonów steroidowych, może powodować osteoporozę, choroby serca, podniesienie ciśnienia krwi, a także napady gorąca i znaczne obniżenie libido (Hardy and Kuh, 2002). Zastępcza terapia hormonalna (ang. *pharmacological hormonal replacement therapies*; pHRTs), stosowana w leczeniu objawów menopauzy, chociaż określana jako wysoce efektywna, przy długotrwałym stosowaniu może powodować efekty uboczne w postaci zakrzepów żylnych, chorób serca, udaru, a nawet wystąpienia nowotworów (Marjoribanks *et al.*, 2018). Ponadto u niektórych pacjentek, szczególnie tych w młodym wieku trudne jest dobranie odpowiedniej dawki leku (Sullivan, Sarrel and Nelson, 2016). Dlatego właśnie procedury zachowania płodności, obejmujące możliwość przywrócenia - chociaż częściowo - hormonalnej czynności gonad, są tak istotnym tematem w kontekście *oncofertility*.

### 1.3 *Procedury zachowania płodności*

Wspomniane powyżej konsekwencje utraty czynności hormonalnej jajników wiążą się nieodwracalnie z obniżeniem lub całkowitą utratą płodności kobiet w wyniku chemio- i/lub radioterapii. Coraz częściej, podczas konsultacji onkologicznych, pacjenci wyrażają zainteresowanie strategiami zachowania możliwie jak najlepszej jakości życia po całkowitej remisji choroby i zakończeniu terapii. Niektóre badania wskazują, że ok. 70% kobiet w wieku rozrodczym, które zostały skierowane na terapię przeciwnowotworową, wykazywało świadomość gonadotoksyczności terapii i zainteresowanie procedurami zachowania płodności, a ponad połowa z nich wykazywała chęć posiadania w przyszłości potomstwa (Letourneau *et al.*, 2011). Niestety, informacje przekazywane pacjentom i pacjentkom podczas konsultacji onkologicznej nie zawsze poruszają ten ważny temat, a także charakteryzują się dysproporcją pomiędzy informacjami przekazywanymi kobietom i mężczyznom. Ankieta przeprowadzona przez Armaund *et al.* W 2012 roku wśród pacjentów i pacjentek, którzy przeszli terapię przeciwnowotworową, wykazała, że tylko 48% pacjentek i 80% pacjentów otrzymało od lekarza informację o gonadotoksycznym wpływie terapii onkologicznej. Ponadto, jedynie 14% pacjentek i 68% pacjentów otrzymało informację o możliwych procedurach zachowania płodności (Armuand *et al.*, 2012). Dane te nie tylko wskazują na niedoinformowanie pacjentów i pacjentek onkologicznych o możliwych konsekwencjach terapii przeciwnowotworowych, ale także zaznaczają istotność podkreślenia tego tematu w kontekście kobiet.

Proponowane pacjentkom strategie zachowania płodności są zależne od wielu czynników. Wśród znanych i szeroko stosowanych procedur zachowania płodności można wymienić zachowawczą gonadopeksję (transpozycję jajników) oraz mrożenie komórek rozrodczych i zarodków. Inne procedury, takie jak zastosowanie analogów gonadoliberyny (ang.: *gonadotropin releasing hormone*; GnRH) oraz kriokonserwacja tkanki jajnika, to metody nowatorskie, które wciąż pozostają w fazie eksperymentalnej lub potrzebują udoskonalenia.

### 1.4 *Transpozycja gonad*

Gonadopeksja, czyli przeszczepienie gonad z dala od rejonu miednicznego w miejsce znajdujące się poza działaniem promieniowania jonizującego, stosowane jest jedynie w przypadku ograniczonej miejscowo radioterapii. Rozwiązanie to jest związane



z czynnościami ochraniającymi gonady (ang.: *gonad shielding*) przed działaniem promieniowania, a jego efektywność ograniczona (Jeukens *et al.* 2020; Bayefsky *et al.* 2022). Należy podkreślić, że strategia ta jest właściwa jedynie dla pacjentów, u których miejscowa radioterapia jest jedyną stosowaną metodą leczenia, a jej wykorzystanie wiąże się z koniecznością zastosowania zaawansowanych procedur wspomaganego rozrodu w tym z pobraniem oocytów i zapłodnieniem *in vitro*.

### 1.5 *Mrożenie oocytów i zarodków*

Ze względu na gonadotoksyczność chemioterapeutyków, pobranie oocytów do zastosowania w procedurze zachowania płodności powinno się odbyć przed rozpoczęciem terapii przeciwnowotworowej. Działanie tych substancji w komórkach germinalnych obejmuje zarówno wywołanie stresu oksydacyjnego, jak i prowadzi do mutacji DNA w jądrach komórkowych i, w rezultacie, apoptozy (Becker and Schöneich, 1982; Soleimani *et al.*, 2011b). W badaniu Meirow *et al.* wykazano długofalowe działanie cyklofosfamidu, jednego z najczęściej stosowanego chemioterapeutyku, na wzrost odsetka poronień i uszkodzeń płodów u myszy nawet trzy miesiące po narażeniu na substancję (Meirow *et al.*, 2001). Co ciekawe, badania opisujące występowanie i utrzymanie ciąży u pacjentek po zakończeniu terapii i remisji choroby, chociaż wskazują na znaczne obniżenie płodności, nie wykazały statystycznie istotnego wzrostu nieprawidłowości genetycznych i poważnych uszkodzeń płodów (Hawkins 1994; Signorello *et al.* 2006; Anderson *et al.* 2018). Badania te jednak dotyczą głównie pacjentek przechodzących chorobę nowotworową w wieku dziecięcym, co utrudnia zastosowanie tych doniesień w szacowaniu zachowania płodności dojrzałych płciowo kobiet. Literatura naukowa nie określa także okresu całkowitego ustania działania chemioterapii, nie jest więc możliwe wyznaczenie bezpiecznego odstępu czasowego pomiędzy zakończeniem terapii, a pobraniem nieuszkodzonych komórek rozrodczych.

Chociaż mrożenie i witrifikacja komórek rozrodczych i zarodków jest zdecydowanie najczęściej stosowaną metodą zachowania płodności u dojrzałych płciowo dziewczynek i młodych kobiet, to mrożenie i witrifikacja gamet jest metodą coraz częściej stosowaną nie tylko u pacjentek leczonych onkologicznie, ale także u pacjentek obarczonych innymi chorobami przyspieszającymi utratę płodności, takimi jak zespół przedwczesnego wygasania czynności jajników (Prashant *et al.*, 2018), czy endometrioza (Henry *et al.*,

2022). W wielu krajach krioprezewacja komórek jajowych jest także strategią przedłużenia okresu rozrodczego kobiet stosowaną ze względów kulturowych lub socjoekonomicznych (Varlas *et al.*, 2021; Khattak *et al.*, 2022). Efektywność tej metody zachowania płodności u pacjentek onkologicznych zależy przede wszystkim od liczby uzyskanych oocytów, ich jakości wstępnej a także płodności partnera i utrzymuje się na poziomie ok. 25-38% (efektywność mierzona w odsetku ciąż uzyskanych w wyniku procedury zapłodnienia *in vitro* i transferu zarodka). Podobne wyniki dotyczą pacjentek mrożących oocyty z innych względów (Walker, Lanes and Ginsburg, 2022). Skuteczność procedury jest przewidziana dla optymalnej liczby oocytów, która została określona wg. Europejskiego Stowarzyszenia Rozrodu i Embriologii (ang.: *European Society of Human Reproduction and Embryology*, ESHRE) na 15 oocytów pobranych w jednym cyklu stymulacji (Sunkara *et al.* 2011; Milachich and Shterev 2016a).

Krioprezewacja zarodków jest metodą stosowaną jedynie u pacjentek posiadających stałego partnera, wyrażającego zgodę na zastosowanie tej procedury. Chociaż pozornie transfery mrożonych zarodków wykazują się większą skutecznością niż transfery zarodków uzyskanych z mrożonych oocytów (35-49% vs 25-38%), wg najnowszych danych zebranych w Wielkiej Brytanii nie są to różnice istotne statystycznie (Ní Dhonnabháin *et al.*, 2022). Nie należy również zapominać o dylematach natury etycznej dotyczących kriokonserwacji ludzkich zarodków (Wallach and Robertson, 1987), a także o ograniczeniach prawnych w niektórych krajach odnośnie ich liczby (Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej; 2015).

Obie wyżej opisane metody zachowania płodności wymagają stymulacji hormonalnej, aby przygotować pacjentkę do cyklu superowulacji niezbędnej do pobrania wystarczającej liczby komórek rozrodczych do przeprowadzenia procedury zapłodnienia *in vitro*. Konwencjonalne przygotowanie pacjentki do procedury zapłodnienia *in vitro* wymaga 2-6 tygodni, w zależności od protokołu stymulacji i fazy cyklu miesięcznego pacjentki. Czas ten znacząco opóźnia możliwość rozpoczęcia terapii przeciwnowotworowej, co w przypadku niektórych pacjentek jest zagadnieniem kluczowym dla jej skuteczności. W związku z presją czasu, u pacjentek wymagających jak najszybszego rozpoczęcia terapii przeciwnowotworowej coraz częściej stosuje się stymulację cyklu jajnikowego o losowym starcie (ang. *immediate / random start controlled ovarian stimulation*), którą można rozpocząć bez względu na fazę cyklu (Cavagna *et al.* 2017; Marklund *et al.* 2020). Bez względu na zastosowany protokół, celem procedury stymulacji jest zabezpieczenie wystarczającej liczby dojrzałych oocytów. ESHRE na podstawie ogólnoswiatowych

doniesień (Sunkara *et al.* 2011; Ji *et al.* 2013; Cobo *et al.* 2015; Milachich and Shterev 2016b) określiło statystycznie optymalną liczbę oocytów potrzebnych do uzyskania zdrowej ciąży na 15 dojrzałych oocytów.

U pacjentek onkologicznych opóźnienie terapii przeciwnowotworowej umożliwia pojedynczy cykl stymulacji, który nie zawsze kończy się uzyskaniem optymalnej liczby oocytów. Ponadto, kontrolowana stymulacja niesie ze sobą ryzyko zespołu hiperstymulacji jajników (ang. *ovarian hyperstimulation syndrome*, OHSS), obejmującego symptomy takie jak wodobrzusze, hiponatremia i zagęszczenie krwi, a w skrajnych przypadkach nawet do zakrzepicy zatorowej naczyń krwionośnych (ang. *thromboembolic phenomena*) (McElhinney and McClure, 2000). Zespół hiperstymulacji jajników, w efekcie powikłań, może zatem doprowadzić do poważnych komplikacji w planowaniu i do opóźnienia terapii ratującej życie pacjentki (Christ, Herndon and Yu, 2021).

Kolejnym wątpliwym aspektem wywoływania kontrolowanej stymulacji jajników u pacjentek dotkniętych chorobą nowotworową jest fakt, że stymulacja hormonalna obejmuje także działanie hormonów steroidowych, w tym estrogenów, które mogą mieć wpływ na przyspieszenie rozwoju nowotworów. Choć problem ten pojawia się jako możliwy efekt uboczny zastosowanej procedury zachowania płodności, nie został on jednak bezpośrednio udowodniony w literaturze przedmiotu (Muñoz 2015; Akel *et al.* 2020).

## 1.6 *Zastosowanie analogów gonadoliberyny*

Stosowanie analogów GnRH jako terapii ochronnej podczas chemioterapii jest metodą wykazującą się szczególną efektywnością w terapii niedojrzałych płciowo dziewczynek, lecz nie wykazuje podobnej skuteczności zastosowana u chłopców (Blumenfeld, Katz, and Evron 2014; Blumenfeld 2019). Doniesienia naukowe dotyczące oceny efektywności działania terapii analogami GnRH u dojrzałych płciowo kobiet pozostają przedmiotem kontrowersji. Wyjaśniany przez naukowców mechanizm działania to m. in. utrzymanie jajników w stanie niedojrzałości płciowej. Hipoteza ta jest zasadna, jako że pęcherzyki pierwotne, pozostające w stanie nieaktywnym, wykazują się największą odpornością na działanie chemioterapeutyków, na co także wskazuje duży odsetek zachowania funkcjonalności jajników u dziewczynek po chemioterapii (del Mastro and Lambertini, 2017). Inne proponowane mechanizmy to: bezpośrednie zmniejszenie toksyczności chemioterapeutyków (np. doksorubicyny) na jajnik poprzez inaktywację obecnych

w gonadach receptorów (Imai *et al.*, 2007); zmniejszenie perfuzji chemioterapeutyków w tkance poprzez zmniejszone miano estrogenów (Kitajima *et al.*, 2006); czy zwiększenie ekspresji sfingozyno-1-fosforanu (S1P), bioaktywnego lipidu mającego działanie protekcyjne na tkankę jajnika i zawarte w niej oocyty (Paris *et al.* 2002; Blumenfeld 2019). Jeszcze innym elementem, mogącym mieć znaczenie w zachowaniu rezerwy jajnikowej, pośrednio związanym z protekcyjnym działaniem analogów GnRH na jajnik poddany chemioterapii jest zachowanie rezerwy gametycznych komórek macierzystych, które, według kontrowersyjnej pracy Johnson *et al.* opublikowanej w czasopiśmie *Nature*, w 2004 roku, mogą mieć znaczenie w oogenezie zachodzącej także w dojrzałych gonadach (Johnson *et al.* 2004; Blumenfeld 2019).

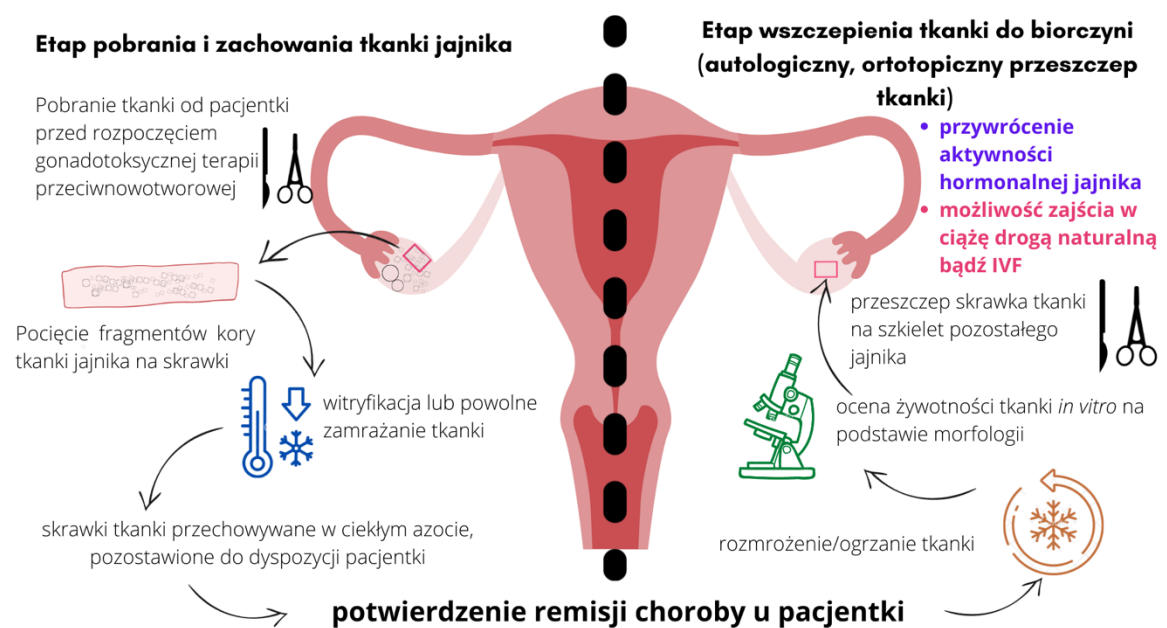
Efektywność zastosowania analogów GnRH w procedurze zachowania płodności nie została jednak jednoznacznie określona, a w literaturze naukowej znaleźć można zarówno obiecujące jak i niekorzystne wyniki stosowania omawianej procedury (del Mastro *et al.* 2014; Chen *et al.* 2019; Lambertini *et al.* 2019). W związku z powyższym, metoda ta traktowana jest jako metoda pozostająca w fazie eksperymentalnej. Co ciekawe, agoniści gonadoliberyny mają także zastosowanie w terapii adiuwantowej podczas hiperstymulacji jajników w procedurze pobrania oocytów, mającej zapobiec zespołowi OHSS. Niestety, skuteczność tej terapii także wzbudza kontrowersje w środowisku naukowym (Iliodromiti *et al.* 2013; Christ *et al.* 2021;).

### 1.7 *Kriokonserwacja i autologiczny przeszczep tkanki jajnika*

Zachowanie funkcjonalności jajnika poprzez kriokonserwację, a następnie autologiczny przeszczep tkanki jajnika stanowi oś tematyczną niniejszej dysertacji. Choć metoda ta uważana była jeszcze do niedawna za eksperymentalną, w grudniu 2019 Amerykańskie Stowarzyszenie Medycyny Reprodukcyjnej (ang.: *American Society for Reproductive Medicine*; ASRM) wydało oświadczenie, w którym jednoznacznie określiło kriokonserwację tkanki jajnika jako dostępną procedurę zachowania płodności u pacjentek niedojrzałych płciowo oraz u pacjentek, u których terapia przeciwnowotworowa powinna rozpocząć się jak najszybciej (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2019).

Pobranie i zachowanie tkanki jajnika (Rycina 2) polega na laparoskopowym wycięciu fragmentu kory jajnika, a następnie pocięciu jej na małe fragmenty i kriokonserwację, poprzez technikę powolnego zamrożenia lub witrifikacji (Chibelean *et al.*, 2020).

Fragmety tkanki zanurzone w ciekłym azocie pozostają zachowane do momentu remisji nowotworu u pacjentki i decyzji lekarza o gotowości na przyjęcie przeszczepu. Autologiczny przeszczep tkanki jest wszczepiany ortotopicznie, na szkielet pozostałego jajnika lub możliwie najbliższej autologicznego rejonu tkanki, bądź heterotopicznie, jeśli rejon miedniczy uległ znacznemu uszkodzeniu (Sonmezer and Oktay, 2010a). Jeśli fragment tkanki wszczepiony został na pozostałą w organizmie tkankę jajnika, możliwe jest naturalne zajście w ciążę, jeśli jednak przeszczep był heterotopiczny niezbędne jest dodatkowo zastosowanie technik wspomaganego rozrodu (Sheshpari *et al.*, 2019a).



Rycina 2. Schemat ortotopicznego przeszczepu kriokonserwowanej tkanki jajnika. Szkic własny.

Metoda kriokonserwacji tkanki jajnika po raz pierwszy została zastosowana w roku 1996, a w 2004 udokumentowano pierwsze żywe urodzenie u pacjentki po przeszczepie tkanki (Pilcher and Pearson, 2004). W roku 2017 udokumentowano 130 żywych urodzeń w wyniku zastosowania tej procedury zachowania płodności (Donnez and Dolmans, 2017). Do dziś, według szacunków Madeleine Dolmans, światowej ekspertki w dziedzinie zachowania płodności, dzięki metodzie kriokonserwacji jajników urodziło się ponad 200 dzieci (Ataman *et al.*, 2022).

Raporty opracowywane przez zespoły współpracujących ze sobą klinik z Europy (dane pochodzące z Danii, Hiszpanii, Francji, Belgii, Szwajcarii, Niemiec i Austrii) określiły

średnią skuteczność zastosowania w.w metody na 23-26% (skuteczność mierzona w liczbie żywych urodzeń) (Donnez *et al.*, 2015; Dolmans *et al.*, 2021). Podobne wyniki przedstawili naukowcy z Niemiec i Belgii, określając odsetek żywych urodzeń jako 25% (van der Ven *et al.*, 2016).

Wyniki te można także podzielić ze względu na miejsce dokonania wszczepu i sposób zajścia w ciążę. W analizie z 2021r, Dolmans *et al.* wykazują 40% sukces w zajściu w naturalną ciążę u kobiet, które uzyskały przeszczep ortotopiczny i 36% skuteczność cykli IVF u kobiet, u których istniały przesłanki do zastosowania tej metody wspomaganego rozrodu. W tym samym badaniu skuteczność, mierzona w odsetku żywych urodzeń, wyniosła 30% dla ciąż naturalnych i 21% dla ciąż IVF, jednakże dane te nie wykazały istotnej statystycznie różnicy. Nie stwierdzono żadnej ciąży w cyklach IVF u kobiet, u których wykonano przeszczep heterotopiczny (w tym badaniu przeszczepy heterotopiczne wykonywane były na przedramię bądź na podbrzusze) (Dolmans *et al.*, 2021). Systematyczny przegląd literatury wykonany przez zespół Sheshpari w 2019 r., wykazał średnią skuteczność transplantacji kriokonserwowanej tkanki jajnika na poziomie 52% ciąż uzyskanych w wyniku naturalnej koncepcji bądź cykli IVF oraz 70% szansę powrotu funkcji hormonalnych i powrotu cyklu miesięcznego u pacjentek (Sheshpari *et al.*, 2019a)

Powrót cyklu miesięcznego i aktywności hormonalnej fragmentu przeszczepionej tkanki powinny wystąpić po 60-240 dniach od zabiegu transplantacji. Średnia długość aktywności metabolicznej pojedynczo wszczepionego fragmentu tkanki trwa od paru miesięcy do 7 lat. Wykazano różnicę w okresie aktywności tkanek u tych samych pacjentek, gdzie kolejny fragment wszczepiony u tej samej pacjentki był aktywny dłużej od poprzedniego (S. Samuel Kim, 2012). Skuteczność tej metody podlega dużemu zróżnicowaniu, prawdopodobnie ze względu na duże różnice w jakości wyjściowej kriokonserwowanych tkanek. Ponadto, poszczególni specjaliści, wykonując technikę pobrania, kriokonserwacji i ponownego wszczepienia tkanki posługują się różnymi protokołami (Chibelean *et al.*, 2020). Zauważono także istotny wpływ wieku pacjentki, typu nowotworu, a także rodzaju zastosowanej terapii onkologicznej na poziom sukcesu przetrwania tkanki po przeszczepie (Abir *et al.* 2008; Chibelean *et al.* 2020; Dolmans, Falcone, and Patrizio 2020; Dolmans *et al.* 2021).

Jednym z najważniejszych ograniczeń metody kriokonserwacji tkanki jajnika jest uzasadniona obawa co do możliwości reintrodukcji komórek nowotworowych wraz z przeszczepem tkanki (Dolmans *et al.*, 2016; Dolmans and Masciangelo, 2018; Masciangelo *et al.*, 2018). Chociaż wiele rodzajów nowotworów nie daje przerzutów na gonady, inne, takie jak nowotwory krwi, a w szczególności białaczki, mają charakter ogólnoustrojowy, co stwarza potencjalne ryzyko dla pacjentek (Dolmans *et al.*, 2010). Jednym z badań potwierdzających te obawy było badanie na modelu mysim autorstwa Shaw *et al.*, w którym wykazano, że przeszczepione fragmenty tkanki jajnika, pobrane od osobników chorych na białaczkę, spowodowały przeniesienie nowotworu na zdrowe osobniki i doprowadziło do ich śmierci zarówno w przypadku przeszczepu tkanki świeżej jak i mrożonej (Shaw *et al.*, 1996). Badania wykonane na tkankach ludzkich potwierdzają uzasadnienie tych obaw: w pracy Dolmans *et al.* z 2010 wykonano badania histologiczne oraz badania metodą PCR tkanek jajników pacjentek z przewlekłą białaczką szpikową lub ostrą białaczką limfoblastyczną. Analiza wyników wykazała, że pomimo braku obecności komórek nowotworowych w wybranych do analizy skrawkach histologicznych, badania metodą RT-PCR wykazały obecność nowotworu w 33% tkanek pacjentek chorych w momencie pobrania próbek na przewlekłą białaczkę szpikową (obecność mutacji BCR-ABL) oraz w 70% tkanek pacjentek chorych w momencie pobrania na ostrą białaczkę limfoblastyczną (wykazano translokacje lub reanrażacje genów) (Dolmans *et al.*, 2010). Większość badań, a także przykłady kliniczne, nie wykazują nawrotu choroby nowotworowej po przeszczepie tkanki jajnika (Ataman *et al.*, 2022; Eijkenboom *et al.*, 2022; Khattak *et al.*, 2022). Niemniej jednak, w przypadku pacjentek obarczonych chorobą nowotworową krwi, należy zachowywać szczególną ostrożność i przeprowadzać dodatkowe badania jakości tkanki i obecności markerów nowotworowych.

### 1.8 *Czynniki różnicujące efektywność przeszczepu tkanki jajnika: kriokonserwacja tkanki*

Jednym z pierwszych czynników mogących mieć wpływ na sukces w zachowaniu płodności pacjentek poprzez zachowanie tkanki jajnika jest sposób kriokonserwacji tkanki. Najczęściej stosowaną procedurą kriokonserwacji tkanki jajnika jest metoda powolnego zamrażania/ szybkiego ogrzania. Metoda powolnego zamrażania wymaga użycia specjalnego sprzętu pozwalającego na obniżanie temperatury w ściśle określonym tempie maksymalnie 2-3°C na minutę. Podczas powolnego obniżania temperatury woda

pozostająca na zewnątrz komórek krzepnie w pierwszej kolejności. Prowadzi to do utworzenia hipertonicznego środowiska, dehydratacji cytoplazmy i obkurczania się komórek, co może spowodować ich śmierć. Jednocześnie w wyniku obniżania temperatury woda pozostająca w komórkach przekształca się w kryształki lodu, które mogą doprowadzić do mechanicznych uszkodzeń komórek. Aby zapobiec zbyt raptownej dehydratacji oraz tworzeniu się kryształów lodu stosuje się krioprotektanty (ang. *cryoprotective agents*; CPA's).

Krioprotektanty można podzielić na dwie kategorie: przenikające i nieprzenikające błony cytoplazmatycznej komórek. Substancje z grupy przenikających błonę, takie jak: glicerol, dimetylosulfotlenek (DMSO), glikol etylenowy i 1,2-propanodiol (PrOH) mają niską masę cząsteczkową i mogą przechodzić przez podwójną warstwę lipidową błony komórkowej, chociaż robią to wolniej niż woda. Substancje z grupy nieprzenikających błonę, przykładowo: cukry (sacharoza, trehaloza i rafinoza), makrocząsteczki (ficoll i poliwinylpirolidon) oraz białka i lipoproteiny, pozostają w roztworze pozakomórkowym, ze względu na swoją dużą masę cząsteczkową. Czynniki nieprzenikające przez błonę komórkową pomagają kontrolować hipertoniczność środowiska, a więc proces odwadniania komórek. Krioprotektanty nie pozostają jednak bez wpływu na zamrażane komórki ze względu na toksyczność chemiczną (Fahy *et al.*, 1984). Optymalna ekspozycja zamrażanych komórek lub tkanek na krioprotektanty powinna mieć na celu zminimalizowanie stresu osmotycznego przy jednoczesnym unikaniu toksyczności chemicznej, a także umożliwienie wystarczającej dehydratacji cytoplazmy komórek, aby uniknąć urazów mechanicznych na tle tworzenia kryształów lodu (Fuller and Paynter, 2004).

Drugą stosowaną metodą kriokonserwacji komórek gametycznych i tkanki jajnika jest witrifikacja. Witrifikacja jest metodą ultraszybkiego obniżenia temperatury, podczas której, zamiast do krystalizacji wody, dochodzi do utworzenia stanu szklistego (Fahy *et al.*, 1984). Aby uzyskać ten efekt, w czasie witrifikacji wykorzystywane są wyższe stężenia krioprotektantów. Witrifikacja jest metodą szeroko stosowaną w kriobiologii

nie tylko ze względu na prostotę wykonania, ale także na udowodnioną efektywność (Allahbadia, Kuwayama and Gandhi, 2015).

Ponieważ jajnik jest narządem złożonym z niejednorodnych składników komórkowych, szybkość dyfuzji krioprotektantów i możliwość tworzenia kryształów lodu różnią się w zależności od występujących w nim komórek i tkanek (Fuller and Paynter, 2004).



Z tego powodu kriokonserwacja tkanki jajnika wymaga zrównoważenia jej wpływu zarówno na oocyty, jak i na komórki pęcherzykowe oraz zrąb tkanki, który obejmuje naczynia krwionośne, nerwy i macierz zewnątrzkomórkową.

W środowisku badaczy zajmujących się *oncofertility* trwa debata nad zaletami i wadami wymienionych metod kriokonserwacji tkanki jajnika (Rivas Leonel, Lucci and Amorim, 2019). Metoda powolnego zamrażania była pierwszą techniką używaną do tego celu i nadal pozostaje metodą stosowaną najczęściej (Takae and Suzuki 2019; Chibeleian *et al.* 2020). Metoda powolnego zamrażania ma także udowodniona skuteczność, gdyż większość żywych urodzeń została udokumentowana u pacjentek u których tkanki zostały kriokonserwowane właśnie w ten sposób (Lotz *et al.* 2019; Dolmans *et al.* 2020; Ataman *et al.* 2022). W literaturze naukowej można znaleźć zarówno prace potwierdzające przewagę powolnego zamrażania (Gandolfi *et al.*, 2006), jak i prace nie znajdujące różnic lub wskazujące na witrifikację jako metodę lepiej zachowującą strukturę tkanki jajnika (Gandolfi *et al.* 2006; Sanfilippo *et al.* 2015; Barbato *et al.* 2018; Lee *et al.* 2019; Shi *et al.* 2017; Zhao *et al.* 2019; Kometas *et al.* 2021).

Czynnikiem mającym kluczowy wpływ na zachowanie struktury i żywotności tkanki jajnika i pozostających w niej pęcherzyków jest także wielkość skrawków tkanki. Cieńsze fragmenty pozwalają na lepsze przenikanie krioprotektantów, natomiast zbyt duża fragmentacja tkanki zaburza jej strukturę po rozmrożeniu (Kolbe, Walter and Rulicke, 2019). Stwierdzono także różnicujący wpływ stosowania poszczególnych protokołów oraz stężeń krioprotektantów na powodzenie zachowania prawidłowej struktury tkanki (Youm *et al.* 2013; Shi *et al.* 2017; Kometas *et al.* 2021).

### 1.9 *Czynniki różnicujące efektywność przeszczepu tkanki jajnika: miejsce wszczepu*

Jednym z ważniejszych aspektów programu zachowania płodności poprzez kriokonserwację tkanki jajnika jest miejsce wszczepienia tkanki do organizmu pacjentki. Miejsca wszczepienia tkanki dzielą się na ortotopoczne i heterotopoczne. U ludzi najczęściej wykonywanym zabiegiem jest przeszczep ortotopoczny polegający na laparoskopowym wszczepieniu fragmentu tkanki kory jajnika z powrotem na pozostały w organizmie jajnik lub do specjalnie utworzonej kieszonki otrzewnowej, gdzie fragmenty tkanki zostają zabezpieczone celulozową siatką i klejem fibrynowym (Dolmans *et al.*, 2021). Zabieg wykonany w ten sposób może umożliwić pacjentkom zajście w ciążę drogą naturalną,

ponieważ pozostała w ten sposób tkanka jajnika, w przypadku powodzenia procedury, zdolna jest do samodzielnej owulacji i transferu oocytu do jajowodu (Pilcher and Pearson 2004; Sheshpari *et al.* 2019a; Khattak *et al.* 2022). Poszczególni specjaliści wykonują operację wszczepienia skrawków tkanki jajnika na różne sposoby, wprowadzając modyfikacje do ogólnie zalecanego protokołu (Beckmann *et al.*, 2016). W 2019 roku zespół doktora Kutluk Oktay z Nowego Jorku przeprowadził też szereg operacji wszczepienia jajnika z użyciem laparoskopii robotycznej (Oktay *et al.*, 2019).

Drugim sposobem wszczepienia tkanki jajnika do organizmu pacjentki są przeszczepy heterotopiczne. Heterotopiczne miejsca przeszczepu tkanki jajnika w praktyce medycznej to tkanka podskórna przedramienia powyżej powięzi mięśnia ramiennie- promieniowego lub pochewka mięśnia prostego brzucha w podbrzuszu (Sonmezer and Oktay, 2010b). Ta metoda pozwala na proste i bezbolesne przeprowadzenie wszczepienia tkanki, a także na dokładną obserwację i ułatwiony dostęp do tkanki. Przeszczepy heterotopiczne umożliwiają dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych w celu wykonania punkcji i procedury zapłodnienia *in vitro*, a także mogą przywrócić równowagę hormonalną u kobiet zagrożonych przedwczesną menopauzą (Demeestere *et al.* 2009; Callejo *et al.* 2001). Przeszczepy heterotopiczne, chociaż często wykonywane symultanicznie z przeszczepem ortotopicznym, wykazują się krótszym czasem przetrwania w organizmie po przeszczepie, a także zdecydowanie mniejszą efektywnością podczas procedur wspomaganego rozrodu (Demeestere *et al.* 2009; Sonmezer and Oktay 2010b; Sheshpari *et al.* 2019a; Dolmans *et al.* 2021; Eijkenboom *et al.* 2022; Ataman *et al.* 2022).

#### 1.10 *Kierunki rozwoju eksperymentalnych technik związanych z kriokonserwacją tkanki jajnika.*

Kriokonserwacja i przeszczep tkanki jajnika jest techniką podlegającą stałym modyfikacjom i udoskonaleniom, a porównywanie wyników otrzymanych przez różne centra badawcze jest utrudnione ze względu na różnice w zastosowanych protokołach i metodyce. Efektywność metody uzależniona jest zarówno od wymienionych powyżej czynników, ale przede wszystkim od jakości materiału wyjściowego, czyli tkanki jajnika danej pacjentki (Dolmans, Falcone and Patrizio, 2020).

Istnieją jednak dwa podstawowe problemy, dotyczące każdej procedury przeszczepu mrożonej tkanki. Pierwszym z nich jest obawa o wspomniane zagrożenie wynikające z teoretycznej możliwości przeniesienia komórek nowotworowych wraz z tkanką jajnika.

Drugie zagadnienie to stres ischemiczny, któremu podlega fragment tkanki jajnika bezpośrednio po zabiegu przeszczepienia (Cacciottola, Donnez and Dolmans, 2021).

Ze względu na wielkość fragmentów mrożonej tkanki, nie ma możliwości wykonania anastomozy naczyń pozostających w tkance z naczyniami organizmu biorczyni. Zanim więc zostanie utworzona funkcjonalna sieć nowych naczyń krwionośnych, które zapewnią odżywienie i dostarczą tlenu komórkom, tkanka podlega niedokrwieniu i niedotlenieniu. Czas niezbędny do procesu rewaskularyzacji przeszczepionej tkanki u ludzi został określony na ok 7 dni, a rozpoczęcie procesu na ok. 2 dobę po przeszczepie (van Eyck *et al.* 2010; Chen, Tan, and Tzeng 2014). Stwierdzono także, że w budowie nowej sieci naczyń biorą udział zarówno naczynia powstające w tkance otaczającej przeszczep jak i w samym przeszczepionym skrawku (van Eyck *et al.*, 2010). Przejściowy stan niedokrwienia powoduje nie tylko utratę żywotności tkanki. Wielokrotne obserwacje dokonane na modelach zwierzęcych dowiodły istnienia mechanizmu nagłej, masowej aktywacji wzrostu pęcherzyków, która następuje w niedługim czasie po przeszczepieniu tkanki do organizmu i prowadzi do utraty rezerwy jajnikowej (Gavish *et al.*, 2018). Mechanizm ten, nazywany syndromem *burnout*, czyli „wypalaniem się” pęcherzyków powoduje obniżenie efektywności przeszczepów w procesie przywracania płodności. Jest też uważany za główną przyczynę krótkiej żywotności przeszczepów w organizmie (Roness *et al.*, 2013). *Burnout syndrome* może prowadzić do utraty 50-90% całej rezerwy pęcherzyków jajnikowych w przeszczepionym skrawku (Nisolle *et al.*, 2000). Nagła rekrutacja pęcherzyków zdaje się być bezpośrednio zależna od rewaskularyzacji tkanki (van Eyck *et al.* 2009; Cacciottola *et al.* 2018), a także od sposobu przygotowania tkanki, na przykład grubości skrawków (Gavish *et al.*, 2014). Przyczyny występowania syndromu wypalenia są upatrywane także w zmianie mechanicznych właściwości pofragmentowanej i przeszczepionej tkanki. W badaniach prowadzonych przez zespół profesor Teresy Woodruff zauważono zmiany w regulacji wzrostu i rekrutacji pęcherzyków zależne od sztywności tkanki (Woodruff and Shea, 2011). Anatomicznie, pęcherzyki pierwotne znajdują się głównie w powierzchniowej warstwie korowej, która charakteryzuje się sztywnością determinowaną przez obecność dużego stężenia kolagenu oraz małą gęstością sieci naczyń krwionośnych (Delgado-Rosas *et al.*, 2009). Taka budowa tkanki zapewnia stan uśpienia pęcherzyków pierwotnych, które wykazują się niską aktywnością metaboliczną i zużyciem tlenu (Ishikawa *et al.*, 2014), a także niezależność od zewnętrznej regulacji hormonalnej związanej z cyklem (Woodruff and Shea, 2011). Wykazano, że wraz ze wzrostem gęstości naczyń krwionośnych w tkance zmniejsza się sztywność macierzy

zewnątrzkomórkowej, co jest charakterystyczne dla części rdzeniowej jajnika. W jajniku ludzkim, w tej części tkanki znajdują się głównie pęcherzyki wzrastające i antralne, które wykazują wyższe zapotrzebowanie na składniki odżywcze oraz tlen, a także zależność od poziomu hormonów tropowych (Silber, 2015). Paradoksalnie, hipoksja wywołana przejściowym niedotlenieniem tkanki po przeszczepie nie jest tożsama z obniżoną dostępnością tlenu charakterystyczną dla warstwy korowej. W przypadku skrawków tkanki jajnika, regulacja zapewniana przez anatomiczną budowę organu zostaje zniwelowana, za to zmiana właściwości fizycznych, tj. stopnia zwartości macierzy, w której znajdują się pęcherzyki pierwotne, może prowadzić do nagłego wzrostu rekrutacji pęcherzyków pierwotnych. Zmiana właściwości fizycznych tkanki wpływa także na jej wewnętrzną regulację hormonalną. Zaburzenie tej regulacji ujawnia się, między innymi poprzez utratę parakrynej komunikacji pomiędzy pęcherzykami wzrastającymi i tworzącymi rezerwę jajnikową, w tym hamującego wzrost pęcherzyków pierwotnych działania hormonu antymullerowskiego (AMH) oraz szlaku sygnałowego kinazy fosfoinozytolu 3' (PI3K) /kinazy białkowej B (Akt) (Goto, Iwase, and Ando 2007; Gavish *et al.* 2018; Maidarti *et al.* 2019). Opiswane powyżej mechanizmy biorą udział w patologicznym procesie nagłego pobudzenia pęcherzyków do wzrostu. Zespoły naukowe na całym świecie prowadzą badania nad opracowaniem metod ograniczających negatywny wpływ syndromu wypalenia się pęcherzyków oraz przejściowego niedotlenienia i niedokrwienia tkanki. Ze względu na ewidentny wpływ stopnia waskularyzacji tkanki na zachowanie jej prawidłowej fizjologii i struktury, jednym z głównych kierunków działań jest próba przyspieszenia i zintensyfikowania tego procesu bezpośrednio po przeszczepie.

#### 1.11 *Modele zwierzęce: czynniki stymulujące neowaskularyzację*

Prowadzone badania na modelach zwierzęcych potwierdziły pozytywny wpływ czynników przyspieszających tworzenie naczyń, takich jak ludzka gonadotropina menopauzalna (ang. *human menopausal gonadotropin*; HMG) (Wang *et al.*, 2012), czynnik wzrostu fibroblastów *beta* (ang. *fibroblast growth factor beta*; bFGF) (Wang *et al.*, 2013), czy angiopoetyna (Kong *et al.*, 2017a) na zachowanie żywotności przeszczepionej tkanki jajnika. Najczęściej zauważony wpływ w.w. czynników odbywał się w większej lub mniejszej mierze przy udziale czynnika wzrostu śródbłonna naczyń VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*). Pozytywny wpływ samego VEGF zarówno

na wzrost naczyń jajnika jak i zachowanie rezerwy pęcherzyków w tkance, także został udowodniony w wielu pracach (Labied *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013; Kong *et al.* 2017a). Innym podejściem testowanym w pracach badawczych na modelach zwierzęcych jest zastosowanie w tym samym celu komórek macierzystych (Manavella, Cacciottola, Pomme, *et al.* 2018; Dolmans *et al.* 2019; Cacciottola *et al.* 2020; Chen *et al.* 2021). Działania te, o potwierdzonym na modelach zwierzęcych pozytywnym wpływie na zachowanie jakości i struktury tkanki, nie zostały jeszcze wprowadzone do użytku w medycynie ludzkiej i pozostają w fazie eksperymentalnej (Ataman *et al.*, 2022)

### 1.12 *Modele zwierzęce: kriokonserwacja i przeszczep całego jajnika*

Kolejnym, eksperymentalnym modelem zachowania właściwej homeostazy i ukrwienia w tkance jest kriokonserwacja i przeszczep całego jajnika. Przeszczep taki zakłada wykonanie anastomozy naczyń, co w teorii pozwoliłoby utrzymać funkcje endokrynologiczne i rozrodcze znacznie dłużej niż przeszczep fragmentów kory jajnika. Przeszczep całego jajnika mógłby również zniwelować problem stresu ischemicznego, któremu są poddawane fragmenty tkanki w stosowanej procedurze przeszczepu (Hossay, Donnez and Dolmans, 2020). Przeszczep całej gonady, chociaż pozostaje nadal w fazie eksperymentalnej ze względu na trudności z kriokonserwacją całego organu, a także na wymaganą precyzję wykonania anastomozy sieci naczyń jest przydatnym i ciekawym modelem badawczym (Tavana *et al.*, 2017; Hossay, Donnez and Dolmans, 2020).

### 1.13 *Modele zwierzęce: hodowla pęcherzyków in vitro*

Zupełnie inną metodą, testowaną w ramach działań asekuracyjnych w kontekście możliwości przeniesienia komórek nowotworowych wraz z przeszczepioną tkanką jest dojrzewanie wyizolowanych pęcherzyków *in vitro*. Przeprowadzenie dojrzewania pęcherzyków wymaga złożonych warunków środowiska pozwalających na zachowanie dynamiki folikulogenezy. Wzrost pęcherzyka i dojrzewanie oocyta zależą od wielu aspektów, w tym od zmieniających się czynników parakrynych i autokrynych, interakcji pomiędzy oocytem, a komórkami warstwy granulozy, a także stabilności cytoszkieletu i sił biomechanicznych (Dolmans *et al.*, 2007; Hornick *et al.*, 2012; Telfer and Andersen, 2021). W konsekwencji, dojrzewanie *ex vivo* pęcherzyków lub oocytów wymaga zmieniających się warunków hodowli, zgodnie z różnymi etapami wzrostu pęcherzyków. Według protokołu hodowli, początkowo pęcherzyki pierwotne hodowane są w hodowli

tkankowej *in vitro*, w której należy przeprowadzić indukcję aktywacji wzrostu, a następnie, za pomocą ręcznego preparowania tkanki, wyizolować pęcherzyki wzrastające. Kolejnym etapem hodowli jest dojrzewanie kompleksów oocytu i komórek wzgórka jajonośnego, oraz uzyskanie dojrzałego oocytu drugiego rzędu (Telfer and Andersen, 2021). Efektywność dojrzewania pęcherzyków *in vitro*, w celu uzyskania żywotnych, zdolnych do zapłodnienia komórek jajowych, została udowodniona m.in. na modelu mysim (O'Brien, Pendola, and Eppig 2003; Dolmans *et al.* 2007; Eppig *et al.* 2008). Jednakże, ze względu na obniżone parametry życiowe młodych uzyskanych z komórek jajowych hodowanych tą metodą, procedura dojrzewania pęcherzyków *in vitro* wymaga dalszych badań zanim jej użycie zostanie rozważane w kontekście zachowania płodności ludzi (Eijkenboom *et al.*, 2022).

#### 1.14 *Modele zwierzęce: sztuczny jajnik*

Nowatorskim podejściem zachowania płodności jest próba utworzenia sztucznego jajnika. Metoda ta wynika niejako z potrzeby zapewnienia optymalnych warunków wzrostu wyizolowanym pęcherzykom pierwotnym. Sztuczny organ naśladuje mikrośrodowisko i zwartość kory jajnika, co umożliwia zachowanie właściwej homeostazy w tkance i warunki zrównoważonego wzrostu pęcherzyków. Ponadto, strategia ta opiera się na introdukcji do sztucznej macierzy izolowanych pęcherzyków, co eliminuje ryzyko przeniesienia komórek nowotworowych wraz z tkanką, jako, że pęcherzyki osłonięte błoną podstawną są wyizolowane od komórek zrębu i naczyń, co chroni je od potencjalnego kontaktu z komórkami skażonymi nowotworem. Tak utworzony sztuczny organ może zostać przeszczepiony do regionu miednicznego, np. na pozostały jajnik lub pozostać w sztucznej hodowli w celu uzyskania dojrzałych oocytów do zapłodnienia *in vitro* (Cho *et al.*, 2019).

Jednym z wyzwań związanych z opracowaniem sztucznego jajnika są zmienne warunki środowiska jakiego wymagają pęcherzyki podczas różnych etapów dojrzewania. Plastyczność syntetycznej tkanki musi być zgodna z postępowaniem wzrostu pęcherzyków w taki sposób, aby jednocześnie zapewnić zwartość macierzy kory niezbędną do utrzymania pęcherzyków pierwotnych i pierwszorzędowych, ale także rozciągliwość lub częściową degenerację niezbędną do utworzenia przestrzeni wzrostu pęcherzyków antralnych, a ostatecznie owulacji (Cho *et al.*, 2019; Eijkenboom *et al.*, 2022). Oprócz tych cech, syntetyczny organ powinien umożliwiać dyfuzję tlenu i składników odżywczych

niezbędnych nie tylko do przeżycia pęcherzyków podczas hodowli, ale także do procesu neowaskularyzacji po transplantacji.

Aby zachować pełną funkcjonalność jajnika niezbędne jest jednak wszczepienie pozostałych komórek tkanki, takich jak komórki zrębu i komórki osłonki, które zapewniają produkcję hormonów steroidowych i czynników wzrostu niezbędnych do folikulogenezy i prawidłowego dojrzewania pęcherzyków (Smitz *et al.* 2010; Luyckx *et al.* 2013; Cho *et al.* 2019). Komórki te, w przeciwieństwie do izolowanych pęcherzyków mogą, jednakże, przenosić komórki nowotworowe, co zwiększa ryzyko związane z tą metodą.

W literaturze opisano badania mające na celu przetestowanie biosyntetycznych materiałów mogących służyć za sztuczną macierz tkanki jajnika. Pośród metod, które wykazały użyteczność znajdują się: agarozowe szkielety mikrotkanki (Krotz *et al.*, 2010), enkapsulacja pęcherzyków w otocze z alginianu sodu i macierzy błony podstawnej (Matrigel®) (Laronda *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2016), a także kompleksy fibrynowe (Luyckx *et al.* 2013; Chiti *et al.* 2018). W 2017 r. zespół profesor Larondy udowodnił skuteczność syntetycznego organu *in vivo*. W eksperymencie myszom o zwykłej sierści aguti ortotopicznie wszczepiono wyprodukowany w drukarce 3D, sztuczny, hydrożelowy jajnik wraz z pęcherzykami pobranymi od myszy znaczonej białkiem zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescence protein*; GFP). W rezultacie projektu, w następstwie naturalnego krycia, urodziły się młode myszy znaczone GFP, co bezpośrednio wskazuje na skuteczność przeszczepu i funkcjonalność syntetycznego organu (Laronda *et al.*, 2017). Jednakże, podobnie jak w przypadku innych eksperymentalnych metod, syntetyczne organy nie zostały jeszcze zastosowane u pacjentek, brak więc informacji o skuteczności metody u ludzi.

#### 1.15 *Modele zwierzęce: inne eksperymentalne strategie zwiększania bezpieczeństwa transplantacji tkanki jajnika*

Wymieniając metody, w których usiłuje się eliminować zarówno niebezpieczeństwo przeniesienia komórek nowotworowych z tkanką jak i próbuje przyspieszyć proces ukrwienia tkanki po przeszczepie, warto także wspomnieć o eksperymentalnych technikach oczyszczania wyekstrahowanej tkanki z komórek nowotworowych. Metoda ta zakłada, że izolowana tkanka po rozmrożeniu może zostać poddana chemicznej puryfikacji, która zapewnia likwidację zagrożenia reintrodukcją nowotworu wraz z tkanką (Mulder *et al.* 2019; Eijkenboom *et al.* 2021). Tak oczyszczona tkanka może zostać

bezpiecznie wszczepiona biorczyni. Technika puryfikacji jest, jednakże nowatorską metodą i nie wszyscy badacze potwierdzają jej skuteczność (Díaz-García *et al.*, 2019).

Jeszcze innym podejściem, mającym na celu zminimalizowanie zagrożenia reintrodukcją nowotworu jest ksenotransplantacja rozmrożonej tkanki ludzkiej do organizmu zwierzęcia, zwykle myszy z immunosupresją. Fragmenty tkanki jajnika przeszczepione zwierzętom mogą posłużyć jako źródło dojrzałych, zdolnych do zapłodnienia oocytów. W ten sposób ewentualne ryzyko rozwinięcia nowotworu ponosi organizm zwierzęcia, a zarodki uzyskane w procedurze zapłodnienia *in vitro* mogą zostać bezpiecznie użyte do transferu (Okta, Newton, and Gosden 2000; Lotz *et al.* 2014). Ksenotransplantacja ludzkiej tkanki jajnika do organizmu myszy jest metodą o potwierdzonej skuteczności, umożliwiającą uzyskanie dojrzałych do zapłodnienia oocytów. Metoda ta jest jednak kontrowersyjna zarówno ze względu na ryzyko przeniesienia patogenów z organizmu zwierzęcia, jak i ze względów etycznego wykorzystania zwierząt w medycynie (Cozzi *et al.*, 2005).

Procedura zachowania płodności poprzez kriokonserwację i przeszczep tkanki jajnika jest obiecującą metodą o udowodnionej skuteczności, nadal jednak pozostającą w sferze dopracowywania i optymalizacji najbardziej efektywnej techniki. Praca stanowiąca przedmiot tej dysertacji wpisuje się w kanon badań translacyjnych prowadzonych na modelach zwierzęcych mających na celu przetestowanie możliwych czynników usprawniających efektywność przeszczepu. Czynnikiem wybranym w badaniu jest osocze bogatopłytkowe.

#### 1.16 *Osocze bogatopłytkowe jako czynnik wspomagający neowaskularyzację przeszczepionej tkanki kriokonserwowanego jajnika*

Osocze bogatopłytkowe (ang.: *platelet rich plasma*, PRP) to autologiczny preparat krwiopochodny. Powstaje ono na drodze odwirowania z pełnej krwi trombocytów, co ma na celu zwiększenie ich stężenia w otrzymanym osoczu.

Trombocyty, czyli płytki krwi, są bezjądrowymi fragmentami komórek, powstałymi z megakariocytów znajdujących się w szpiku kostnym. Ich pochodzenie i kluczowa rola w tworzeniu skrzepu zostały odkryte już na początku XX wieku (Wright, 1906). Płytki krwi zawierają wiele białek sygnałowych, regulatorowych i cytokin które mają wpływ na inicjowanie i regulację procesu gojenia ran. Analiza proteomiczna profili białkowych



aktywowanych płytek krwi wykazała obecność ponad 300 różnych białek uwalnianych z trombocytów pod wpływem obecności trombiny, a więc w czasie tworzenia skrzepu (Coppinger *et al.*, 2004). W badaniu Qurechi *et al.* przedstawiono analizę proteomiczną nieaktywowanych płytek krwi, w której wykazano obecność 1507 odrębnych białek, w tym ok 190 białek błonowych oraz 262 ufosforylowanych białek mających wpływ na szlaki sygnałowe procesów regeneracji (Qureshi *et al.*, 2009). Bioinformatyczna analiza wyników pozwoliła na opracowanie mapy interakcji białek zawartych w płytkach i lepsze zrozumienie mechanizmu działania płytek i osocza bogatopłytkowego.

Poza dobrze poznaną rolę płytek w tworzeniu skrzepu, wykazano ich wpływ na angiogenezę, poprzez wpływ płytek na migrację, a także na indukcję różnicowania się komórek progenitorowych w komórki nabłonka budującego naczynia krwionośne (Jurk and Kehrel 2005; Nachman and Rafii 2008; Golebiewska and Poole 2015). Stwierdzono także wpływ osocza bogatopłytkowego na modulację odpowiedzi zapalnej (Thomas and Storey 2015; Repsold and Joubert 2021), a nawet modulację odpowiedzi immunologicznej na obecność we krwi patogenów (Xu *et al.* 2016; Koupenova *et al.* 2018). W badaniach procesów regeneracji stwierdzono także istotny wpływ płytek i osocza bogatopłytkowego na komórki macierzyste (Choi, Minn, and Chang 2012; Masoudi *et al.* 2016; Levoux *et al.* 2021) oraz proliferację, różnicowanie się i apoptozę komórek (Golebiewska and Poole 2015; Xu *et al.* 2016; Repsold and Joubert 2021).

### 1.17 *Budowa płytek krwi*

Płytki krwi są najmniejszymi elementami morfotycznymi krwi. Cytoszkielek trombocytów nadaje im dyskoidalny kształt w czasie spoczynku, który ulega zmianie w wyniku aktywacji.

Płytki krwi zawierają swoiste ziarnistości sekrecyjne, zwane granulami *alpha* (ang. *α-granules*; AGs) i *delta* (ang. *δ-granules*; DGs), a także lizosomy. Do uwalniania substancji zawartych w granulach dochodzi poprzez aktywację płytek na szlaku pobudzenia receptorów błonowych.

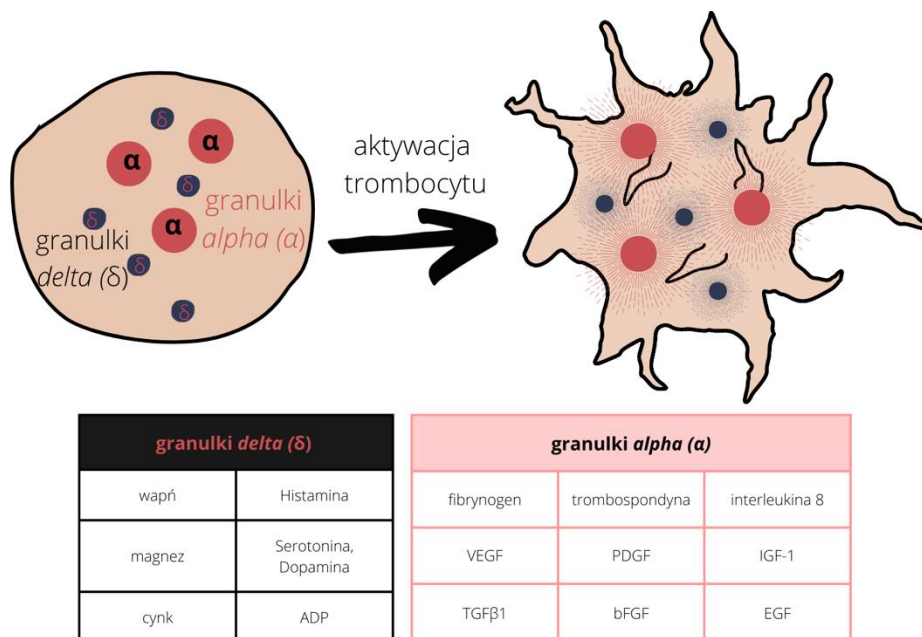
Każda populacja ziarnistości ma specyficzne właściwości dotyczące zarówno struktury, jak i roli, jaką odgrywają uwalniane składniki. Granule typu *alpha* zawierają duże białka adhezyjne, takie jak: płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet derived growth factor*, PDGF); insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 (ang.: *insulin like growth factor type 1*, IGF1), transformujący czynnik wzrostu (ang. *transforming growth factor beta*; TGF-β1);

czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (ang.: *vascular endothelial growth factor*; VEGF), czynnik wzrostu fibroblastów (ang.: *basic fibroblastic growth factor*; bFGF) czy nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*; EGF) (Jurk and Kehrel 2005; Golebiewska and Poole 2015), a także większość białek znajdujących się w płytkach (Qureshi *et al.*, 2009).

Granule typu *delta* zawierają cząsteczki niebiałkowe oraz cytokiny, w tym katecholaminy: histaminę, serotoninę i dopaminę, a także mikroelementy, takie jak jony magnezu, jony wapnia i cynku oraz prekursor adenozynotrójfosforanu, ADP (Qureshi *et al.* 2009; Chen, Yuan, and Li 2018; Cho *et al.* 2021).

Ze względu na swoje liczne funkcje płytka krwi rozwinęły zestaw receptorów błonowych, które zapewniają reaktywność płytek krwi z szeroką gamą agonistów i białek adhezyjnych. Niektóre z tych receptorów ulegają ekspresji tylko na płytkach, które uległy aktywacji (Jurk and Kehrel, 2005; Nachman and Rafii, 2008).

Żywotność płytek krwi w formie nieaktywowanej wynosi 7 do 9 dni po ich oddzieleniu się od megakariocytu. Płytki, które ulegają aktywacji czy to poprzez receptory błonowe czy w wyniku obecności trombiny i aktywacji szlaku krzepliwości zmieniają swój kształt (Rycina 3). Aktywowane płytki z dyskowatych przybierają formę echinocytarnych, a znajdujące się w komórce ziarnistości sekrecyjne migrują do centrum płytki z którego na drodze fuzji z błoną zostają uwolnione do międzykomórkowego osocza (Jurk and Kehrel, 2005; Sanchez-Gonzalez, Mendez-Bolaina and Trejo-Bahena, 2012). Aktywacja płytek krwi jest niezbędnym procesem umożliwiającym wykorzystanie właściwości trombocytów.



Rycina 3. Schemat aktywacji płytek krwi. (Szkic własny na podstawie grafiki opracowanej przez Atkinson *et al.* (Atkinson, Martin and Sturmeay, 2021))

Do sztucznej aktywacji płytek krwi, której dokonuje się w czasie przygotowania osocza bogatopłytkowego doprowadza się przy użyciu trombiny, kolagenu lub chlorku wapnia (Cavallo *et al.*, 2016), chociaż wskazuje się także na samoistną aktywację płytek, do której dochodzi podczas wirowania w czasie preparatyki (Silva *et al.* 2016; Sánchez *et al.* 2020). W zależności od próbki wyjściowej i zastosowanej techniki przygotowania osocze bogatopłytkowe może zawierać różne ilości erytrocytów, leukocytów i płytek. Powszechnie uważa się, że osocze bogatopłytkowe, którego można użyć w celach terapeutycznych powinno zawierać przynajmniej pięciokrotność liczby płytek w porównaniu do próbki pierwotnej (Dhurat and Sukesh, 2014).

Osocze bogatopłytkowe jest wykorzystywane w medycynie od lat 70 XX wieku (Gupta, Paliczak and Delgado, 2021). Dzisiaj zastosowanie osocza jako mediatora regeneracji jest szeroko rozpowszechnione w wielu terapiach, m. in: w chirurgii narządu ruchu (Everts *et al.*, 2021), medycynie sportu (Młynarek, Kuhn and Bedi, 2016), dermatologii (Emer, 2019), a także kosmetologii (Elghblawi, 2018).

Doświadczalnie, zarówno klinicznie, na modelach zwierzęcych jak i *in vitro* stwierdzono istotny wpływ osocza bogatopłytkowego na regenerację wielu tkanek. Najwięcej badań dotyczy odbudowy tkanek nerwowej i mięśniowej (Borrione *et al.* 2015;

Borrione *et al.* 2015; Küçük *et al.* 2014; Martins *et al.* 2016; Zhu *et al.* 2020), a także ścięgien (Yan *et al.*, 2017) czy skóry (Jee *et al.*, 2016).

### 1.18 *Terapie osoczem bogatopłytkowym w medycynie rozrodu*

Terapia osoczem bogatopłytkowym zaczyna być rozważana także w medycynie rozrodu. Udowodniono terapeutyczne działanie osocza bogatopłytkowego w leczeniu bliznowacenia endometrium (Aghajanova, Houshdaran, Balayan, Manvelyan, Irwin, *et al.*, 2018). Efekt działania osocza bogatopłytkowego na endometrium, tj. zmniejszenie reakcji zapalnej oraz zwiększenie jego ukrwienia został wykorzystany także w procedurach leczenia niepłodności metodami ART (ang. *artificial reproduction techniques*). Wspomniane działanie osocza na błonę śluzową macicy zdaje się poprawiać receptywność endometrium, co pozwala na zwiększenie prawdopodobieństwa implantacji zarodka po transferze (Lin, Qi and Sun, 2021). Opisano w literaturze także przypadki wykorzystania osocza bogatopłytkowego podczas terapii chronicznego zapalenia błony śluzowej macicy (*endometritis*), które wskazują na wyciszenie reakcji zapalnej endometrium nawet w stanie chronicznego zapalenia. Potwierdza to zasadność wykorzystanie tego typu terapii w procedurach IVF (Sfikianoudis *et al.* 2019; Li *et al.* 2021). Mechanizm działania substancji zawartych w płytkach i uwolnionych pod wpływem aktywacji osocza na endometrium obejmuje nie tylko immunomodulacyjne wyciszenie reakcji zapalnej, ale także proliferacyjne działanie na komórki *endometrium*. Ponadto, obecność osocza bogatopłytkowego indukuje mechanizmy regeneracyjne tkanek, co w przypadku endometrium daje rezultat zwiększenia jego grubości. Zawarte w osoczu bogatopłytkowym czynniki wzrostu inicjują także angiogenezę, co zwiększa stopień ukrwienia tkanki i zapewnia większą receptywność na zarodek (Aghajanova, Houshdaran, Balayan, Manvelyan, Irwin, *et al.* 2018; Bos-Mikich *et al.* 2019; Lin *et al.* 2021; Mouanness *et al.* 2021).

Terapeutyczne właściwości osocza bogatopłytkowego rozpatrywane są także w kontekście leczenia niedrożności jajowodów i zapalenia szyjki macicy powodowanej infekcją bakterii z rodzaju *Chlamydia* (Rippentrop *et al.*, 2021).

Innym budzącym coraz większe zainteresowanie zastosowaniem osocza bogatopłytkowego jest nastrzykiwanie gonad, w tym w szczególności jajników (Atkinson, Martin and Sturmey, 2021). Terapia ta zwana „odmłodzeniem jajników” (ang. *ovarian rejuvenation*) budzi kontrowersje w świecie naukowym, chociaż zdaje się przynosić

obiecujące efekty (Sills *et al.* 2018; Farimani *et al.* 2019; Pantos *et al.* 2019; Ahmadian *et al.* 2020; Hsu *et al.* 2020).

Mechanizm działania osocza bogatopłytkowego na jajnik nie jest do końca poznany. Znane są niektóre aspekty działania składników osocza, takie jak proangiogeny wpływ czynników zawartych w osoczu bogatopłytkowym i płytkach. Inne, takie jak immunomodulacja w tym hamowanie długotrwałej reakcji zapalnej, a także proliferacyjne działanie na komórki nabłonkowe także mają prawdopodobnie istotny wpływ na efekty obserwowane w badaniach klinicznych. W literaturze udowodniono ekspresję w jajniku wielu czynników zawartych w płytkach i osoczu bogatopłytkowym: zarówno w komórkach nabłonka otaczającego sam organ, jak i w komórkach zrębu i kory. Ekspresja niektórych czynników została stwierdzona na komórkach tworzących pęcherzyki, a także na powierzchni samego oocytu. Poniższa tabela (Tabela 1) przedstawia niektóre czynniki obecne w osoczu bogatopłytkowym i płytkach krwi, które w badaniach *in vitro* i na modelach zwierzęcych wykazały ekspresję i aktywny wpływ na regulację funkcji i żywotności tkanki jajnika (Qureshi *et al.*, 2009).

Tabela 1 Wybrane składniki osocza bogatopłytkowego o udowodnionym w literaturze wpływie na jajnik. (Atkinson, Martin and Sturme, 2021).

| Nazwa czynnika   | Znane działanie  | Odniesienie w literaturze  |
|--|--|--|
| Białka morfogenetyczne kości;<br>BMPs  | Czynniki niezbędne w dojrzewaniu pęcherzyków do owulacji, w tym rozrostu komórek wzgórka jajonośnego. Zwiększona ekspresja BMP2 ma wpływ na poprawę jakości oocytów  | (Regan <i>et al.</i> 2018; Monget, McNatty, and Monniaux 2021)   |
| Chemokina CCL5/RANTES  | Wyższy poziom CCL5 w płynie pęcherzykowym oocytów wpływa korzystnie na jakość zarodków uzyskanych w zapłodnieniu <i>in vitro</i> . Wykazano także istotny wpływ na regulację wzrostu pęcherzyków wewnątrz jajnika. | (Ledee <i>et al.</i> , 2008; Shen <i>et al.</i> , 2019)          |
| Epidermalny czynnik wzrostu; EGF   | Jeden z czynników biorących udział w indukcji proliferacji komórek wzgórka i wzrostu pęcherzyka powodowanego przez hormon luteinizujący LH   | (Arroyo, Kim and Yeh, 2020)                                      |
| Interleukina 8; IL-8   | Obecna w płynie pęcherzykowym pęcherzyków produkujących wysoką jakość oocytów. Jej wysoki poziom koreluje z pozytywnym wynikiem procedury IVF  | (Ledee <i>et al.</i> , 2008; Monget, McNatty and Monniaux, 2021) |
| Płytkopochodny czynnik wzrostu, PDGF   | Obecne receptory dla PDGF na oocytach i komórkach ziarnistych w jajniku. Bierze udział w rekrutacji pęcherzyków pierwotnych do wzrostu oraz w regulacji steroidogenezy.  | (Schmahl, Rizzolo and Soriano, 2008)                             |
| Płytkowy czynnik 4 / chemokina C-X-C; PF4/CXCL4                              | Obecna w pęcherzykach jajnikowych kobiet obarczonych zespołem policystycznych jajników   | (Ledee <i>et al.</i> , 2008; Shen <i>et al.</i> , 2017)          |
| Czynnik produkowany przez komórki zrębu 1 $\alpha$ ; SDF1- $\alpha$ / CXCL12 | U człowieka obecny w pęcherzykach wzrastających o dużym rozmiarze. U myszy hamuje rekrutację pęcherzyków pierwotnych. Zwiększona ekspresja koreluje z jakością tkanki i oocytów.                                   | (Ledee <i>et al.</i> , 2008)                                     |

|  |  |   |
|--|--|---|
| Serotonina   | Receptory dla serotoniny typu 5-HT obecne w komórkach nabłonku sześciennego na powierzchni jajnika (ovarian epithelium); serotonina i receptory serotoniny obecne w kompleksach oocyt- wzgórek jajonośny u myszy; wykazano wpływ na regulację produkcji estradiolu w jajnikach na modelu szczurzym | (Amireault and Dubé, 2005; Henriksen, Dizeyi and Abrahamsson, 2012)                 |
| Transformujący czynnik wzrostu <i>beta</i> 1; TGF- $\beta$ 1 | Bierze udział w regulacji wzrostu i degeneracji pęcherzyków w jajniku. Czynnik biorący udział w komunikacji pomiędzy komórkami jajnika, regulujący wzrost i dojrzewanie pęcherzyków i oocytów.; Wpływa na regulację angiogenezy  | (Raja-Khan <i>et al.</i> , 2014; Rimon-Dahari <i>et al.</i> , 2016)                 |
| Trombospondyna -1; TSP-1                                     | Obecna w komórkach ziarnistych oraz komórkach stromy jajnika; Zmniejszona ekspresji trombospondyny hamuje pęknięcie pęcherzyków i owulację; bierze udział w regulacji neoangiogenezy w jajniku   | (Greenaway <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 2021)                          |
| Tkankowy inhibitor metaloproteazy macierzowej 4, TIMP 4      | Stwierdzono ekspresję w komórkach jajnika myszy; udział w regulacji żywotności ciała żółtego podczas ciąży   | (Bu <i>et al.</i> , 2006)   |
| Czynnik wzrostu fibroblastów; FGF                            | Bierze udział we wzroście i dojrzewaniu pęcherzyków; pobudza proliferację komórek ziarnistych i komórek wzgórek; stwierdzono ekspresję różnych receptorów dla FGF na błonie oocytów i komórek ziarnistych  | (Alan and Kulak, 2021; Du <i>et al.</i> , 2021; Monget, McNatty and Monniaux, 2021) |
| Czynniki wzrostu śródbłonna naczyniowego; VEGFs              | Główny czynnik regulatorowy wzrostu i tworzenia naczyń w jajniku, zapewniający odżywienie i natlenienie tkanki; bierze udział we wzroście pęcherzyków i utrzymaniu żywotności ciała żółtego  | (di Pietro <i>et al.</i> , 2018; Monget, McNatty and Monniaux, 2021)                |





## ***2. Hipoteza pracy:***

Ze względu na wpływ osocza bogatopłytkowego na regulację i zachowanie funkcji jajników, a także ze względu na wpływ czynników zawartych w osoczu bogatopłytkowym, na angiogenezę, w niniejszej dysertacji testowano następującą hipotezę:

**Osocze bogatopłytkowe jest czynnikiem mającym znaczący wpływ na poprawę efektywności przeszczepu i funkcjonalności wiotryfikowanych tkanek jajnika po przeszczepie na modelu szczurzym.**



### **3. Cel badań:**

**Głównym celem niniejszej dysertacji była analiza wpływu osocza bogatopłytkowego na efektywność procedury autologicznego przeszczepu jajnika**

Szczegółowe zadania badawcze obejmowały:

1. Opracowanie i wykonanie wzbogaconej osoczem bogatopłytkowym procedury autologicznego przeszczepu tkanek jajnika u szczurów jako modelu translacyjnego dla człowieka.
2. Ocena przebiegu i nasilenia angiogenezy i apoptozy oraz rekrutacji i hamowania wzrostu pęcherzyków w kriokonserwowanych tkankach jajnika po autologicznej transplantacji.
3. Ocena wpływu osocza bogatopłytkowego na efektywność procedury przeszczepu tkanek jajnika, poprzez wzbogacenie procedury na etapach inkubacji oraz iniekcji w miejscu wszczepu.
4. Ocena krótko-, średnio- i długotrwałego wpływu osocza bogatopłytkowego na strukturę i funkcje kriokonserwowanych i przeszczepionych tkanek jajnika.



## 4. Materiały i metody.

### 4.1 Zwierzęta

Wszystkie doświadczenia z użyciem zwierząt laboratoryjnych były prowadzone zgodnie ze standardami krajowymi i europejskimi, za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie (WAW2/174/2018).

Badanie zostało przeprowadzone na 18 dojrzałych płciowo szczurach płci żeńskiej szczepu WAG/Rij/W, w wieku 12 tygodni, podzielonych na grupy: D2 (n=6), D7 (n=6) i D30 (n=6). Zwierzęta pochodziły ze zwierzętarni Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej - Curie. Zwierzęta biorące udział w eksperymencie po przeniesieniu do ośrodka zostały poddane okresowi habituacji, w czasie którego przyzwyczajały się do warunków utrzymania i osoby zajmującej się zwierzętami. Szczury trzymane były w specjalnie przeznaczonych do utrzymania zwierząt systemach o zapewnionej stałej temperaturze i wilgotności powietrza, w stałym cyklu dobowym 12/12h. W celu zapewnienia dobrostanu zwierzęta miały dostęp do wody i pokarmu *ad libitum*, a także wzbogacenia w formie miejsc do chowania się, zabawek i materiału do budowy gniazda.

Jajniki z grupy D0 (grupa porównawcza) zostały pobrane *post mortem* od zwierząt z tego samego szczepu i w tym samym wieku pochodzących z ze zwierzętarni Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej - Curie. Zwierzęta przed uśmierceniem zostały poddane mononarkozie izofluranowej, która jest stosowana powszechnie w ginekologii i położnictwie (Krawczyk, 2018), a w badaniach na zwierzętach nawet w trakcie chirurgicznego zabiegu pobrania oocytów u myszy i nie wykazuje istotnego wpływu na tkankę jajnika (Byers, Wiles and Taft, 2009).

Krew do przygotowania osocza bogatopłytkowego została pobrana od zwierząt z tego samego szczepu, pochodzących z tej samej zwierzętarni. Pobranie krwi odbywało się odsercowo, po uprzednio zastosowanej narkozie wziewnej za pomocą izofluranu (Isotek, Laboratorios Karizoo, Hiszpania). Zabieg przeprowadzany był przez osobę wykwalifikowaną i uprawnioną do uśmiercania zwierząt. Pobranie jajników z grupy D0 oraz krwi odsercowo nie wymagało zgody komisji etycznej, zgodnie z Art. 2.1.6 Ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych, który stanowi, że nie jest procedurą uśmiercenie zwierzęcia wyłącznie po to, aby wykorzystać jego narządy lub tkanki do celów określonych w Art. 3.

#### 4.2 *Protokół procedury autologicznego przeszczepu tkanki jajnika. Postępowanie ze zwierzętami.*

Wszystkie zwierzęta przed wykonaniem ovariectomii były codziennie poddawane ocenie fazy cyklu rujowego za pomocą wymazu z pochwy (Ajayi and Akhigbe, 2020). Próbki pobierane były za pomocą patyczka z bawełnianą końcówką zwilżonego roztworem soli fizjologicznej, a następnie rozmazywane na szkiełku podstawowym i barwione zestawem Diff-Quick (Medion Diagnostics, Szwajcaria). Ocenę wymazów cytologicznych prowadzono z użyciem mikroskopu świetlnego (Nikon Eclipse E200, Japonia).

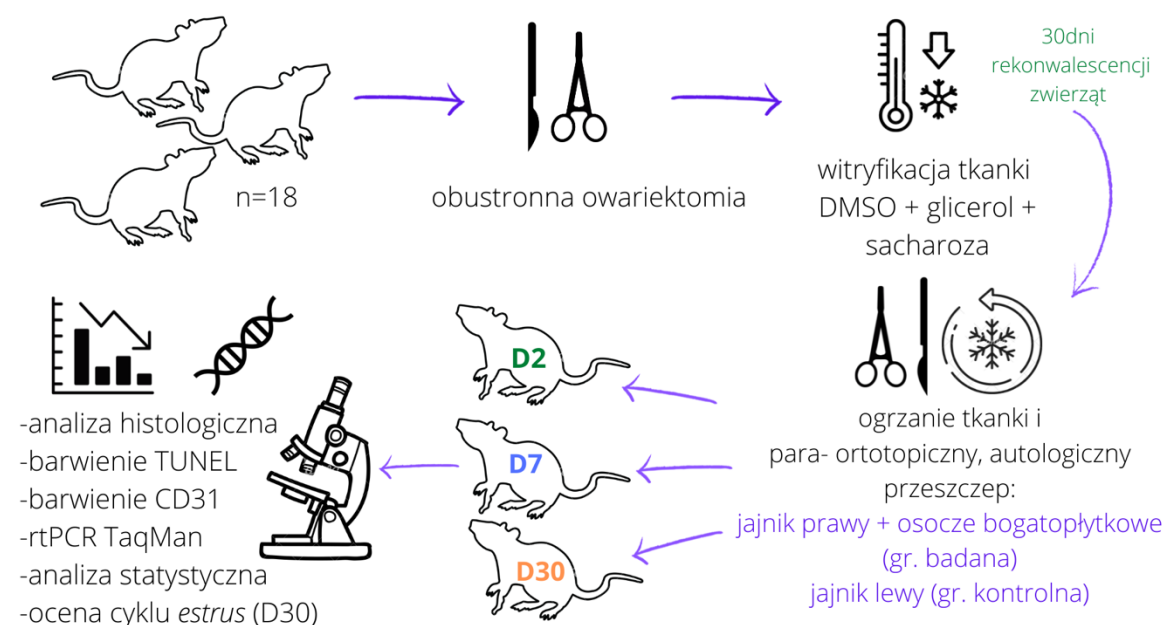
Każde ze zwierząt zostało poddane obustronnej ovariectomii, która odbywała się w znieczuleniu ogólnym za pomocą zastrzyku z mieszaniny chlorowodoru medetomidyny i ketaminy (Cepetor 1mg/ml CP-Pharma Handelsges, Niemcy; Bioketan 1mg/ml Vetoquinol, Polska). Operacja była przeprowadzona jedynie, jeśli zwierzę pozostawało w potwierdzonej fazie *diestrus* cyklu rujowego.

Procedury operacyjne wykonywane były z zachowaniem wszelkich reguł aseptyki i antyseptyki zgodnych ze sztuką chirurgii ogólnej. Powłoki brzuszne do dostępu chirurgicznego golono od mostka do spojenia łonowego, a następnie dokładnie odkażano z pomocą roztworu chlorheksydyny (Manusan, Polfa, Polska) i jodopowidonu (Povidone, Polfa, Polska). Wykonywana była laparotomia pośrodkowa, zapepkowa, tak aby można było wydobyć prawy i lewy jajnik, które po uprzednim podwiązaniu wiązki naczyniowej usuwano z jamy otrzewnej. Naczynia jajnikowe i rogi macicy podwiązywano nicią wchłaniającą, plecioną o numerze 5-0 (Novosyn, B.Braun, Niemcy). Ranę po laparotomii zespalało klasycznie nicią wchłaniającą o numeracji 4-0 (Novosyn, B.Braun, Niemcy), na skórę zakładano szew sródkórny kryty. Po zakończonej operacji zwierzęta wybudzano za pomocą zastrzyku zawierającego chlorowodorek atipamezolu (Antisedan 5mg/ml, Orionpharma, Finlandia). Zwierzętom podano także prewencyjnie antybiotyk enrofloksacynę (Enflocyna, Biowet, Polska) oraz przeciwbólowo carprofen (Rimadyl, Zoetis, Polska) w postaci iniekcji po zakończeniu operacji. Pobrane podczas operacji jajniki zostały przeniesione do opisanych, jałowych probówek zawierających roztwór buforowanej fosforanem soli fizjologicznej z dodatkiem potasu i magnezu typu Dulbecco (ang.: *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; DPBS; Gibco™*, Niemcy) z 20% dodatkiem surowicy płodowej z cieląt (ang.: *fetal bovine serum; FBS; Sigma; Niemcy*), a następnie przeniesione do laboratorium w celu kriokonserwacji. W celu

zminimalizowania szoku termicznego podczas transportu tkanek została zachowana temperatura 38°C.

Szczury po owariotomii przechodziły okres rekonwalescencji trwający nie mniej niż 30 dni, w czasie których były pod stałą opieką lekarza weterynarii. Następnym etapem badania było ponowne wszczepienie tkanek, także odbywające się w znieczuleniu ogólnym. Autologiczne tkanki jajnika zostały wszczepione w pozycji para-ortotopicznej. Wszczepiane jajniki zakotwiczano za pomocą nici wchłanialnej o numerze 5-0 na obłej igle (Novosyn, B.Braun, Niemcy). Miejscem wszczepu było unaczynione więzła szerokie macicy w sąsiedztwie przyjajnikowego końca rogu macicy, obok blizny po wcześniejszej amputacji. W tym miejscu wykonywano rodzaj kieszonki. Wszczepione jajniki obkładano siecią (łac. *omentum*) przytwierdzając ją do rogu macicy za pomocą wzmiankowanej wcześniej nici. Podczas operacji został przyjęty stały model badawczy: prawy jajnik był traktowany osoczem bogatopłytkowym, a lewy pozostawał grupą kontrolną dla danego zwierzęcia. Miejsce wszczepu prawego jajnika zostało dodatkowo nastrzyknięte 100-200µl osocza bogatopłytkowego.

Po operacji wszczepienia tkanki jajnika szczury zostawały uśmiercone zgodnie z przynależnością do grupy badawczej: po dwóch (grupa D2), siedmiu (grupa D7) lub trzydziestu (grupa D30) dniach. Uzyskane *post mortem* tkanki zostały podzielone i przeznaczone do dalszej preparatyki w zależności od wykonywanej analizy. Schemat doświadczenia został przedstawiony na Rycinie 4.



Rycina 4. Schemat doświadczenia stanowiącego przedmiot dysertacji

#### 4.3 *Przygotowanie osocza bogatopłytkowego*

Osocze bogatopłytkowe zostało uzyskane ze szczurów szczepu WAG/Rij/W pochodzących z Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej Curie w Warszawie. Krew do uzyskania osocza została pobrana odsercowo z użyciem sterylnej igły 18G i sterylnej strzykawki 5ml. Zwierzęta w czasie pobrania pozostawały pod wpływem znieczulenia izofluranem i nie wybudzały się z niego. Pobrana krew była natychmiast przenoszona do sterylnej probówki z cytrynianem (Sarstedt; Polska) w celu zatrzymania koagulacji. Próbkę krwi z cytrynianem zostały poddane wstępnemu wirowaniu z siłą odśrodkową 160G przez 20 minut w temperaturze pokojowej (22°C). Po zakończeniu wirowania górna frakcja (surowicza) została przeniesiona do czystej sterylnej probówki i poddana wirowaniu w prędkości 400G przez 15 minut, w temperaturze pokojowej. Po wirowaniu otrzymano dwie frakcje osocza: osocze ubogie w płytki (górna frakcja) i osocze bogatopłytkowe (dolna frakcja). Osocze nie zostało poddane dodatkowej aktywacji, ze względu na potwierdzoną w literaturze naukowej degranulację płytek w czasie wirowania przy dużych prędkościach (Silva *et al.* 2016; Sánchez *et al.* 2020).

Otrzymane osocze było oceniane za pomocą automatycznego analizatora krwi (Mindray BC-2800Vet). Jedynie próbki pozbawione białych krwinek (poziom poniżej czułości analizatora) zawierające stężenie płytek powyżej  $290 \times 10^9/l$  zostały użyte w badaniu.

Osocze bogatopłytkowe było zastosowane w badaniu w dwóch formach:

- jako pożywka, w której rozmrożona tkanka jajnika była poddana inkubacji bezpośrednio przez wszczepieniem do organizmu zwierzęcia
- jako seria nastrzyknięć o łącznej objętości 100-200µl deponowanych bezpośrednio na miejsce wszczepienia jajnika traktowanego osoczem (okolica prawego więzadła macicy)

#### 4.4 *Witryfikacja i proces ogrzewania tkanki jajnika*

W celu kriokonserwacji tkanki jajnika szczura został użyty jeden z protokołów opisanych przez Youm i wsp. zoptymalizowany dla jajnika szczura (Youm *et al.*, 2013).

Jajniki pobrane na drodze owariektomii (grupa D2, D7, D30) lub *post mortem* (grupa porównawcza D0) od szczurów zostały nacięte i zanurzone w roztworze DPBS (DPBS; Gibco™, Niemcy) z 20% FBS (Sigma; Niemcy) w temperaturze 38°C.

Po przeniesieniu do laboratorium tkanki zostały poddane procesowi witryfikacji.



Pierwszym etapem kriokonserwacji była wstępna ekwilibracja tkanki w roztworze buforowanej fosforanem soli fizjologicznej z dodatkiem potasu i magnezu typu Dulbecco (DPBS; Gibco<sup>TM</sup>, Niemcy) z 20% dodatkiem surowicy płodowej z cieląt (FBS; Sigma; Niemcy) z dodatkiem 7,5% etylenu glikolowego (ang.: *ethylene glycol*; EG; Sigma; Niemcy) oraz 7,5% dimetylosulfotlenku (ang.: *dimethyl sulfoxide*; DMSO; Serva; Niemcy) przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie tkanki zostały przełożone do roztworu bazowego (DPBS+20%FBS) zawierającego 20% EG i 20% DMSO a także 0,5M sacharozy (Serva; Niemcy) i pozostawione na 5 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie witrifikacji tkanki zostały zanurzone w ciekłym azocie i przełożone do dokładnie opisanych (numer zwierzęcia, jajnik prawy/lewy) probówek kriogenicznych. Próbkę zostały przechowywane w ciekłym azocie aż do momentu ponownego wszczepienia (grupy D2, D7, D30) lub analizy histologicznej (grupa porównawcza D0).

Bezpośrednio przed planowaną operacją wszczepienia tkanki jajniki zostały ogrzane, zgodnie z protokołem opisanym przez Youm i wsp.

Po wyciągnięciu probówek z ciekłego azotu zostały one natychmiast zanurzone w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Następnie tkanka została ostrożnie wyjęta z probówki kriogenicznej i zanurzona w serii roztworów sacharozy o stężeniach 1M, 0,5M, 0,25M (roztwór bazowy stanowił DPBS) i temperaturze pokojowej. Ostatni etap protokołu pozostał bez zmian dla jajników z grupy kontrolnej (lewych), natomiast jajniki z grupy badanej (prawe) zostały zanurzone w roztworze DPBS z dodatkiem osocza bogatopłytkowego w stosunku 1:3 (0,5ml DPBS, 1,5ml osocza). Następnie tkanki zostały poddane inkubacji w temperaturze 38°C w odpowiednich dla grupy pożywkach przez okres 15 minut bezpośrednio przed wszczepieniem.

#### 4.5 *Przygotowanie preparatów do oceny histologicznej*

Tkanki pobrane *post mortem* od zwierząt zostały zanurzone w 10% buforowanej formalinie (Sigma; Niemcy), a po upływie 24 godzin przełożone do 70% alkoholu etylowego (POCH; Polska) aż do kontynuacji procedury procesowania tkanek, zgodnie z zaleconym protokołem dla tkanek jajnika szczura (Picut *et al.*, 2015). Tkanki zostały utrwalone poprzez płukanie we wzrastającym gradiencie stężeń alkoholu etylowego od 70 do 99,9%, przesycenie ksylenem, a następnie płynną parafiną w temperaturze 70°C przy użyciu automatycznego procesora tkankowego (Leica TP 1020, Leica, Niemcy). Następnie tkanki

zostały zatopione w bloczkach parafinowych przy użyciu modułowego systemu do zatapiania w parafinie.

Tkanki zatopione w bloczkach parafinowych zostały poddane standardowej obróbce histologicznej, a następnie pocięte na 3µm skrawki pomocą mikrotomu i przełożone na szkiełka pokryte silanem. Próbkowanie z każdej tkanki jajnika odbywało się zgodnie ze wskazaniami dla jajników szczurzych (Picut *et al.*, 2015).

Skrawki do oceny histologicznej zostały zabarwione metodą trójbarwną Massona, zgodnie z protokołem (Utah Histology - Surgical Pathology, 2017). Próbki na szkiełkach zostały odparafinowane, zanurzone w rozgrzany do 54-64°C preparacie Bouina i inkubowane przez 60 min. Po wystudzeniu preparatu przez 10 min w temperaturze pokojowej szkiełka zostały przepłukane wodą destylowaną. Następnie próbki zostały zanurzone przez 5 minut w żelazowej hematoksylinie typu Weigerta i przepłukane wodą destylowaną. Kolejnym etapem barwienia było zanurzenie w mieszaninie szkarłatu Biebricha i kwaśnej fuksyny na 15 minut. Po opłukaniu w wodzie destylowanej szkiełka zostały przeniesione do kuwety z błękitem anilinowym na 5-10 minut. Po opłukaniu w wodzie destylowanej szkiełka zostały przeniesione do roztworu kwasu octowego na 3-5 min, po czym wysuszone na powietrzu, zalane odczynnikami do utrwalenia preparatów DPX (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone) i przykryte szkiełkiem nakrywkowym.

Do barwienia zostały wykorzystane odczynniki firmy Sigma Aldrich (Stany Zjednoczone) oraz automatyczna barwiarka histologiczna (Leica ST5020; Leica; Niemcy). Wszystkie analizy histologiczne zostały wykonane za pomocą mikroskopu świetlnego (Olympus BX43; Olympus; Polska), wraz z programem ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Mental Health; Stany Zjednoczone)

#### 4.6 *Liczenie pęcherzyków*

W ocenie rodzaju pęcherzyków posługiwano się następującą kategoryzacją:

- 1) Pęcherzyki pierwotne: pojedyncza warstwa płaskich komórek ziarnistych ściśle otaczająca oocyt
- 2) Pęcherzyki pierwszorzędowe: pojedyncza warstwa komórek sześciennych warstwy ziarnistej pęcherzyka ściśle otaczających pęcherzyk
- 3) Pęcherzyki drugorzędowe (wzrastające): dwie lub więcej warstw sześciennych komórek warstwy ziarnistej

- 4) Pęcherzyki antralne: wiele warstw komórek warstwy ziarnistej z widoczną przestrzenią (jamą pęcherzyka), ok 1mm średnicy (Lawson and Pedersen, 1987; Picut *et al.*, 2015)

W celu dokonania liczenia pęcherzyków przygotowano próbki histologiczne tkanek, zgodnie z zaleceniami dla jajnika szczura (Picut *et al.*, 2015). Błoczki parafinowe przytrzymowano i przygotowano do cięcia użyciem mikrotomu. Następnie, po napotkaniu tkanki odrzucono pierwsze 200-500  $\mu\text{m}$  i rozpoczęto próbkowanie co ok 50 $\mu\text{m}$ . Do oceny liczby pęcherzyków każdego jajnika użyto 5 skrawków. Średni obszar powierzchni badanych tkanek wynosił  $15500\mu\text{m}^2 \pm 200 \mu\text{m}$ .

W celu obliczenia liczby pęcherzyków pierwotnych i pierwszorzędowych zastosowano adaptację metody optycznej opisanej przez Myers i wsp (2004).

Każdy skrawek został optycznie podzielony na 15 obszarów o średniej powierzchni  $1033 \pm 50\mu\text{m}^2$  oglądanych pod obiektywem x60. Liczba pęcherzyków z każdego obszaru była sumowana w celu otrzymania liczby pęcherzyków/skrawek, a liczby z poszczególnych skrawków (n=5) zostały dodane do siebie i podstawione pod wzór zgodnie ze wskazaniem Myers i wsp.

Pęcherzyki drugorzędowe (wzrastające) i antralne były liczone jedynie, jeśli w miejscu wyznaczenia obecności pęcherzyka, na jednym z pięciu z preparatów danego jajnika widoczny był oocyt, lub jego zarys (Picut *et al.*, 2015). Liczba pęcherzyków drugorzędowych (wzrastających) i antralnych jest sumą pęcherzyków z wszystkich sekcji danej próbki.

Liczeniu podlegały jedynie pęcherzyki z widoczną komórką jajową otoczoną warstwą komórek ziarnistych, które spełniały kryteria pozwalające je uznać za morfologicznie prawidłowe (Lawson and Pedersen, 1987; Picut *et al.*, 2015). Pęcherzyki uważano za zdegenerowane, jeśli miały skurczone oocyty i/lub ciała pyknotyczne w komórkach ziarnistych.

#### 4.7 Wyznaczanie obszarów włóknistych w tkance

Obszary zwłóknienia (fibrotyczne) oceniane były na preparatach histologicznych barwionych metodą trójbarwną Massona. Technika trójbarwna Massona pozwala na wykrycie włókien kolagenowych, które pod wpływem barwnika błękitu anilinowego przybierają niebieski kolor (Utah Histology - Surgical Pathology, 2017). Preparaty

oceniano pod mikroskopem świetlnym (Olympus BX43; Olympus; Polska), pod obiektywem x4, a pomocą oprogramowania ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Mental Health; Stany Zjednoczone) zaznaczano i obliczono średni obszar tkanki zawierającej duże skupisko włókien kolagenowych (niebieskiej). Następnie obliczano relatywny procent powierzchni zajęty przez obszary zawierające włókna kolagenowe.

#### 4.8 *Barwienie immunohistochemiczne i wyznaczenie obecności naczyń*

Ocenę gęstości naczyń przeprowadzono za pomocą barwienia immunohistochemicznego z oznaczeniem swoistego markera powierzchni komórek dla nowo powstałych naczyń krwionośnych: CD31 (ang.: *cluster of differentiation molecule 31*), znanego również jako PECAM-1 (ang.: *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*; płytkowa cząsteczka adhezji komórek śródbłonna-1), stosowanego systemowo w badaniach nad procesem neowaskularyzacji w przeszczepach jajników (Gao *et al.* 2013; Park, Sorenson, and Sheibani 2015; Kong *et al.* 2017a; Laronda *et al.* 2017).

W celu określenia obecności białka CD-31 w badanym materiale tkankowym zastosowano mysie przeciwciało monoklonalne przeciwko CD-31 (TLD-3A12; Invitrogen, Stany Zjednoczone).

Procedurę pośredniego barwienia immunohistochemicznego z zastosowaniem powyższych przeciwciał przeprowadzono zgodnie ze standardowym protokołem.

Po deparafinizacji szkiełka zostały inkubowane w roztworze PBS z 1% trypsyny przez 30 min w 37°C w celu odkrywania epitopów antygenów. Następnie szkiełka zostały przepłukane wodą destylowaną i zanurzone w roztworze PBS na 30 min w temperaturze pokojowej. Kolejnym etapem protokołu była neutralizacja endogennej peroksydazy przez inkubację w 0,3% nadtlenku wodoru przez 10 min w temperaturze pokojowej. Po przepłukaniu preparaty zostały poddane inkubacji z 5% albuminy surowicy bydlęcej (ang. *bovine serum albumin*; BSA) w celu zmniejszenia tła barwienia. Następnie szkiełka zostały przeniesione na płaski stelaż w celu inkubacji z przeciwciałem pierwotnym. Po oczyszczeniu z nadmiaru płynu preparat został pokryty ok 100µl roztworu zawierającego przeciwciała pierwszorzędowe i inkubowany przez 60min w 37°C w komorze o zwiększonej wilgotności powietrza. Po zakończonej inkubacji szkiełka zostały opłukane roztworem PBS i poddane inkubacji z przeciwciałami drugorzędowymi w tych samych warunkach. Po zakończeniu inkubacji preparaty zostały opłukane PBS i poddane ekspozycji z chromogenem DAB (3,3'- diaminobenzodyną; Sigma Aldrich; Stany Zjednoczone) w temperaturze pokojowej przez 2,5 minuty. Następnie zostało przeprowadzone barwienie dodatkowe z udziałem hematoksyliny Mayera (Sigma Aldrich; Stany Zjednoczone) poprzez potrójne zanurzenie w barwniku i opłukanie w wodzie destylowanej. Po wyschnięciu preparaty zostały utrwalone DPX (Sigma Aldrich; Stany Zjednoczone) i przykryte szkiełkiem nakrywkowym.

Ekspresja białka CD31 odznacza się odczynem błonowym. Preparaty były oceniane pod mikroskopem świetlnym (Olympus BX43; Olympus; Polska), wraz z programem ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Mental Health; Stany Zjednoczone) pod obiektywem x60. Kontrolę pozytywną stanowiły wycinki z płuca szczurów szczepu WAG. Liczenie odbywało się w 5 powtórzeniach, na szkiełkach zawierających preparaty oddzielone o średnio 50µm. Każda tkanka została optycznie podzielona na 15 obszarów, a sygnały ze wszystkich obszarów były sumowane. Ocenie podlegała zarówno ekspresja jak i jej intensywność. Pojedyncze sygnały liczone były jako +1, natomiast sygnały tworzące naczynia (w postaci okręgów) liczone były jako +2. Surowe wyniki z poszczególnych powtórzeń zostały uśrednione i przedstawione jako gęstość naczyń dla danego jajnika.

#### 4.9 *Analiza stopnia nasilenia apoptozy komórek tkanki jajnika (TUNEL)*

Analiza apoptozy została przeprowadzona z użyciem zestawu Click-iT™ Plus TUNEL Assay Kits for In Situ Apoptosis Detection firmy Invitrogen™ (Wielka Brytania).

Szkiełka po odparafinowaniu zostały zanurzone w roztworze formaliny 4% na 15 minut i inkubowane w 37°C, a następnie opłukane przez dwukrotne zanurzenie w roztworze PBS na około 5 min. Osuszone szkiełka zostały przeniesione na płaski stelaż. Tkanki zostały pokryte roztworem proteiny K i inkubowane przez 20 min w komorze o zwiększonej wilgotności powietrza, po czym opłukane roztworem PBS i zanurzone ponownie w roztworze 4% formaliny na 5 minut (w 37°C). Po inkubacji próbki zostały zanurzone w roztworze PBS, a następnie opłukane dejonizowaną wodą. Następnie próbki zostały zalane roztworem zawierającym DNazę wraz z buforem reakcji i inkubowane przez 30 min w temperaturze pokojowej i opłukane w dejonizowanej wodzie. W kolejnym kroku szkiełka zostały przykryte 100 µl buforu reakcji TdT (odczynnik „A”) i inkubowane przez 10 minut w 37°C. Roztwór został odciągnięty za pomocą sterylnej chusteczki, a tkanka została przykryta 50 µl mikstury reakcyjnej TdT przygotowanej zgodnie z zaleceniem producenta i inkubowana przez 60 min w temperaturze 37°C w komorze o podwyższonej wilgotności powietrza. Po zakończonej reakcji szkiełka zostały opłukane dejonizowaną wodą, a następnie zanurzone w roztworze PBS z dodatkiem 3% BSA i 0,1% Triton™ x-100 przez 5 minut w temperaturze pokojowej. W następnym etapie protokołu został

przygotowana mieszanina reakcyjna Click-iT™ Plus TUNEL, zgodnie z zaleceniami producenta, poprzez rozcieńczenie 1:10 z wodą dejonizowaną i pomieszanie z użyciem wytrząsarki nablutowej typu vortex. Następny etap protokołu wykonywany był przy minimalnym narażeniu próbki na światło. Położone na płaskim stole szkiełka zostały oczyszczone z roztworu PBS i pokryte 50  $\mu$ l mieszaniną reakcyjną Click-iT™ Plus TUNEL, po czym pozostawione na 30 min w komorze o zwiększonej wilgotności powietrza i temperaturze 37°C. Po upływie czasu inkubacji szkiełka zostały zanurzone w roztworze PBS z 3% BSA i opłukane czystym PBS. Następnie zostało przeprowadzone barwienie dodatkowe z udziałem DAPI (DAPI Solution; Thermo Scientific™) i aktywny (ActinRed™ 555 ReadyProbes™ Reagent; Thermo Scientific™) poprzez kolejne inkubacje przez 15 minut w temperaturze 37°C w komorze o zwiększonej wilgotności powietrza. Po zakończonym barwieniu szkiełka zostały opłukane roztworem PBS, osuszone, utrwalone DPX (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone) i przykryte szkiełkiem nakrywkowym.

Preparaty były oceniane z wykorzystaniem konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego (Leica Sp8, Leica, Niemcy). Przy użyciu naświetlania o długości fali w zakresie od 450 do 500nm dla TUNEL i ~360 do 460nm dla DAPI i ~540 do 565nm dla ActinRed. Badanie zostało wykonane w 2 powtórzeniach na dwóch oddzielonych od siebie o ok 250 $\mu$ m preparatach o grubości 3 $\mu$ m pochodzących z jednej tkanki. Ocena wykonywana była poprzez liczenie jąder komórkowych zabarwionych odczynnikiem TUNEL (zielona fluorescencja) i porównanie jej z liczbą jąder komórkowych w których nie doszło do fragmentacji zabarwionych DAPI (niebieska fluorescencja). Włókna aktynowe zostały wybarwione aktyną dla uwidocznienia struktury tkanki. Wyniki zostały uśrednione i przedstawione jako odsetek komórek o jądrach o cechach apoptotycznych występujący w danej tkance.

4.10 *Analiza ekspresji mRNA w tkance jajnika: hormonu atymulerowskiego (AMH), receptora dla hormonu antymulerowskiego (AMHR) receptora progesteronowego (PGR) oraz receptorów estrogenowych typu alpha (ESR $\alpha$ ) i beta (ESR $\beta$ ), a także czynnika martwicy nowotworów alpha (TNF $\alpha$ ).*

Fragmety tkanki jajników uzyskanych *post mortem* ze zwierząt zostały zamrożone metodą *snap freezing* przez zanurzenie w ciekłym azocie i pozostawione do czasu izolacji całkowitego RNA.

Do procedury izolacji RNA z tkanek wykorzystano zestaw High Pure RNA Tissue (Roche, Szwajcaria).

Tkanki zostały poddane homogenizacji z użyciem kulek ceramicznych Lysing Matrix-D (MP Biomedicals, Irvine, Stany Zjednoczone) i homogenizatora Precellys Evolution (Bertin Technologies SAS, Francja). Tkanki zostały poddane homogenizacji zanurzone 400 $\mu$ l buforu do lizy i poddane działaniu homogenizatora z prędkością 6800 rpm przez 20s w 4°C. Następnie próbki zostały odwirowane i zmieszane z wodą wolną od RNAz. Do próbek została dodana proteinaza K (ThermoFisher, Stany Zjednoczone), a próbki zostały poddane inkubacji w 55°C przez 45 minut. Po odwirowaniu supernatant został przeniesiony do nowej próbki i zmieszany w stosunku 1:1 z 100% etanolem klasy laboratoryjnej.

Po ręcznym wymieszaniu próbka została poddana wirowaniu przez 30 sekund i oczyszczeniu, zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Aby ustabilizować otrzymane całkowite RNA użyto po 100 $\mu$ l buforowanej DNazy (DNase buffer and DNase; Invitrogen, Stany Zjednoczone).

Jakość i stężenie wyizolowanego RNA zostało zbadane przez pomiar gęstości optycznej przy długości fali 260nm z wykorzystaniem spektrofotometru kropelkowego (Ds.-11; DeNovovix, Stany Zjednoczone).

W kolejnych etapach badań molekularnych wykorzystano 100ng RNA zgodnie z protokołem. Do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji i przygotowania reakcji real-time PCR użyto zestawu TaqMan<sup>TM</sup> RNA-to-CT 1-Step Kit (ThermoFisher, Stany Zjednoczone), zgodnie z zaleceniami producenta. Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy RT PCR została przeprowadzona z użyciem automatycznego fluorymetru Quant Studio<sup>TM</sup> Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Stany Zjednoczone). Zostało przeprowadzonych 40 cyklu reakcji RT-PCR w następujących warunkach: 48°C



przez 15 min (hold stage: odwrotna transkrypcja); 95°C przez 10min (*hold stage*: aktywacja enzymu); 95°C przez 30s (denaturacja); 60°C przez 1 min (*anneal/extend*: elongacja łańcucha).

W reakcji qPCR zostały użyte geny referencyjne GAPDH (Rn01462661\_g1) oraz HPRT (Mm01318743\_m1), a wyniki zostały przedstawione jako relatywny do genów referencyjnych poziom ekspresji zgodnie z metodą  $\Delta\Delta CT$ .

W badaniu zostały wykorzystane sondy TaqMan (Thermofisher Scientific, Stany Zjednoczone):

AMHR2 (Rn00513843\_m1); AMH (Rn00563731\_g1); TNF (Rn99999017\_m1); ESR1 (Rn01640372\_m1); ESR2 (Rn00562610\_m1); PGR (Rn01448227\_m1).

#### 4.11 *Analiza statystyczna*

Analiza statystyczna oraz przedstawienia graficzne wyników zostały przeprowadzone z pomocą programów Microsoft Excel (Microsoft 365, Microsoft, Stany Zjednoczone) oraz GraphPad Prism 9. (Dotmatics, GraphPad, Stany Zjednoczone).

Normalność rozkładu zmiennych oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilko. Stwierdzono, że grupy D0, D2 i D7 reprezentują dane zgodne z rozkładem normalnym, natomiast grupa D30 nie spełnia wymagań homogeniczności grupy. Wszystkie testy zostały wykonane z zastosowaniem przedziału ufności na poziomie 95%.

Analizę liczebności pęcherzyków danych typów względem przynależności do grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym i kontrolnej w porównaniu do grupy D0 wykonano z pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) wraz z testem porównań wielokrotnych Tukeya i Sidaka.

Porównanie par tkanek jajników tego samego zwierzęcia pod względem liczby i rodzaju pęcherzyków w zależności od przynależności do grup traktowanych osoczem bogatopłytkowym i grup kontrolnych wykonano z pomocą sparowanego testu T (*paired T-test*) dla prób zależnych.

Porównania obszarów fibrotycznych i nekrotycznych w tkankach dokonano z pomocą porównań wielokrotnych testem Sidaka przy zagnieżdżonej jednoczynnikowej analizie wariancji (*nested 1-way ANOVA*).

Porównania odsetka jąder apoptotycznych w tkankach jajników w zależności od grupy wykonano testem ANOVA wg. Brown-Forsythe wraz z wielokrotnymi porównaniami według Dunnett'a.

Analizę statystyczną liczby i gęstości naczyń w tkankach jajnika w zależności od grupy wykonano z pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji wraz z porównaniami wielokrotnymi wg Tukey'a.

Do analizy korelacji występowania naczyń i pęcherzyków danego typu w tkankach jajników poddanych przeszczepowi wykorzystano test korelacji wg. Pearsona.

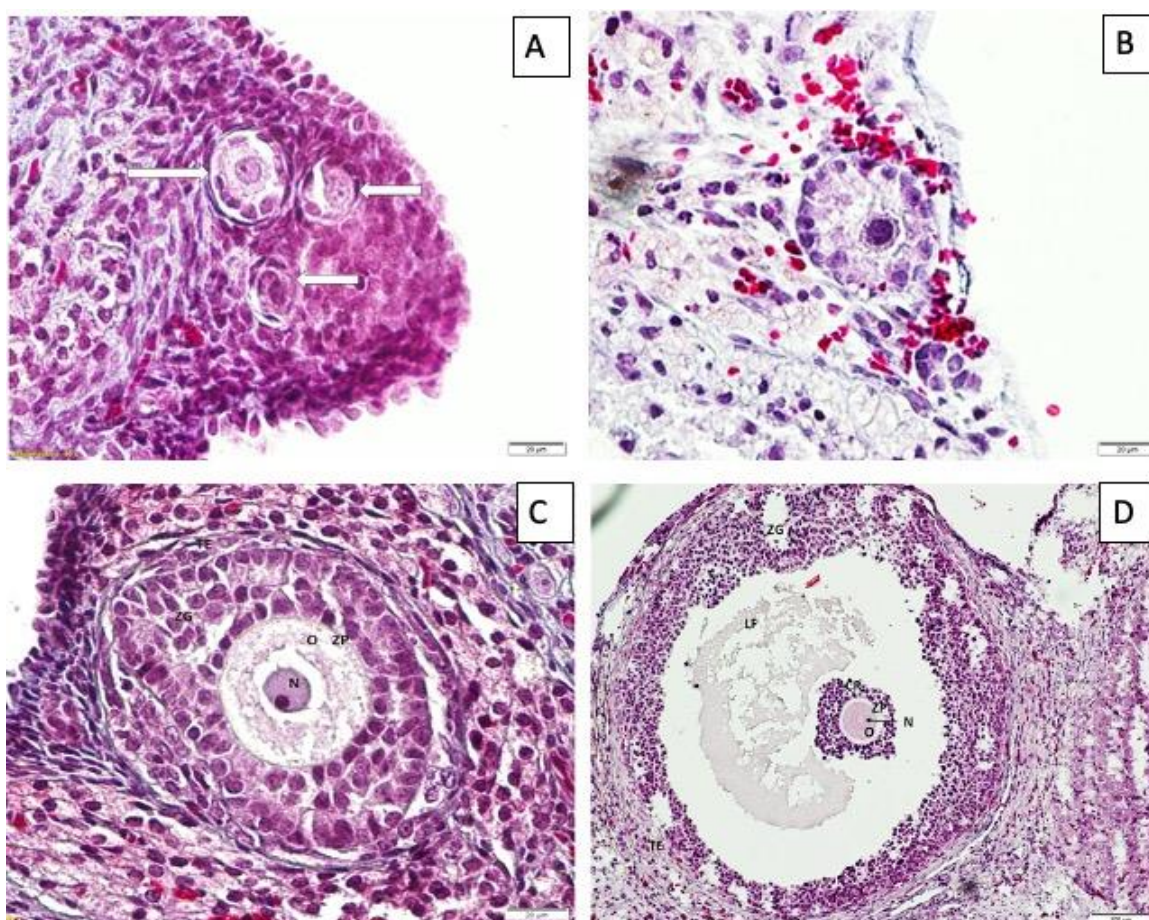
Analizy statystyczne wyników ekspresji mRNA otrzymanych z wykorzystaniem metody  $\Delta\Delta\text{Ct}$  wykonano z pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji wraz z porównaniami wielokrotnymi Sidak'a.

## 5. Wyniki i analiza statystyczna

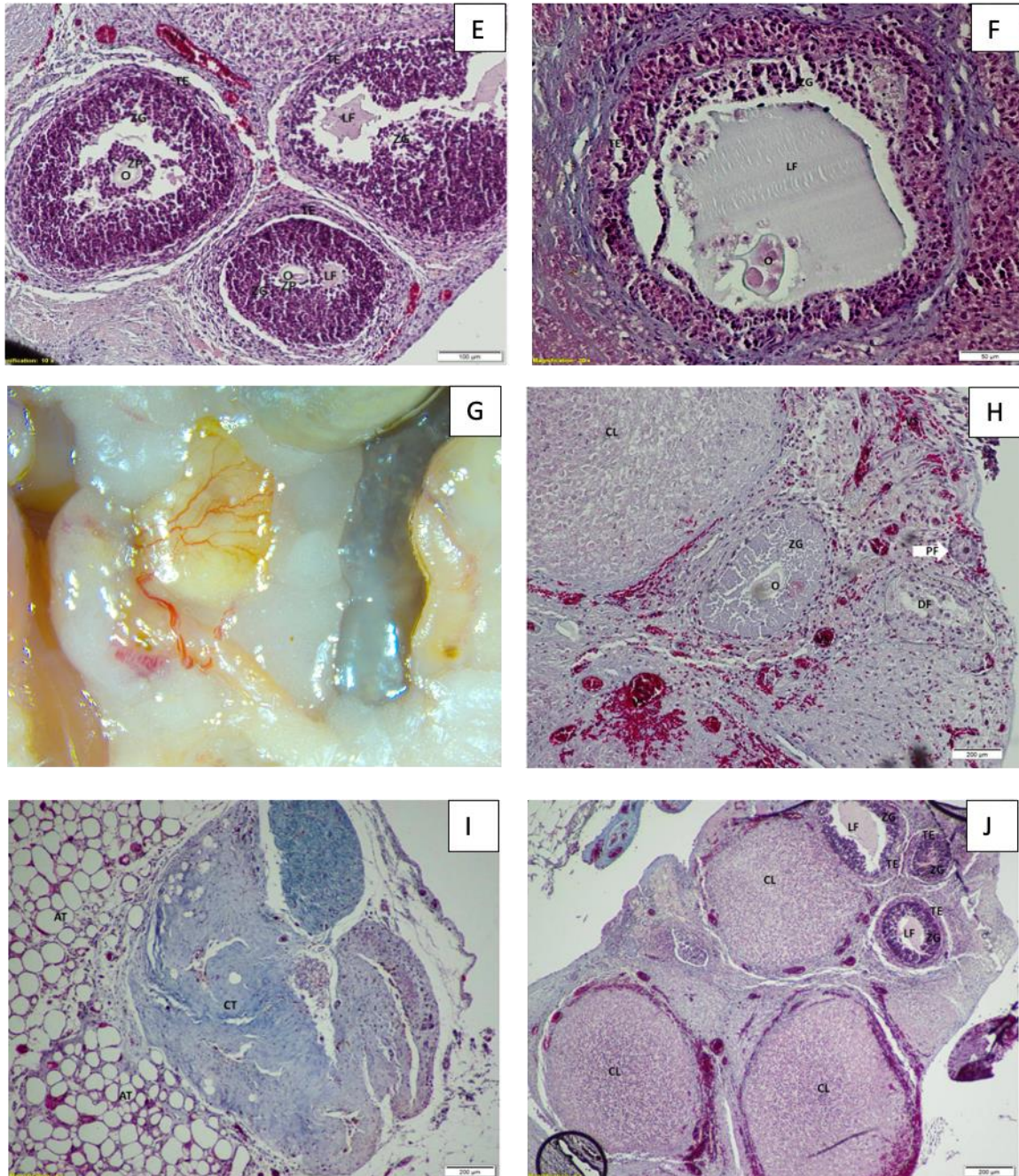
### 5.1 Analiza histologiczna tkanki jajnika

#### 5.1.1 Morfologia pęcherzyków jajnikowych po przeszczepie

Analiza histologiczna pozwoliła na ocenę preparatów i klasyfikację pęcherzyków różnych stadiów rozwoju: pęcherzyki pierwotne (Fotografia 1 A), pęcherzyki pierwszorzędowe (Fotografia 1 B), pęcherzyki drugorzędowe /wzrastające (Fotografia 1 C; Fotografia 2 E) oraz pęcherzyki antralne (Fotografia 1 D). Podczas analizy histologicznej zaobserwowano liczne pęcherzyki wykazujące cechy atrezji (Fotografia 2 F, H), a także przerastanie tkanki włóknami kolagenowymi (Fotografia 2 I). Jajniki uzyskane z grupy D30 (po 30 dniach od przeszczepu), w części przypadków (3 szczury) wykazywały się całkowitym wrośnięciem w otaczającą tkankę i otoczone były widocznymi makroskopowo naczyniami (Fotografia 2G). Analiza mikroskopowa tkanek pochodzących z wyżej wymienionych osobników wykazała prawidłową strukturę tkanki jajnika (Fotografia 2 J)



Fotografia 1. **Pęcherzyki jajnikowe w poszczególnych stadiach rozwoju.** A – pęcherzyk pierwotny, B – pęcherzyk pierwszorzędowy, C – pęcherzyk drugorzędowy/wzrastający, D – pęcherzyk antralny. Zdjęcia A, B i C wykonano pod obiektywem suchym, przy powiększeniu 40x. Zdjęcie D wykonano pod obiektywem suchym przy powiększeniu 10x. Skala porównawcza podana w prawym dolnym rogu każdego zdjęcia. (Opisy skrótów: N – nucleus/jądro komórkowe; ZP – zona pellucida/osłonka przejrzysta; ZG – zona granulosa/komórki warstwy ziarnistej; TE- theca externa/komórki osłonki pęcherzyka; O - ovum/komórka jajowa; LF- liquor folliculi/ płyn pęcherzykowy). Wszystkie fotografie zostały wykonane przez autorkę dysertacji.

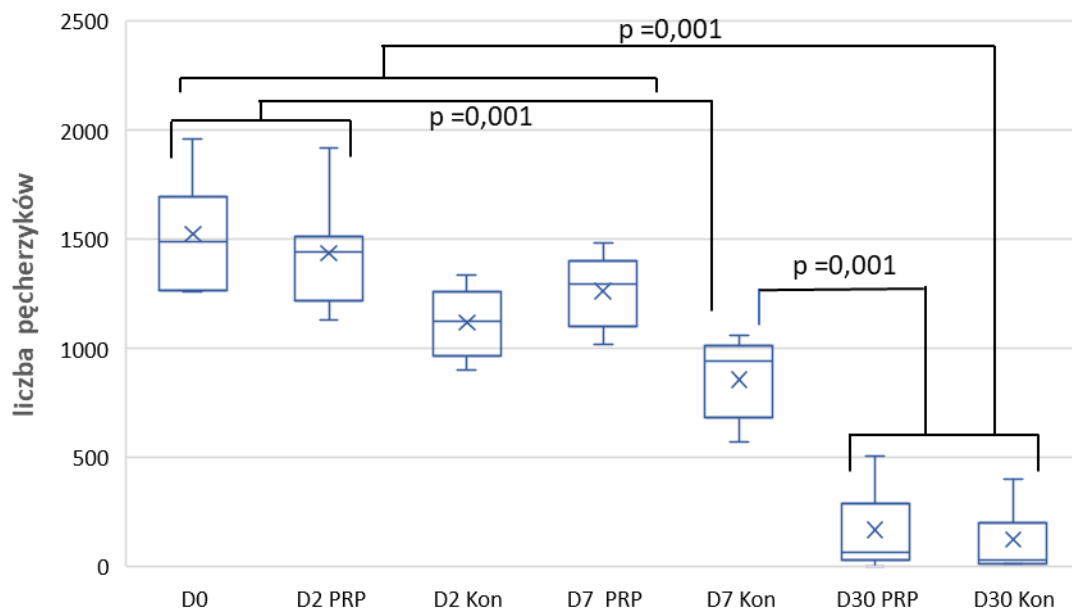


Fotografia 2. **Tkanka jajnika. Analiza makroskopowa i histologiczna.** E – duże pęcherzyki wzrastające

*i antralne; F – pęcherzyk o cechach postępującej atrezji z nekrotycznym oocytem. G – przeszczepiona tkanka jajnika z grupy D30 (po 30 dniach) z gęsto występującymi naczyniami krwionośnymi; H – atrezyjne pęcherzyki w różnych stadiach rozwoju; I- tkanka jajnika przzerośnięta tkanką włóknistą i tkanką tłuszczową; J- zachowana struktura tkanki jajnika po 30 dniach od przeszczepu. Zdjęcie E wykonano pod obiektywem suchym przy 10x powiększeniu. Zdjęcie F wykonano pod obiektywem suchym przy 20x powiększeniu; zdjęcie G wykonano techniką focus stacking za pomocą mikroskopu Leica M205FA.; zdjęcia H, I, J wykonano przy 4x powiększeniu; (opisy skrótów: PF – primordial follicle/ pęcherzyk pierwotny; CL- corpus luteum/ ciałko żółte; DF -degenerated follicle/ pęcherzyk atrezyjny; ZG – zona granulosa/ komórki warstwy ziarnistej; O- ovum/ komórka jajowa; VS – vasa sanguinea/ naczynia krwionośne; CT – connective tissue / tkanka włóknista; AT- adipose tissue/ tkanka tłuszczowa; LF- liquor folliculi/ płyn pęcherzykowy; TE- theca externa/komórki osłonki pęcherzyka). Wszystkie fotografie zostały wykonane przez autorkę dysertacji.*

## 5.2 Analiza statystyczna: Ogólna liczba pęcherzyków

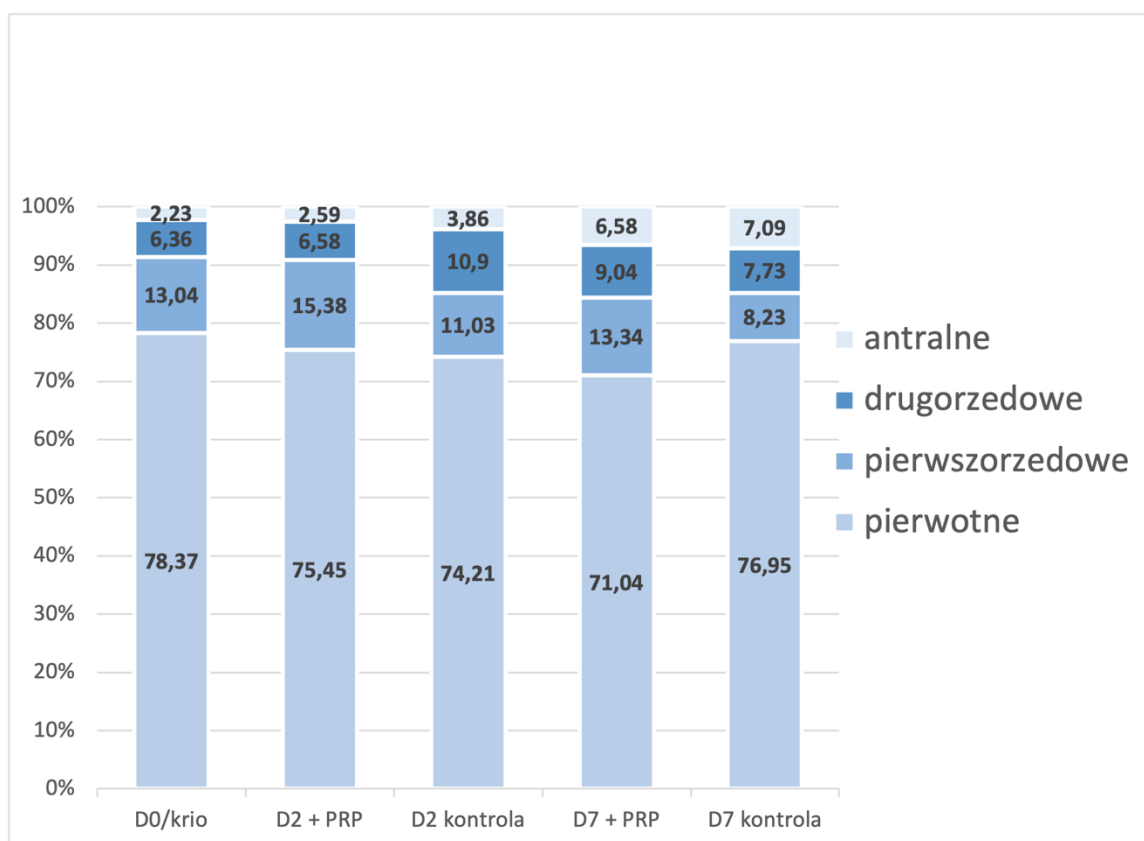
Zaprezentowane na Rycinie 5 wyniki badań wskazują na bardzo duże zróżnicowanie liczby pęcherzyków w tkankach jajników w analizowanych grupach. Odnotowano istotne różnice ( $p < 0,001$ ) między grupami D0, D2+PRP, D2 Kontrola, D7+PRP a grupami D7 Kontrola, D30 PRP i D30 Kontrola.



**Rycina 5. Porównanie ogólnej liczby pęcherzyków stwierdzonych w tkankach jajników szczurów we wszystkich badanych grupach. Oznaczenia grup: D0–grupa porównawcza; D2+PRP- grupa po 2 dniach od wszczepienia tkanki traktowanej osoczem bogatopłytkowym; D2 Kon- grupa badana po 2 dniach od wszczepienia tkanki, próba kontrolna; D7 – grupa badana po 7 dniach od wszczepienia tkanki traktowanej osoczem bogatopłytkowym; D7 Kon – grupa badana po 7 dniach od wszczepienia tkanki, grupa kontrolna. Wartości istotne statystycznie  $p < 0,001$ .**

### 5.2.1 Ogólna liczba pęcherzyków poszczególnych stadiów dojrzałości w tkankach jajników pochodzących z grup krótko, średnio i długoterminowej w porównaniu do grupy porównawczej D0.

W badanych grupach odsetek pęcherzyków stanowiących rezerwę jajnikową, tj. pęcherzyków pierwotnych i pierwszorzędowych był znacznie większy niż odsetek pęcherzyków w pozostałych stadiach rozwoju (Ryc. 6). Na prezentowanej rycinie widoczna jest skala zmniejszania się liczby pęcherzyków w zależności od czasu jaki upłynął od przeszczepu, a także w zależności od przynależności do grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym lub kontrolnej. Wyniki grupy D30 nie zostały przedstawione na wykresie ze względu na niespełnienie warunków homogeniczności grupy.

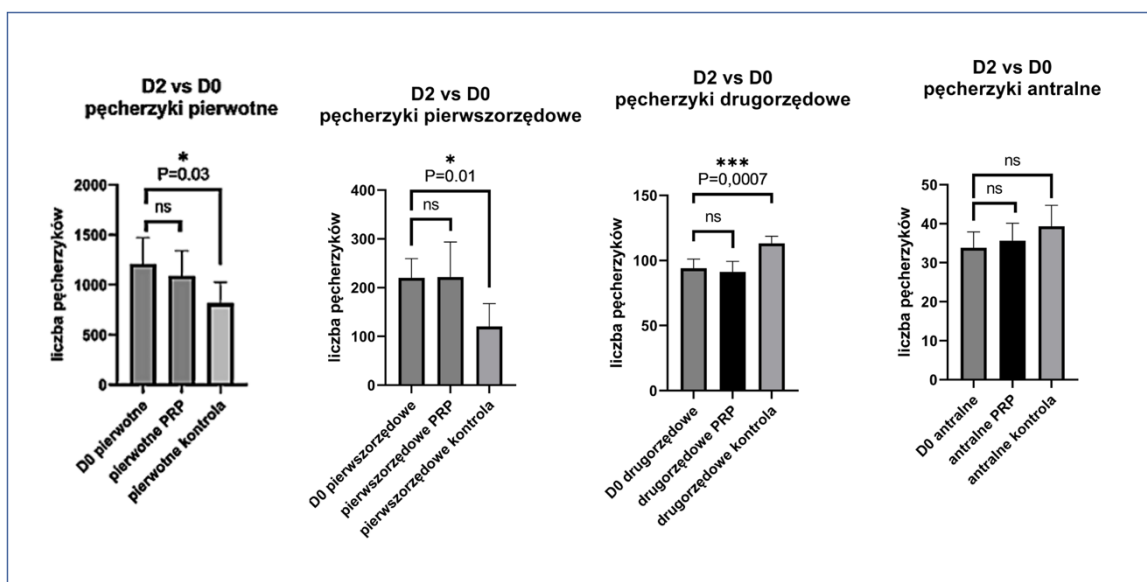


Rycina 6. Procentowy udział pęcherzyków poszczególnych stadiów rozwojowych w tkankach jajników w analizowanych grup.

### 5.3 Analiza liczebności pęcherzyków danych typów względem przynależności do grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym i kontrolnej w porównaniu do grupy D0.

### 5.3.1 Grupa krótkoterminowa (po dwóch dniach od przeszczepu)

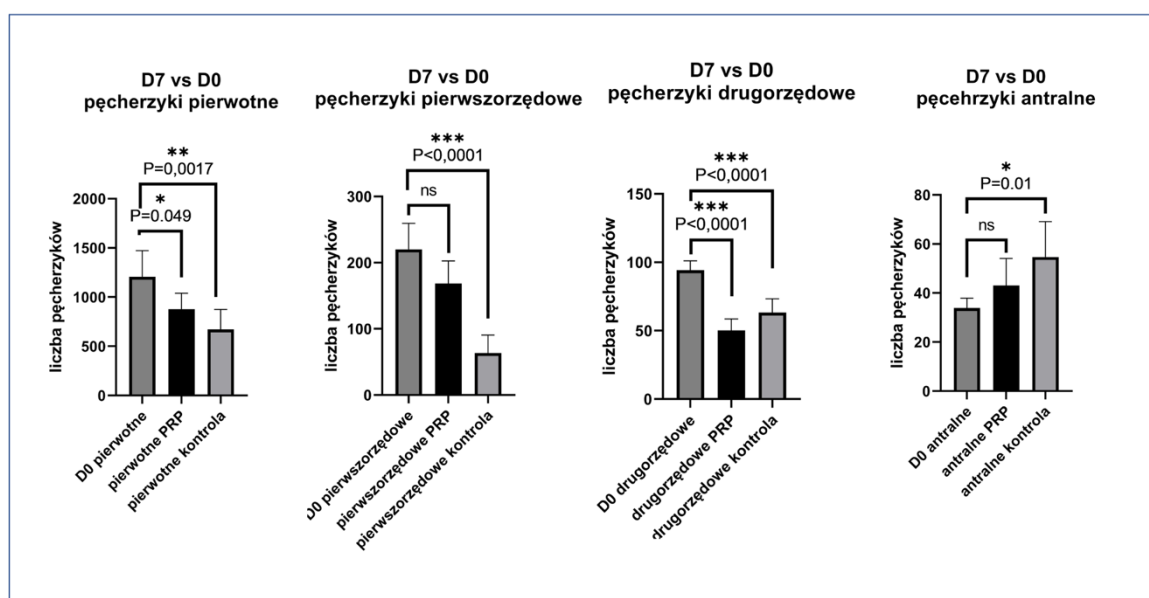
Wykazano statystycznie istotną różnicę pomiędzy średnią liczebnością pęcherzyków pierwotnych (Ryc. 7) w grupie D0 i grupie kontrolnej D2 ( $p < 0,03$ ) natomiast nie wykazano istotnej różnicy w liczbie pęcherzyków między grupą D0 i grupą PRP (traktowaną osoczem bogatopłytkowym). Podobną zależność obserwowano w odniesieniu do pęcherzyków pierwszorzędowych (D0 – D2 kontrola,  $p = 0,01$ ). W przypadku pęcherzyków drugorzędowych istotnie statystycznie wyższą średnią ich liczbę notowano w grupie kontrolnej ( $p = 0,0007$ ) w porównaniu do pozostałych grup. Podobne wyniki uzyskano analizując liczbę pęcherzyków antralnych, jednak nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą D0 a grupami D2.



Rycina 7. Średnia liczba różnych typów pęcherzyków w grupie porównawczej (D0) oraz w grupie traktowanej osoczem bogatopłytkowym (PRP) i grupie kontrolnej w drugim dniu od wykonania przeszczepu jajnika. Wartości  $p$  podane zgodnie z porównaniem, wartości nieistotne statystycznie oznaczone literami ns -not significant jeśli  $p \geq 0,05$ .

### 5.3.2 Grupa średnioterminowa (po siedmiu dniach od przeszczepu)

Średnia liczba pęcherzyków pierwotnych (Ryc. 8) w grupie D0 była istotnie statystycznie niższa niż w grupie traktowanej osoczem ( $p=0,049$ ) oraz w grupie kontrolnej ( $p=0,0017$ ). W przypadku pęcherzyków pierwszorzędowych istotne zmniejszenie liczebności pęcherzyków odnotowano jedynie w grupie kontrolnej ( $p<0,001$ ). Istotny spadek liczby pęcherzyków drugorzędowych stwierdzono zarówno w grupie traktowanej osoczem bogatopłytkowym ( $p<0,0001$ ) jak i w grupie kontrolnej ( $p<0,0001$ ). Natomiast w przypadku pęcherzyków antralnych notowano odwrotną zależność, grupy D7 charakteryzowały się wyższą liczbą pęcherzyków niż grupa D0, przy czym w odniesieniu do grupy D7 kontrola była to różnica istotna statystycznie ( $p=0,01$ ).



Rycina 8. Średnia liczba różnych typów pęcherzyków w grupie porównawczej (D0) oraz w grupie traktowanej osoczem bogatopłytkowym (PRP) i grupie kontrolnej w siódmym dniu od wykonania przeszczepu jajnika. Wartości P podane zgodnie z porównaniem, ns - not significant jeśli  $p \geq 0,05$ .

### 5.3.3 Grupa długoterminowa (po trzydziestu dniach od przeszczepu)

Dane z grupy D30 nie zostały poddane analizie statystycznej ze względu na niespełnienie warunku homogenności grupy.

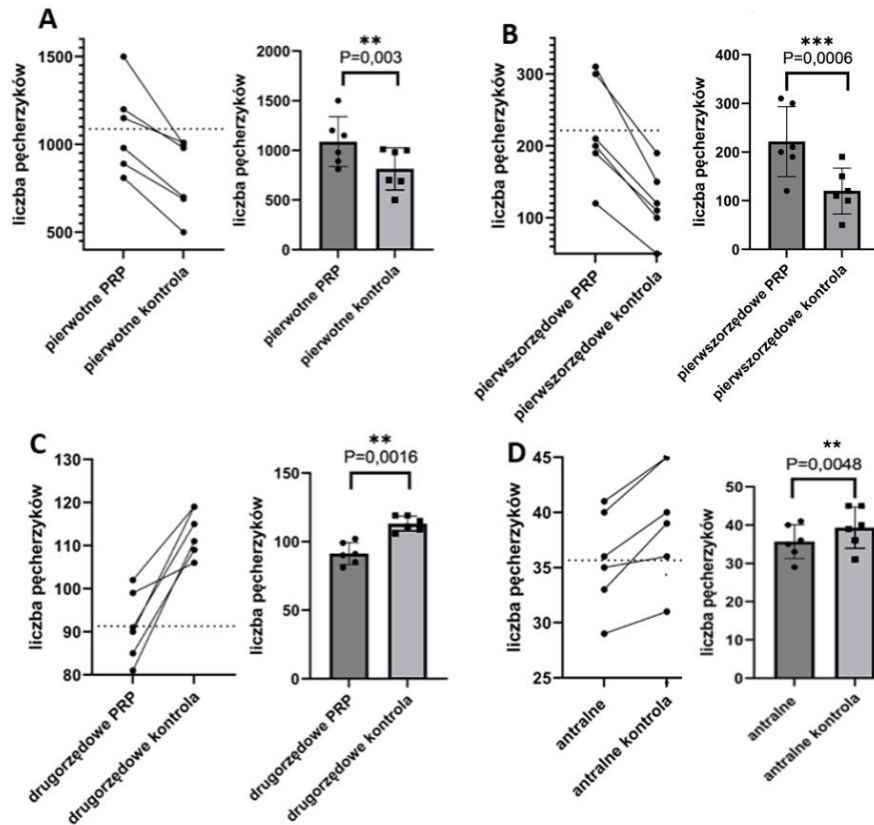


5.4 *Analiza statystyczna: Porównanie par tkanek jajników tego samego zwierzęcia pod względem liczby i rodzaju pęcherzyków w zależności od przynależności do grup traktowanych osoczem bogatopłytkowym i grup kontrolnych*

5.4.1 *Grupa krótkoterminowa (po dwóch dniach od przeszczepu)*

Porównanie tkanek jajników tych samych zwierząt, w modelu prawy/ traktowany osoczem bogatopłytkowym; lewy/kontrolny dla grupy krótkoterminowej D2 zaprezentowano na Rycinie 9.

Prezentowane wyniki wskazują na duże zróżnicowanie liczby pęcherzyków jajnikowych między badanymi grupami w zależności od stadium rozwoju pęcherzyka. Porównanie liczby pęcherzyków pierwotnych wskazuje na istotną statystycznie różnicę ( $p=0,003$ ) pomiędzy tkankami badaną i kontrolną, gdzie liczba pęcherzyków w tkankach kontrolnych była istotnie statystycznie mniejsza (Ryc. 9 A). Porównanie liczb pęcherzyków pierwszorzędowych wykazuje podobną tendencję ( $p=0,006$ ) (Ryc. 9 B). Porównanie liczb pęcherzyków wzrastających także wykazuje się wysoką istotnością statystyczną ( $p=0,0016$ ), jednakże wskazuje na odwrotną zależność i częstsze występowanie pęcherzyków drugorzędowych w tkankach kontrolnych niż w tkankach traktowanych osoczem bogatopłytkowym. Porównanie liczb pęcherzyków antralnych wykazuje podobną tendencję co pęcherzyki drugorzędowe, wskazując na większą liczbę pęcherzyków antralnych w tkankach kontrolnych niż w tkankach traktowanych osoczem bogatopłytkowym tych samych zwierząt ( $p=0,0048$ ). Porównanie liczb *corpora lutea* nie przyniosło istotnych statystycznie wyników.



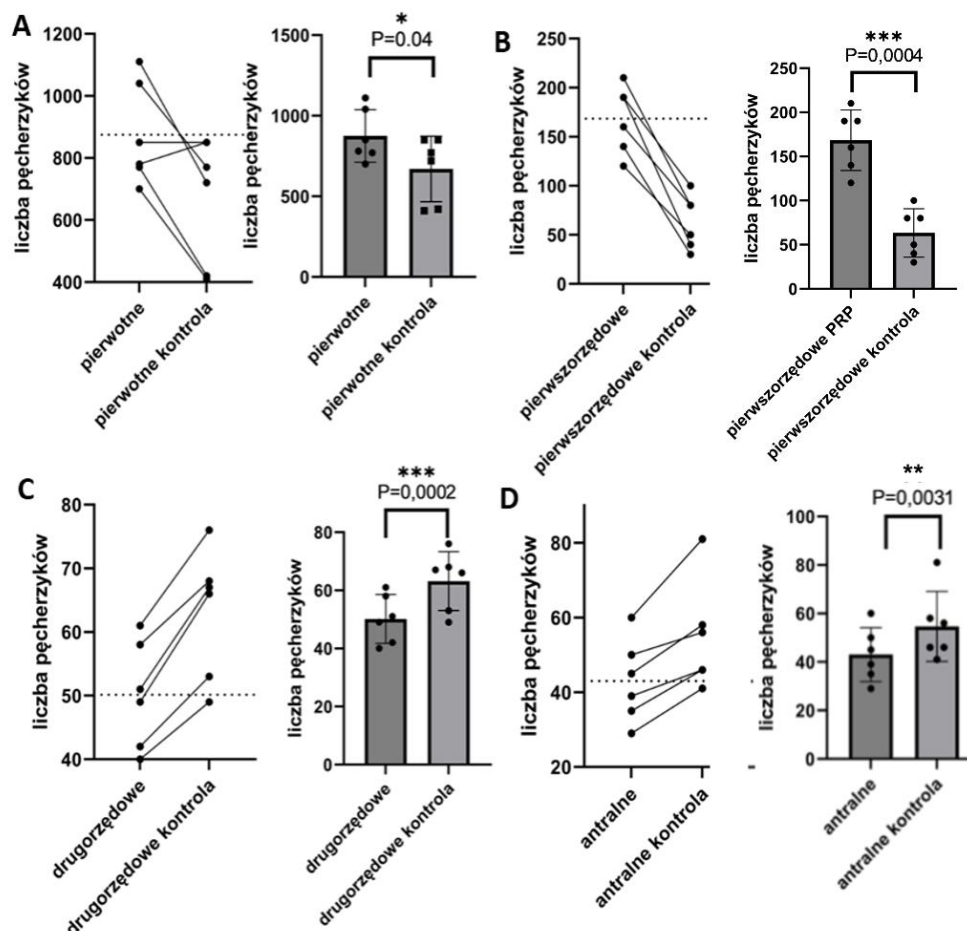
Rycina 9. Porównanie par tkanek jajników tego samego zwierzęcia pod względem liczby i rodzaju pęcherzyków w grupie krótkoterminowej D2. Wykres typu estimation plott (z lewej strony) pozwala prześledzić wyniki indywidualne dla każdego zwierzęcia i ocenić wpływ działania czynnika na daną tkankę w porównaniu do jej odpowiednika z grupy kontrolnej. Wykres kolumnowy (z prawej strony) ukazuje zbiorcze wyniki porównania grup i istotność statystyczną testu. Wartości p podane zgodnie z porównaniem, wartości nieistotne statystycznie oznaczone literami ns -not significant jeśli  $p \geq 0,05$ .

#### 5.4.2 Grupa średnioterminowa (po siedmiu dniach od przeszczepu)

Porównanie tkanek jajników tych samych zwierząt, w modelu prawy/ traktowany osoczem bogatopłytkowym; lewy/kontrolny dla grupy średnioterminowej D7 zobrazowano na rycinie 10. Po siedmiu dniach od przeszczepu, biorąc pod uwagę stadium rozwoju pęcherzyka, odnotowano podobną zależność między grupą kontrolną i traktowaną osoczem bogatopłytkowym jak po dwóch dniach eksperymentu.

Porównanie liczb pęcherzyków pierwotnych (Ryc. 10 A) i pierwszorzędowych (Ryc. 10 B), w grupie kontrolnej stwierdzono istotnie niższą ( $p=0,047$ ;  $p=0,004$ ) liczbę pęcherzyków, natomiast w przypadku pęcherzyków drugorzędowych (c) i antralnych (D), istotnie wyższą liczbę pęcherzyków ( $p=0,0002$ );  $p=0,0031$ ) w porównaniu do tkanek

traktowanych osoczem bogatopłytkowym. Porównanie liczb *corpora lutea* nie przyniosło istotnych statystycznie wyników.



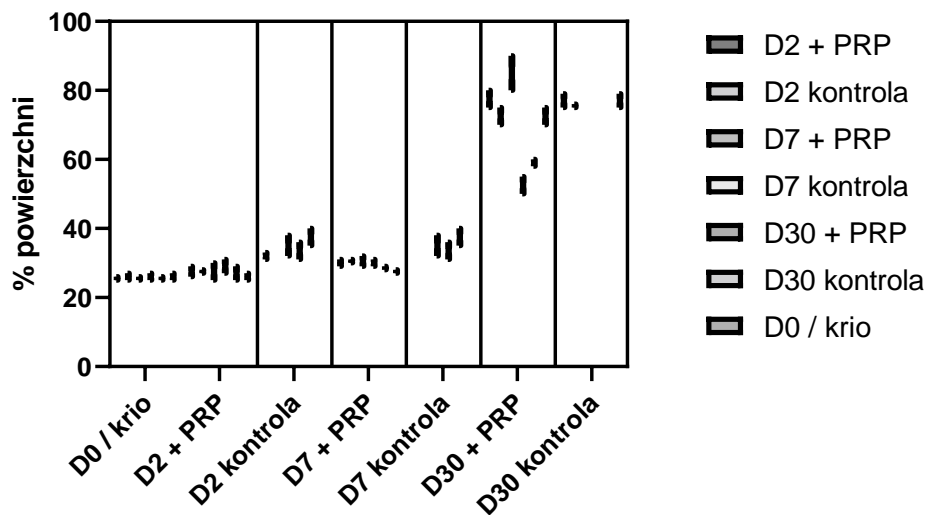
Rycina 10. Porównanie par tkanek jajników tego samego zwierzęcia pod względem liczby i rodzaju pęcherzyków w grupie średnioterminowej D7. Wykres typu estimation plott (z lewej strony) pozwala prześledzić wyniki indywidualne dla każdego zwierzęcia i ocenić wpływ działania czynnika na daną tkankę w porównaniu do jej odpowiednika z grupy kontrolnej. Wykres kolumnowy (z prawej strony) ukazuje zbiorcze wyniki porównania grup i istotność statystyczną testu. Wartości p podane zgodnie z porównaniem, wartości nieistotne statystycznie oznaczone literami ns -not significant jeśli  $p \geq 0,05$

#### 5.4.3 Grupa długoterminowa (po trzydziestu dniach od przeszczepu)

Dane z grupy D30 nie zostały poddane analizie statystycznej ze względu na niespełnienie warunku homogenności grupy.

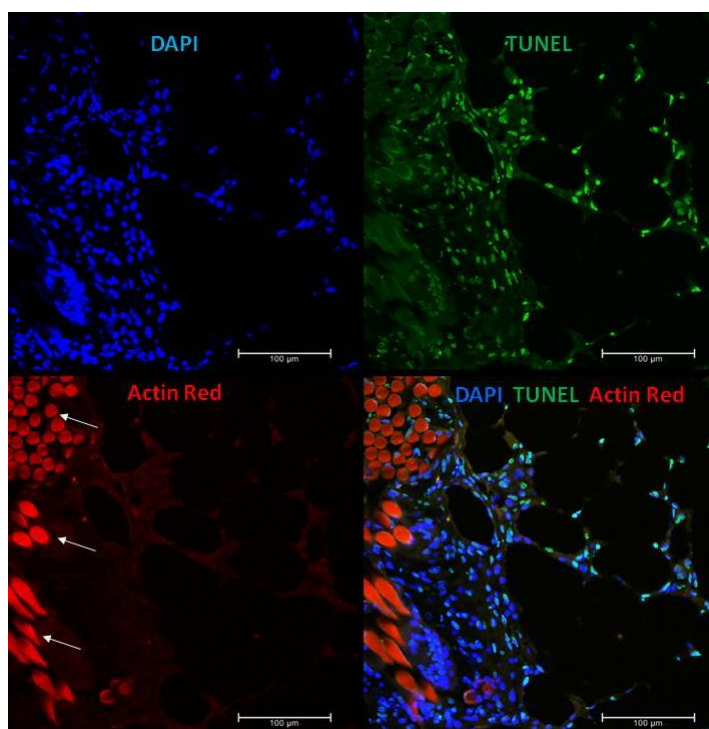
5.5 *Analiza statystyczna: Porównanie obszarów fibrotycznych i nekrotycznych w tkankach poddanych tylko mrożeniu (D0), oraz przeszczepionych po dwóch (D2), siedmiu (D7) i trzydziestu (D30) dniach od operacji.*

Przeprowadzona analiza statystyczna (Ryc. 11) nie wykazała istotnie statystycznych różnic pomiędzy obszarami objętymi zwłóknieniem w tkankach poddanych badaniom w porównaniu do tkanki poddanej tylko mrożeniu. Wyjątkiem jest porównanie z grupą D30, u której, w niektórych tkankach zaobserwowano wysoki poziom włóknienia tkanek, a także przerastania ich tkanką tłuszczową. Ze względu na bardzo dużą zmienność danych notowanych w grupie D30 została ona wyeliminowana z analiz.



Rycina 11. *Odsetek powierzchni o cechach zwłóknienia w zależności od przynależności do różnych grup badanych. Porównanie nie wykazało istotności statystycznej, z wyjątkiem porównania z jajnikami z grupy D30 ( $p < 0,001$ ), które, jednakże nie stanowiły jednorodnej grupy.*

## 5.6 Ocena poziomu apoptozy komórek tkanki jajnika metodą TUNEL



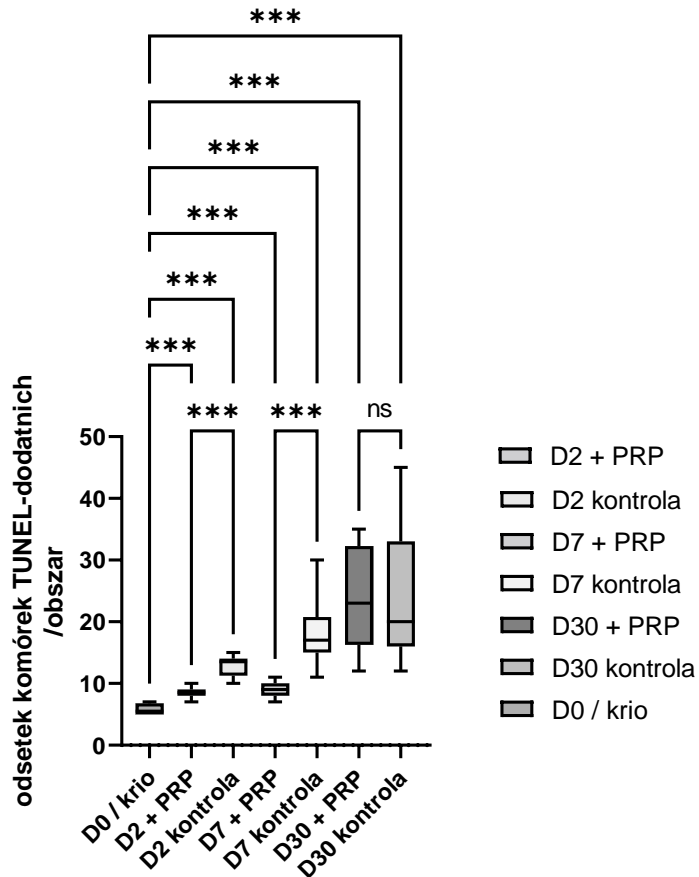
Fotografia 3. Przykładowa fotografia badania TUNEL na fragmencie tkanki jajnika szczura z grupy D7. Jądra komórek apoptotycznych zabarwione są na zielono (TUNEL); jądra komórek nieapoptotycznych na niebiesko (DAPI); włókna aktynowe na czerwono (Actin Red). Białe strzałki wskazują autofluorescencję nici chirurgicznej. Zdjęcie wykonano za pomocą konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego (Leica Sp8, Leica, Niemcy) i programu ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Mental Health; Stany Zjednoczone)

### 5.6.1 Analiza statystyczna: porównanie odsetka jąder apoptotycznych w zależności od grupy

Uzyskane wyniki (Ryc. 12) wskazują na istotne statystycznie różnice występujące pomiędzy każdą grupą tkanek, poza tkankami z grupy D30, które nie reprezentują rozkładu normalnego.

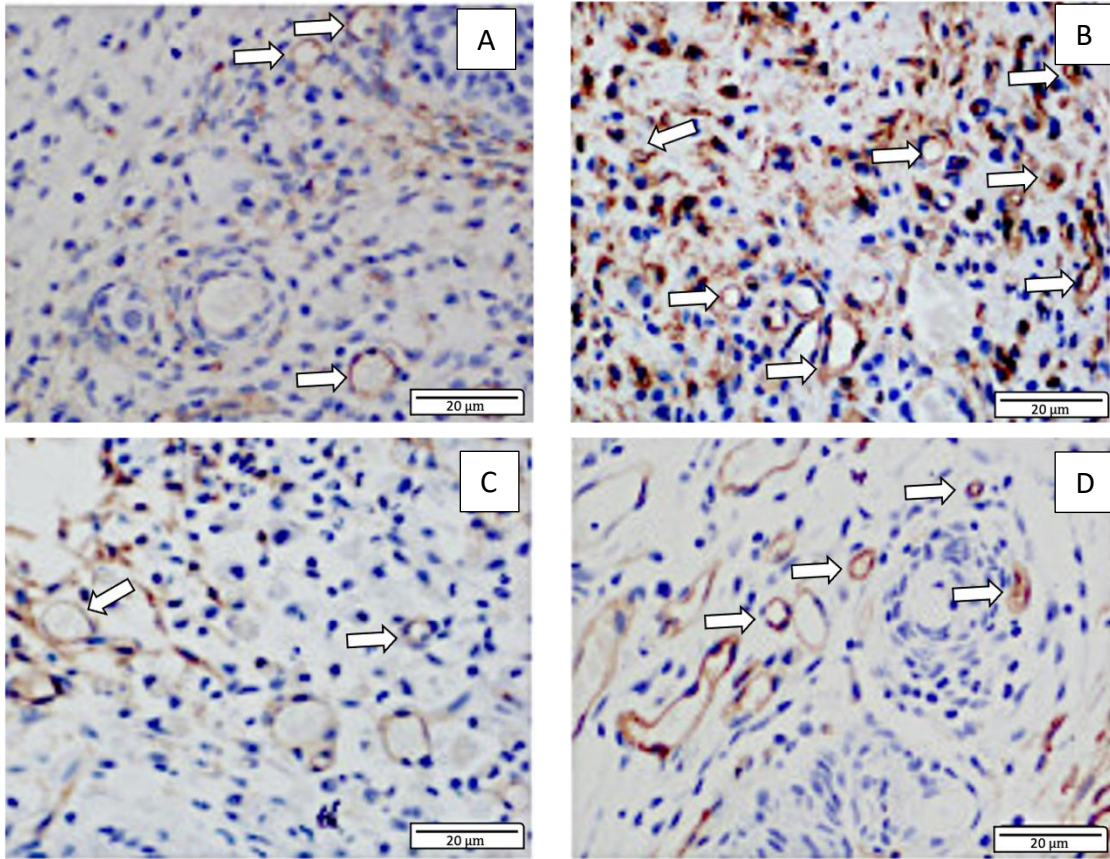
Wyniki te jednoznacznie wskazują na zwiększającą się liczbę komórek apoptotycznych wraz z procesem przeszczepienia tkanki, jako że tkanki z grup D2 i D7 prezentują istotnie statystycznie większą liczbę komórek TUNEL- pozytywnych niż tkanki z grupy D0 ( $p < 0,001$ ). Istotnym jest także fakt, że tkanki z grupy D2 + PRP reprezentowały istotnie statystycznie mniejszą liczbę komórek apoptotycznych niż tkanki kontrolne z tej samej grupy czasowej (D2 kontrola) ( $p < 0,001$ ). Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku

porównania tkanek z grupy D7, gdzie także tkanki traktowane osoczem bogatopłytkowym (D7 + PRP) prezentowały istotnie statystycznie mniejszą liczbę komórek TUNEL-pozytywnych niż tkanki z grupy D7 kontrola.



Rycina 12. *Odsetek jąder apoptotycznych w zależności od badanej grupy. Porównania istotne statystycznie ( $p < 0,001$ ) oznaczone trzema gwiazdkami. Porównania nieistotne statystycznie oznaczone literami ns – not significant,  $p > 0,05$ .*

5.7 Ocena neowaskularyzacji w tkance jajnika. Ekspresja CD-31 (PECAM-1) na preparacie barwionym metodą immunohistochemiczną.



Fotografia 4. Zdjęcia tkanek jajnika pochodzących z grupy D7 barwionych metodą immunohistochemiczną na obecność CD-31. A, B – tkanka pochodząca z grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym (D7+PRP), C, D – tkanka pochodząca z grupy kontrolnej tych samych zwierząt (D7 kontrola). Białe strzałki wskazują na ekspresję CD-31 (kolor brunatny) w kształtujących się naczyniach krwionośnych. Zdjęcia wykonano pod obiektywem suchym x60 z użyciem mikroskopu świetlnego (Olympus BX43; Olympus; Polska).

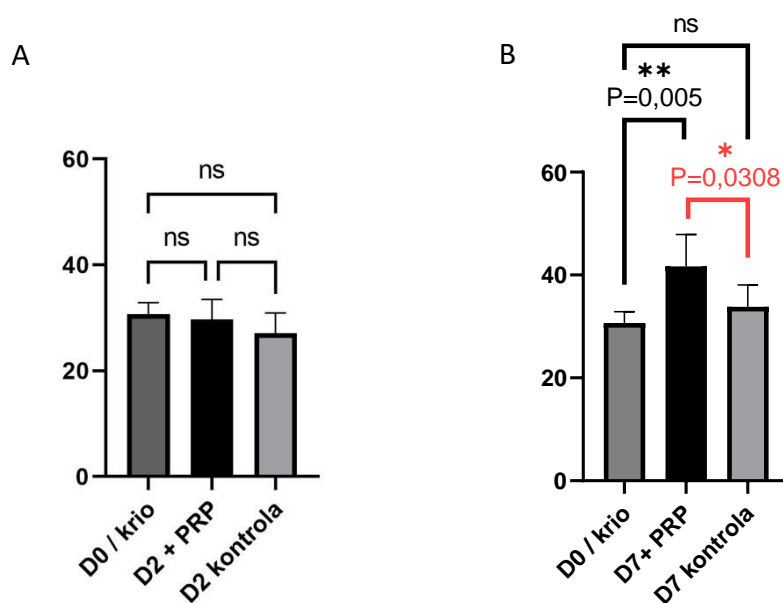
5.7.1 Analiza statystyczna: liczba i gęstość naczyń w tkankach jajnika w zależności od grupy

Przedstawione na Rycinie 13 A wyniki wskazują na nieistotne statystycznie różnice w gęstości naczyń pomiędzy tkankami D0 i tkankami z grupy krótkoterminowej D2 (D2+PRP i D2 kontrola). Porównanie grupy D0 z tkankami z grupy D7 (Ryc. 13 B) wskazuje na wzrost liczby naczyń, w grupie traktowanej osoczem bogatopłytkowym.

Wzrost ten jest istotny statystycznie ( $p=0,005$ ). Porównanie z grupą kontrolną D7 nie wykazało istotnej wartości  $p$  ( $p=0,85$ ).

Porównanie tkanek jajników z grupy D7+ PRP i ich grupą kontrolną (Ryc. 13 B, czerwone zaznaczenie) wskazuje na istotną statystycznie różnicę ( $p=0,03$ ) jednoznacznie wskazując na zwiększenie liczby naczyń w tkankach traktowanych osoczem bogatopłytkowym.

Dane z grupy D30 nie zostały poddane analizie statystycznej ze względu na niespełnienie warunku homogenności grupy.



Rycina 13. Porównanie ogólnej liczby naczyń w tkankach jajnika. A: Porównanie liczby naczyń w tkankach jajników z grupy badanej i kontrolnej należących do tej samej grupy czasowej D2, wraz z porównaniem do jajnika z grupy D0. B: Porównanie liczby naczyń w tkankach jajników z grupy badanej i kontrolnej należących do tej samej grupy czasowej D7, wraz z porównaniem do jajnika z grupy D0. Porównanie pomiędzy grupami badaną i kontrolną w grupie D7 zaznaczone czerwoną klamrą. Wartości  $p$  podane zgodnie z porównaniem, wartości nieistotne statystycznie oznaczone literami ns -not significant jeśli  $p \geq 0,05$ .

### 5.7.2 Analiza korelacji występowania naczyń i pęcherzyków danego typu w tkankach jajników poddanych przeszczepowi.

Analiza korelacji występowania pęcherzyków pierwotnych i naczyń na tym samym badanym obszarze tkanki jajnika (Ryc. 14) wykazywała się istotnością statystyczną w obu badanych grupach czasowych: zarówno w grupie D2 ( $p=0,03$ ), jak i D7 ( $p=0,03$ ). Korelacja wskazuje na ujemną zależność liniową pomiędzy liczbą pęcherzyków pierwotnych



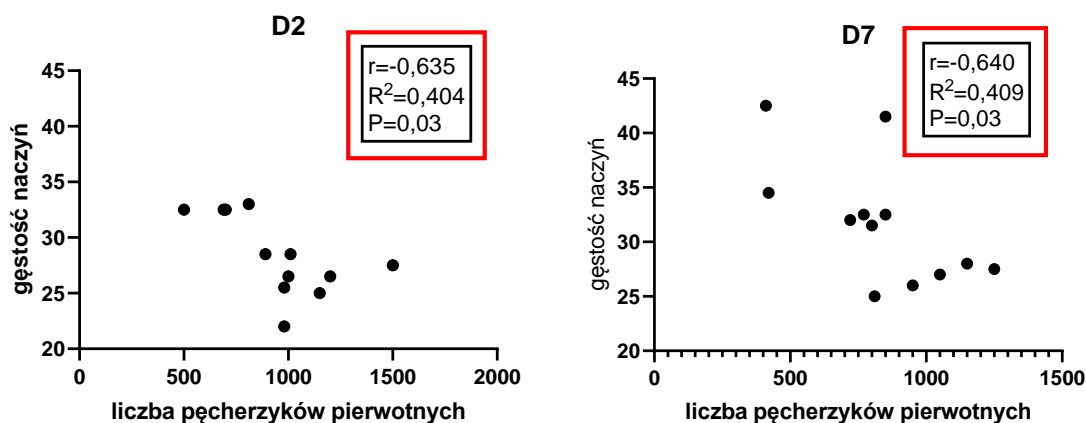
i gęstością naczyń (D2:  $r=-0,635$ ; D7:  $r=-0,64$ ) w przypadku obu analiz. Model liniowy w tym przypadku jest dopasowany na poziomie 0,4 (D2:  $R^2 = 0,404$ ; D7:  $R^2=0,409$ ) (Ryc. 14 A).

W przypadku badania korelacji występowania pęcherzyków pierwszorzędowych i naczyń na tym samym obszarze wykazano istotną statystycznie ( $p=0,04$ ), dodatnią korelację liniową ( $R^2=0,36$ ) dla grupy D7 ( $r=0,6$ ) natomiast nie wykazano takiej korelacji dla grupy D2 ( $p=0,84$ ) (Ryc. 14 B).

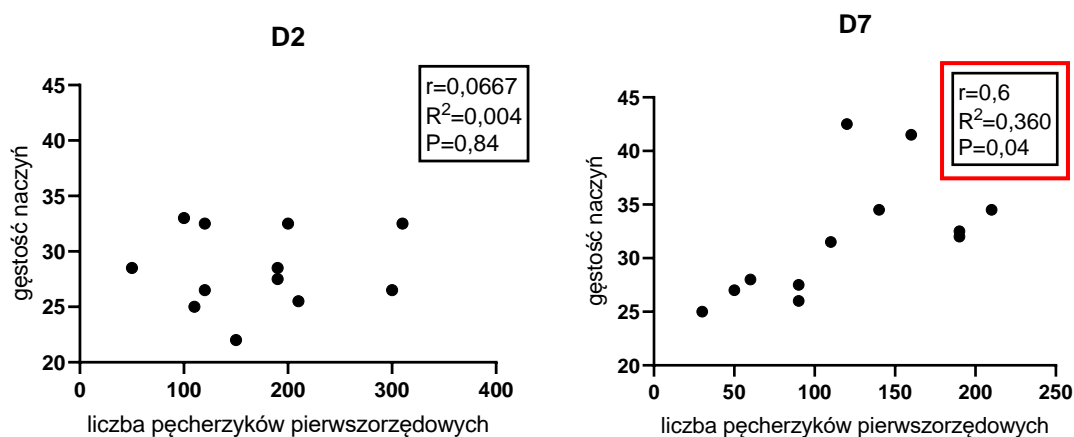
Badanie współzależności dla występowania naczyń i pęcherzyków drugorzędowych nie wykazało istotności statystycznej w grupie krótkoterminowej D2, natomiast w grupie D7 wykazało wysoko istotną statystycznie ujemną korelację liniową ( $r= -0,331$ ;  $p<0,001$ ;  $R^2=0,719$ ) (Ryc. 14 C). Analiza zależności dla pęcherzyków antralnych i naczyń nie wykazała istotności statystycznej dla żadnej z grup czasowych (Ryc. 14 D).

Dane z grupy D30 nie zostały poddane analizie statystycznej ze względu na niespełnienie warunku homogenności grupy.

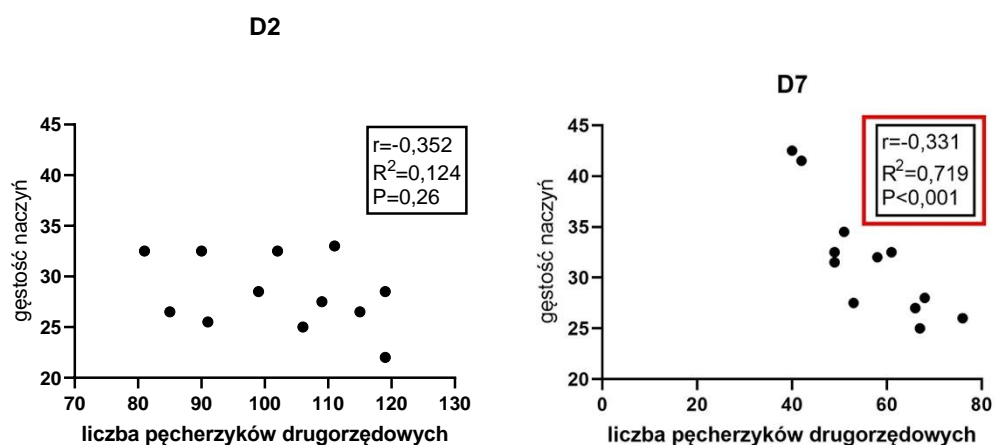
A



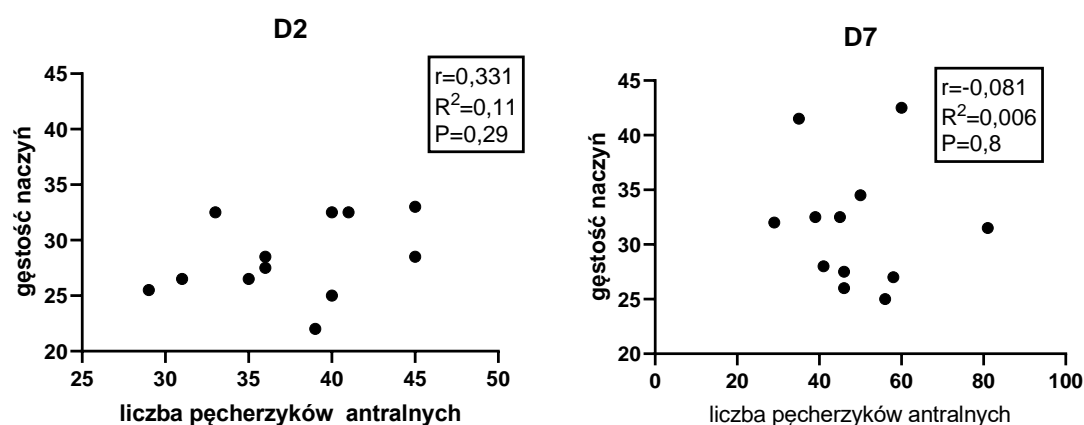
B



C



D



Rycina 14. Wartość współczynników korelacji między gęstością naczyń, a liczbą pęcherzyków danego typu w tkankach jajników poddanych przeszczepowi. A – porównanie danych dot. gęstości naczyń dla grup D2 i D7 odnośnie do liczby pęcherzyków pierwotnych; B- porównanie danych dot. gęstości naczyń dla grup D2 i D7 odnośnie do liczby pęcherzyków pierwszorzędowych; C- porównanie danych dot. gęstości naczyń dla grup D2 i D7 odnośnie do liczby pęcherzyków drugorzędowych; D- porównanie danych dot. gęstości naczyń dla grup D2 i D7 odnośnie do liczby pęcherzyków antralnych. W ramce podano wartości współczynników korelacji dla każdego testu:  $r$  - korelacji,  $R^2$  – determinacji oraz  $p$ - prawdopodobieństwa testowego. Na czerwono podkreślono wyniki istotne statystycznie ( $p<0,05$ ).

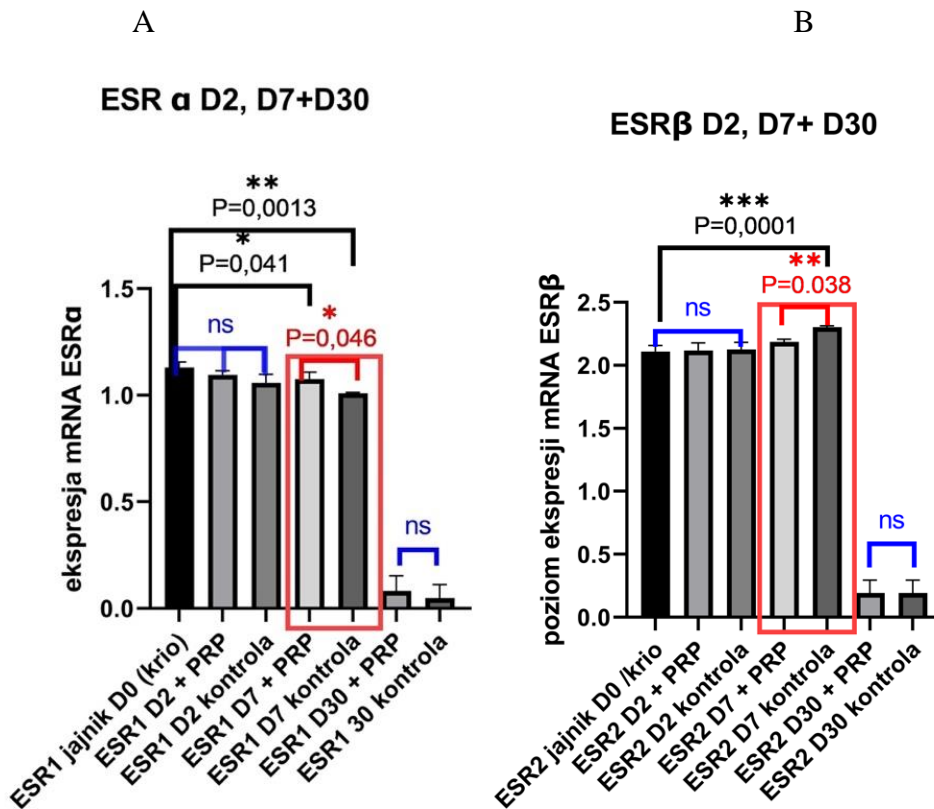
5.8 *Analiza ekspresji mRNA: receptorów steroidozależnych (ESR $\alpha$ , ESR $\beta$ , PGR), hormonu antymullerowskiego (AMH) i jego receptora (AMH2), a także markera zapalenia TNF $\alpha$  w tkankach jajników poddanych przeszczepom oraz w jajnikach porównawczych poddanych procedurze witryfikacji.*

5.8.1 *Analiza ekspresji receptorów steroidozależnych: receptora progesteronowego oraz estrogenowego alpha i beta.*

Porównanie ekspresji mRNA receptorów estrogenowych typu *alpha* i *beta* we wszystkich grupach, w odniesieniu do grupy D0 przedstawiono na Rycinie 15. Uzyskane wskazują na nieistotne statystycznie zmiany ekspresji w grupie D2 w porównaniu do grupy D0 (niezależnie od użytego protokołu użycia osocza/próby kontrolnej) zarówno w przypadku ekspresji receptora ESR $\alpha$  (ESR1) jak i ESR $\beta$  (ESR2).

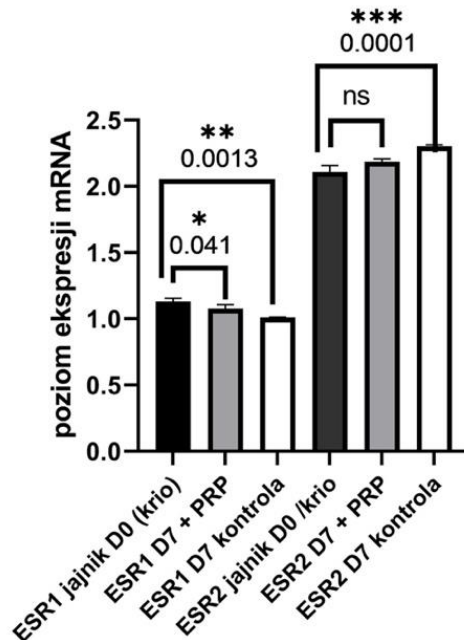
Statystycznie istotną różnicę ekspresji mRNA receptora typu *alpha* (ESR $\alpha$ /ESR1) wykazano pomiędzy grupą porównawczą D0, a grupą średnioterminową D7, zarówno w przypadku grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym ( $p=0,041$ ) jak i grupy kontrolnej ( $p=0,0013$ ) (Ryc. 15 A). Ekspresja ESR $\alpha$  w obu przypadkach obniżyła się, jednakże w przypadku grupy kontrolnej różnica jest wyraźniej zarysowana niż w przypadku grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym. Porównanie samych grup D7 +PRP i D7 kontrola także wykazało wysoce istotną statystycznie różnicę ( $p=0,046$ ), co wskazuje na istotne obniżenie ekspresji receptora ESR $\alpha$  w grupie kontrolnej w stosunku do grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym.

W przypadku porównania ekspresji receptora estrogenowego typu *beta* (ESR $\beta$ /ESR2) (Ryc. 15 B) wykazano istotny statystycznie wzrost ekspresji w grupie średnioterminowej D7 kontrola ( $p=0,0001$ ), natomiast wzrost ekspresji w grupie traktowanej osoczem bogatopłytkowym nie charakteryzował się istotnością statystyczną ( $p=0,38$ ). Porównanie ekspresji w grupach D7 +PRP i D7 kontrola wykazało istotną statystycznie różnicę pomiędzy tkankami traktowanymi osoczem bogatopłytkowym, a tkankami kontrolnymi ( $p=0,038$ ), co jednoznacznie wskazuje na efekt działania osocza bogatopłytkowego. Tkanki jajników z grupy D30 zostały wyeliminowane z analizy statystycznej ze względu na brak rozkładu normalnego wyników. Przedstawione na wykresie średnie wyniki ekspresji reprezentują drastyczny spadek ekspresji badanych genów w tkance po 30 dniach od przeszczepu.



C

**ESR  $\alpha$  , ESR  $\beta$  porównanie grup D7 z D0**

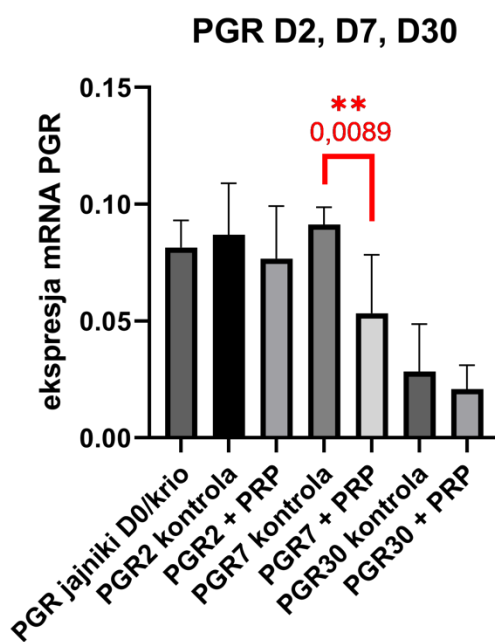


Rycina 15. Wyniki ekspresji receptorów estrogenowych ESR $\alpha$  (Ryc. 15A) i ESR $\beta$  (Ryc. 15B)

w tkankach jajników w zależności od badanej grupy. Wartości p podane zgodnie z porównaniem, ns -not significant; jeśli  $p \geq 0,05$ . Porównania pomiędzy grupą badaną

i kontrolną z tej samej grupy czasowej zostały zaznaczone klamrami o czerwonym i niebieskim kolorze. Ryc. 15 C- Porównanie ekspresji obu badanych receptorów estrogenowych ( $ESR\alpha$  i  $ESR\beta$ ) w jajnikach z grupy czasowej D7 wraz z porównaniem do ekspresji tych receptorów reprezentowanej przez tkankę porównawczą D0. Wartości p podane zgodnie z porównaniem, ns -not significant jeśli  $p \geq 0,05$ .

Analiza ekspresji receptora progesteronowego PGR (Ryc. 16) wykazała statystycznie istotną różnicę ekspresji pomiędzy tkankami jajników z grupy D7 + PRP oraz D7 kontrola, natomiast nie wykazano statystycznie istotnych różnic w odniesieniu do tkanek jajników porównawczych D0 dla żadnej z badanych grup. Uzyskane wyniki wskazują na nieistotne statystycznie zwiększenie ekspresji PGR w tkankach z grupy kontrolnej ( $P=0,98$ ), a zmniejszenie w tkankach z grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym ( $P=0,1$ ).



Rycina 16. Wyniki ekspresji receptora progesteronowego w tkankach jajników w zależności od badanej grupy. Wartość istotnie statystycznego porównania pomiędzy jajnikami grupy badanej i kontrolnej D7 zaznaczona czerwoną klamrą. Pozostałe porównania nieistotne statystycznie.

### 5.8.2 Analiza relatywnej ekspresji hormonu antymullerowskiego (AMH) i receptora dla AMH (AMHR2) w jajnikach

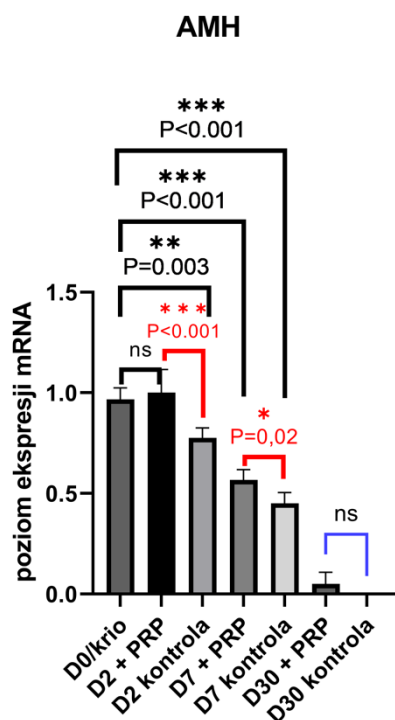
Porównanie ekspresji mRNA (Ryc. 17) w tkankach jajników porównawczych D0 z grupą krótkoterminową wykazało istotną statystycznie zmianę ekspresji jedynie w przypadku

grupy kontrolnej D2 (D2 kontrola), w której to ekspresja mRNA AMH była znacznie obniżona ( $p=0,003$ ).

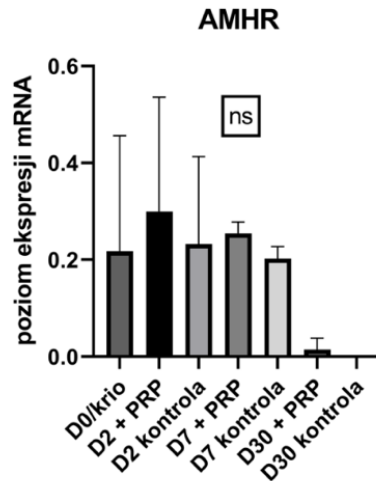
W przypadku grupy średnioterminowej D7 ekspresja AMH znacznie obniżyła się zarówno w grupie traktowanej osoczem jak i grupie kontrolnej ( $p<0,001$ ). Grupa D30 została wyeliminowana z analiz ze względu na brak rozkładu normalnego.

Analiza porównania wewnątrz grup czasowych wykazała, że ekspresja AMH w grupie krótkoterminowej D2, w tkankach traktowanych osoczem bogatopłytkowym istotnie statystycznie różni się od tej w grupie tkanek kontrolnych ( $p<0,001$ ). Podobną zależność wykazano poprzez porównanie grupy średnioterminowej D7, gdzie różnica pomiędzy grupami także cechowała się istotnością statystyczną ( $p=0,02$ ). Wyniki te wskazują na relatywnie wyższą ekspresję mRNA AMH w grupach traktowanych osoczem bogatopłytkowym niż w grupach kontrolnych tych samych grup czasowych.

Przeprowadzone analizy ekspresji receptora hormonu antymullerowskiego AMHR2 nie wykazały statystycznych różnic ekspresji w tkankach jajników pomiędzy grupami (Ryc.18).



Rycina 17. Wyniki ekspresji mRNA dla hormonu antymullerowskiego w tkankach jajników w zależności od badanej grupy. Porównania pomiędzy grupą badaną i kontrolną z tej samej grupy czasowej zostały zaznaczone klamrami o czerwonym i niebieskim kolorze. Wartości  $p$  podane zgodnie z porównaniem, wartości nieistotne statystycznie oznaczono literami ns (not significant) jeśli  $p\geq 0,05$ .



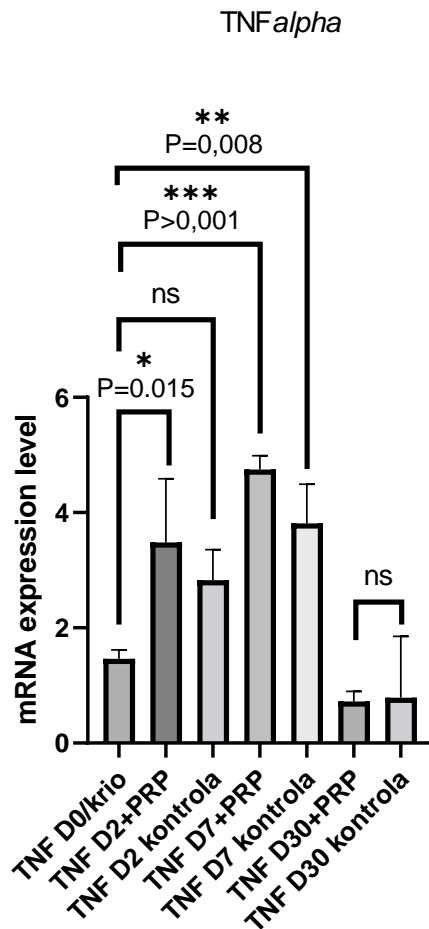
Rycina 18. Wyniki ekspresji receptora dla hormonu antymullerowskiego w tkankach jajników w zależności od badanej grupy. Wyniki nieistotne statystycznie (ns -not significant,  $P \geq 0,05$ ).

### 5.8.3 Analiza relatywnej ekspresji markera zapalenia $TNF\alpha$

Analiza ekspresji markera  $TNF\alpha$  (Ryc. 19) w porównaniu do ekspresji tego czynnika w tkankach jajników porównawczych D0 wskazuje jednoznacznie na wzrost ekspresji w tkankach poddanych przeszczepowi do biorczyń.

W przypadku grupy krótkoterminowej D2 wykazano istotną statystycznie różnicę w ekspresji  $TNF\alpha$  w odniesieniu do tkanek jajników traktowanych osoczem bogatopłytkowym ( $p=0,015$ ), natomiast nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy dla porównania do tkanek kontrolnych ( $p=0,181$ ). Porównanie wewnątrz grupy D2 także nie wykazało istotności statystycznej ( $p=0,872$ ).

W przypadku grupy średnioterminowej D7 wykazano wysoce istotny statystycznie wzrost ekspresji  $TNF\alpha$  zarówno dla grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym ( $p<0,001$ ) jak i grupy tkanek kontrolnych ( $p=0,008$ ). Natomiast porównanie ekspresji  $TNF\alpha$  wewnątrz grupy D7 nie charakteryzowało się statystyczną istotnością ( $p=0,692$ ).

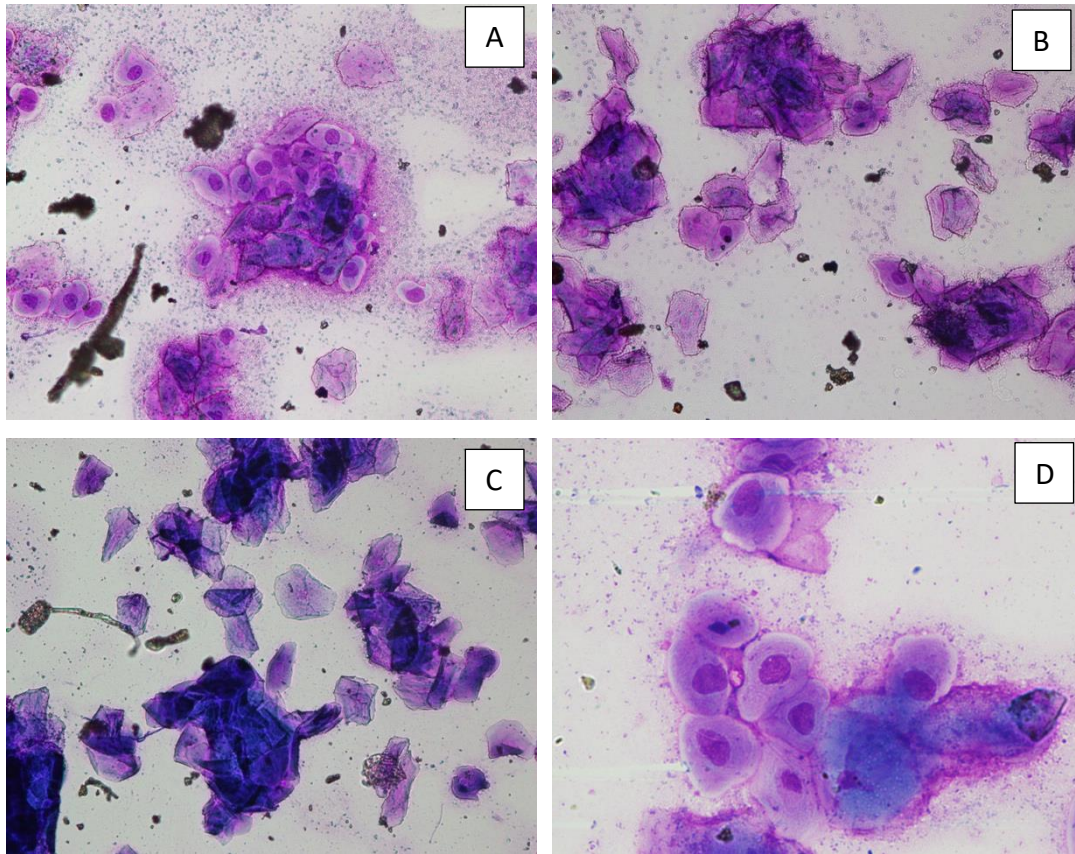


Rycina 19. Wyniki ekspresji czynnika martwicy nowotworów typu alpha (TNF $\alpha$ ) w tkankach jajników w zależności od badanej grupy. Wartości p podane zgodnie z porównaniem, wartości nieistotne statystycznie oznaczono literami ns (not significant) jeśli  $p \geq 0,05$ .

### 5.9 Wyniki badania cyklu rujowego u szczurów z grupy długoterminowej.

Badaniom poddano wszystkie szczury z grupy D30 (n=6). Dwa osobniki wykazały obecność fazy *estrus* (Fot. 5: B, C). Wymazy pochodzące od trzeciego z osobników wskazywały na obecność fazy *proestrus* (Fot 5 A), jednak dalsze badania nie uwidocznily obecności fazy *estrus*. Trzy pozostałe osobniki nie wykazały obecności cyklu rujowego (Fot. 5 D).





*Fotografia 5. Cytologiczne wymazy waginalne pobrane od szczurów z grupy D30. A – proestrus: obecne komórki bazalne, parabazalne pośrednie i niezrogowaciałe komórki nabłonka; B, C – estrus: obecne zrogowaciałe komórki nabłonkowe pozbawione jąder komórkowych; D – anestrus: obecne komórki bazalne i parabazalne*

## **6. Omówienie wyników i dyskusja**

W niniejszej pracy badano wpływ allogenicznego osocza bogatopłytkowego na parametry funkcjonalności przeszczepu witryfikowanej tkanki jajnika, na modelu szczurzym.

Uzyskane w doświadczeniu wyniki pozwalają lepiej zrozumieć procesy zachodzące w przeszczepionych tkankach jajnika pod wpływem osocza bogatopłytkowego, a także stanowią podstawę do dalszych badań nad fizjologią i żywotnością tkanki jajnika poddanego kriokonserwacji oraz nad możliwościami ulepszenia procedur zachowania płodności.

### **6.1 Ocena rewaskularyzacji przeszczepionej tkanki jako miernika żywotności i prędkości przyjęcia się przeszczepu. Wpływ osocza bogatopłytkowego na przyspieszenie procesu budowy naczyń.**

Unaczynienie jest jednym z najważniejszych parametrów, na podstawie których można ocenić jakość, a co za tym idzie funkcjonalność przeszczepionej tkanki. Proces rewaskularyzacji jest kluczowym czynnikiem w krytycznym okresie bezpośrednio po przeszczepie, w którym transplantowane tkanki są narażone na uszkodzenie i martwicę w wyniku niedotlenienia i niedokrwienia. Przedłużanie się tego niekorzystnego stanu wiąże się z także wysokim odsetkiem utraty pęcherzyków i zaburzeniem ich aktywacji, zwanym zespołem wypalenia (ang. *burnout syndrome*) (Smitz *et al.* 2010; Roness *et al.* 2013; Takae and Suzuki 2019). Przyspieszenie reperfuzji przeszczepionej tkanki jajnika jest więc warunkiem koniecznym, aby polepszyć efektywność procedury transplantacji.

Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych wskazują, że proces neowaskularyzacji przeszczepionej tkanki zaczyna się natychmiast po przeszczepie i trwa około tygodnia niezależnie od gatunku. U gryzoni rewaskularyzacja tkanki jajnika następuje już w 48h po transplantacji, a w ciągu 7 dni wykształcają się w pełni funkcjonalne naczynia (Gosden *et al.*, 1994; Israely *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008a), a większe modele zwierzęce, takie jak owca wykazały powstawanie nowych, funkcjonalnych naczyń około 7 dnia po przeszczepie. U ludzi proces powstawania nowych naczyń w przeszczepionej tkance także zajmuje około 5-7 dni (van Eyck *et al.*, 2010). Van Eyck *et al.* wykazali, że proces tworzenia nowych naczyń rozpoczynany jest zarówno w przeszczepionej tkance, jak i organizmie gospodarza. Dlatego ważne wydaje się działanie zarówno na tkankę przeszczepianą jak i na miejsce wszczepu. Jednoczesna indukcja neoangiogenezy w obu

miejscach, poprzez działanie czynnika takiego jak PRP może, teoretycznie, przyspieszyć ten proces skracając okres ischemii do minimum i obniżając czas niedokrwienia poniżej 5 dni.

Kierując się powyższymi przesłankami, podobny model zastosowano w powyższej dysertacji aplikując osocze bogatopłytkowe zarówno na tkankę przeszczepianą poprzez inkubację w osoczu bezpośrednio po rozmrożeniu, jak i stosując iniekcję z osocza bogatopłytkowego w miejsce przeszczepu.

W literaturze przedmiotu przyspieszenia procesu reperfuzji przeszczepionych tkanek jajnika występują opracowania opisujące zastosowanie poszczególnych, wyodrębnionych czynników wzrostu naczyń. Kong *et al.* przeprowadzili badania z zastosowaniem ksenografu bydłowego jajnika u myszy, w których badacze zastosowali angiopoetynę-2 (Ang-2) i izolowany czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) jako czynniki proangiogenne (Kong *et al.*, 2017b). Ich wyniki sugerują, że zastosowanie angiopoetyny Ang-2 we współdziałaniu z VEGF może kompensować szkodliwe efekty kriokonserwacji i sprzyja rewaskularyzacji tkanki przeszczepu.

W analizie działania zaproponowano następujący mechanizm molekularny: angiopoetyna 2 promuje destabilizację naczyń poprzez osłabianie oddziaływania pomiędzy komórkami śródbłonna i otaczającymi je perycytami (komórkami przydanki). Ułatwia w ten sposób działanie cytokin działających na śródbłonek, takich jak VEGF, który z kolei aktywuje proliferację i migrację komórek śródbłonna, w efekcie promując wytwarzanie nowych naczyń. Mechanizm ten podobny jest do procesu tworzenia naczyń zachodzącego w guzach (Kopczyńska, Makarewicz and Tyrakowski, 2007). Naukowcy nie podali jednak zastosowanej izoformy VEGF użytej w badaniu, co byłoby bardzo pouczające, ponieważ wykazano, że nie każda syntetyczna forma VEGF wywiera taki sam wpływ na proces neowaskularyzacji w tkance jajnika. Przykładowo, badanie wpływu VEGF<sub>165</sub> wstrzykniętego do przeszczepionej podskórnie kory jajnika u małpy nie wpłynęło na unaczynienie przeszczepu (Schnorr *et al.*, 2002), za to w badaniu Labied *et al.*, prowadzonym na ksenografie jajnika owczego u myszy, w którym zastosowano izoformę VEGF<sub>111</sub> zauważono znaczną poprawę gęstości funkcjonalnych kapilar (Labied *et al.*, 2013). Należy tu podkreślić, że angiogeneza jest procesem złożonym i wieloetapowym, który być może wymaga wielu różnych czynników do utworzenia prawidłowo funkcjonującej sieci naczyniowej. Dla przykładu, w badaniu przeprowadzone przez Wang *et al.*, w którym autorzy porównali wpływ VEGF i bFGF na przeszczep ludzkiej tkanki do mięśnia grzbietu królika (Wang *et al.*, 2013) wykazano, że synergiczne działanie dwóch

czynników miało dużo większy wpływ na liczbę i gęstość naczyń, a co za tym idzie redukcję apoptozy, niż działanie każdego z czynników osobno.

Wnioski te pozwalają postawić hipotezę, że osocze bogatopłytkowe, jako naturalna kumulacja czynników promujących neoangiogenezę i proliferację komórek śródbłonna, z dużym prawdopodobieństwem może stanowić czynnik polepszający efektywność przeszczepu poprzez przyspieszenie procesów rewaskularyzacji przeszczepionej tkanki jajnika.

Analizując wyniki badania przeprowadzonego w przedstawianym w powyższej dysertacji doświadczeniu, można zauważyć, że istnieje statystycznie istotna różnica pomiędzy liczbą i gęstością naczyń w tkankach traktowanych osoczem bogatopłytkowym w porównaniu z grupą kontrolną. Szczególnie istotne jest porównanie tkanek z grupy D7 uzyskanych 7 dni po przeszczepie. Porównanie tkanek obu grup badanych (D7 +PRP i D7 kontrola) z tkanką poddaną tylko mrożeniu (D0) wskazuje na wzrost liczby naczyń po 7 dniach od przeszczepu. W przypadku porównania tkanek poddanych działaniu osocza bogatopłytkowego (D7+PRP) wzrost ten jest statystycznie istotny ( $p=0,005$ ), w przeciwieństwie do porównania tkanki kontrolnej ( $p=0,85$ ). Statystycznie istotna różnica zauważalna była także w bezwzględnej liczbie naczyń występujących w tkankach jajników tych samych szczurów, w porównaniu pomiędzy tkanką traktowaną osoczem bogatopłytkowym i odpowiadającą jej tkanką kontrolną ( $p=0,0308$ ), gdzie liczba naczyń w tkankach traktowanych osoczem była istotnie statystycznie większa.

Powyższe wyniki wskazują na pozytywny wpływ osocza bogatopłytkowego na neowaskularyzację. Rezultaty uzyskane w opisywanym w dysertacji badaniu są zgodne z doniesieniami opisanymi w literaturze i potwierdzają hipotezę o synergicznym wpływie wielu naturalnych izoform czynników wzrostu zawartych w osoczu bogatopłytkowym.

Neowaskularyzacja i w efekcie reperfuzyja przeszczepionej tkanki jest jednak tylko jednym z parametrów jakości przeszczepu. W przypadku tkanki jajnika najważniejsze jest zachowanie struktur odpowiedzialnych za rozrodczą i endokrynologiczną funkcjonalność tej tkanki: pęcherzyków jajnikowych.

W opisywanym w niniejszej dysertacji badaniu podczas histopatologicznej analizy tkanki jajnika można było zauważyć większą gęstość naczyń krwionośnych w miejscach obwodowych przeszczepionej tkanki jajnikowej, co jest typowe dla dynamiki neowaskularyzacji (Wang *et al.* 2012; Manavella, Cacciottola, Pomme, *et al.* 2018).

Zgodnie z przypuszczeniami, już w drugim dniu po operacji (grupa D7) stwierdzono korelację ( $R^2=0,404$ ;  $p=0,03$ ) pomiędzy liczbą prawidłowych morfologicznie pęcherzyków pierwotnych, a większą gęstością naczyń. Siedem dni po operacji przeszczepienia tkanki, czyli w grupie D7, stwierdzono korelację pomiędzy liczbą pęcherzyków i liczbą naczyń zarówno w przypadku pęcherzyków pierwotnych ( $R^2 =0,409$ ;  $p=0,03$ ), jak i pierwszorzędowych ( $R^2=0,360$ ;  $p=0,04$ ) co świadczy o pozytywnej korelacji pomiędzy tymi dwoma markerami jakości tkanki. W grupie D7 stwierdzono najsilniejszą występującą w badaniu korelację, która jednak wymaga dalszego omówienia. Korelacja ta występuje pomiędzy liczbą pęcherzyków drugorzędowych (wzrastających), a liczbą naczyń i charakteryzuje się wysoką istotnością statystyczną ( $R^2=0,719$ ;  $p<0,001$ ). Korelacja ta wskazuje na zależność pomiędzy wykształceniem się funkcjonalnej sieci naczyń, a zachowaniem rezerwy pęcherzyków, jako że liczba pęcherzyków wzrastających rośnie odwrotnie proporcjonalnie do gęstości naczyń w danej tkance. Taki mechanizm nagłego wzbudzenia wzrostu pęcherzyków, znany jako *burnout* (ang. wypalenie się) związany jest ze stresem występującym w przeszczepionej tkance i zostanie szerzej omówiony w dalszej części rozprawy.

Uzyskane wyniki są zgodne zarówno z charakterystyką wytwarzania się sieci funkcjonalnych naczyń, która, jak wspomniano powyżej, zajmuje średnio około 7 dni, jak i z fizjologią zdrowej tkanki. Fragmenty tkanki, w których gęstość naczyń była niższa charakteryzowała się zwłóknieniem lub obecnością pęcherzyków drugorzędowych i antralnych.

Podobne wyniki dotyczące korelacji obecności naczyń i pęcherzyków uzyskali Jiang-Man Gao *et al.* w swoim badaniu nad wpływem bFGF (ang.: *basic fibroblast growth factor*) i hydrożelu fibrynowego na heterotopyczny przeszczep tkanki jajnika myszy. W powyższym doświadczeniu porównywano gęstość kapilar i liczbę pęcherzyków pierwszorzędowych i pierwotnych (Gao *et al.*, 2013). Co istotne, w opisywanym badaniu czynnikiem aktywnym wpływającym zarówno na gęstość naczyń, jak i rezerwę pęcherzyków pierwotnych był bFGF, który jest jednym ze składników osocza bogatopłytkowego (Sanchez-Gonzalez, Mendez-Bolaina and Trejo-Bahena, 2012). W innym badaniu, z pogranicza medycyny sportu, Wasterlain *et al.* opisują systemowe działanie miejscowej (dościęgnowej) iniekcji osocza bogatopłytkowego. W eksperymencie dowiedziono, że czynnik bFGF, wraz z innymi czynnikami wzrostu i regeneracji, takimi jak VEGF, znacząco wzrasta w surowicy zwierząt po miejscowym wstrzyknięciu (Wasterlain *et al.*, 2013). Należy zwrócić uwagę na to, że nawet miejscowa

iniekcja czynnika takiego jak osocze bogatopłytkowe oddziałuje systemowo na cały organizm. W kontekście niniejszej pracy jest ważnym, aby zauważyć, że zaprezentowany protokół operacji przeszczepu zawierający inkubację tkanki przed przeszczepem, wraz z śródoperacyjną iniekcją osoczem bogatopłytkowym otaczających miejsce wszczepu tkanek ma wszelkie przesłanki działania systemowego, a więc tym bardziej takie zastosowanie PRP może przyspieszyć proces przyjęcia się przeszczepu poprzez rewaskularyzację tkanki i wzmocnienie procesów regeneracyjnych.

Wang *et al.* w pracy opisującej wpływ gonadotropiny menopauzalnej na autologiczny przeszczep tkanki jajnika u myszy wyciągają podobne wnioski. Badanie to, chociaż prowadzone na świeżej tkance jajnika, zawierało etap inkubacji tkanki *in vitro*, w różnych stężeniach gonadotropiny menopauzalnej (ang. *human menopausal gonadotropin*, HMG). Badacze zauważyli istotną różnicę w unaczynieniu przeszczepionej tkanki, liczbie pęcherzyków i ogólnej jakości przeszczepu w grupach, na których przeprowadzono inkubację tkanki w HMG przed przeszczepem. Mechanizm opisany w badaniu jest powiązaniem działania gonadotropiny na podwyższoną ekspresję VEGF, a w konsekwencji wzrost liczby naczyń i pęcherzyków (Wang *et al.*, 2012).

Możliwe zatem, że w badaniu opisywanym w niniejszej rozprawie, miał miejsce podobny mechanizm, a tkanka jajnika, która uległa szybszej i bardziej efektywnej reperfuzji dzięki synergicznemu działaniu czynników wspomagających neowaskularyzację, takich jak VEGF zachowała prawidłową strukturę tworzącą rezerwę pęcherzykową: pęcherzyki pierwotne i pierwszorzędowe. W miejscach o mniejszej gęstości naczyń, a więc w obszarach zwiększonej hipoksji, zaobserwowano więcej pęcherzyków wzrastających i antralnych, co może wskazywać na początki efektu wypalania się (ang. *burnout syndrome*). Z drugiej strony, na innych obszarach, o zmniejszonej gęstości naczyń, występowało zwłóknienie tkanki, co może być efektem ubocznym procesu zamrażania lub uszkodzenia mechanicznego. W analizie wyników nie należy zapominać, że w przeszczepach tkanek poddanych procesowi zamrażania lub witrifikacji, proces rewaskularyzacji może też trwać dłużej (Lee *et al.*, 2019).

Porównanie liczby naczyń w jajnikach z grupy kontrolnej i grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym wyraźnie wskazuje na zasadność hipotezy o pozytywnym efekcie działania zastosowanego osocza bogatopłytkowego na zwiększenie unaczynienia tkanki i przyspieszenie procesu neowaskularyzacji w siedem dni po przeszczepie ( $p < 0,001$ ).

## 6.2 *Ocena liczby pęcherzyków oraz typów pęcherzyków jajnikowych w poszczególnych próbach. Wpływ osocza bogatopłytkowego na rezerwę jajnikową przeszczepionych tkanek jajnika.*

Jednym z pierwszych etapów analizy wyników było porównanie całkowitej liczby pęcherzyków, a także typów pęcherzyków w przeszczepionych tkankach pomiędzy próbkami pochodzącymi z jajników traktowanych osoczem bogatopłytkowym, a próbkami kontrolnymi danej grupy czasowej.

Zaobserwowano, że całkowita liczba pęcherzyków, a także i ich liczba w odniesieniu do poszczególnych rodzajów (pierwotne, pierwszorzędowe, drugorzędowe i antralne), są zależne od grupy (badana vs kontrolna) i od czasu jaki upłynął od transplantacji do pomiaru (grupa D2, D7).

Ogólna liczba pęcherzyków wszystkich typów, a także ich prawidłowa struktura histologiczna były także świadectwem poprawności przebiegu procedury witrifikacji i rozmrażania, oraz – pośrednio- żywotności tkanki po przeszczepie.

W omawianym badaniu dokonano porównania tkanek z poszczególnych grup eksperymentalnych oraz pomiędzy tkankami grup po przeszczepie, a grupą „0”, czyli tkankami jajników szczurów, które zostały pozyskane i zamrożone, ale nie wszczepione do organizmu. W tej pracy nie zostało natomiast uwzględnione porównanie do jajników świeżych.

Liczenie pęcherzyków odbywało się za każdym razem na tej samej liczbie preparatów z każdego jajnika, zgodnie z metodą opracowaną przez grupę badawczą pod kierownictwem Myers (Myers *et al.*, 2004).

Ogólna liczba pęcherzyków ze wszystkich jajników danej grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym (D2 +PRP, n=6; D7+PRP, n=6) oraz jajników grupy kontrolnej D2 (n=6) nie wykazała statystycznie istotnej różnicy w porównaniu z ogólną liczbą pęcherzyków z grupą jajników porównawczych „D0” (n=6). Wyniki te wskazują na zachowaną prawidłową strukturę tkanki jajnika wraz z pęcherzykami jajnikowymi po kriokonserwacji i operacji przeszczepienia. Dopiero porównanie ogólnej liczby pęcherzyków występujących w grupie kontrolnej D7 wskazuje na znaczne zmniejszenie się liczby pęcherzyków jajnikowych w porównaniu do tkanki jajników nieprzeszczepionych „0” ( $p > 0,001$ ). Efekt ten jest prawdopodobnie konsekwencją wytracania pęcherzyków na szlaku nagłej aktywacji i dojrzewania, zwanego syndromem wypalenia (ang. *burnout*), co potwierdza dalsza analiza struktury tkanki.

Głębsza analiza, tj. porównanie pęcherzyków występujących w każdej tkance oraz ich liczebności w zależności od typu (pierwotny, pierwszorzędowy, drugorzędowy, antralny) była przeprowadzona zarówno przez porównanie tkanek badanych z tkanką D0 (jajnika zamrożonego, nie wszczepionego), jak i pomiędzy tkankami szczurów z konkretnych grup czasowych (tkanki z grupy badanej z zastosowaniem osocza, oraz odpowiadające im tkanki jajników kontrolnych).

Wyniki porównania z jajnikiem D0 wskazują na zachowaną strukturę jajnika w grupie krótkoterminowej D2+PRP traktowanej osoczem bogatopłytkowym (wyniki nieistotne statystycznie dla każdego z porównań), natomiast w grupie kontrolnej D2 wskazują na istotne statystycznie zmiany w liczebności pęcherzyków pierwotnych ( $p=0,03$ ), pierwszorzędowych ( $p=0,01$ ) oraz drugorzędowych ( $p=0,0007$ ).

W badaniach porównawczych grupy D2, czyli analizie wyników par jajników D2+PRP i D2 kontrola zauważono istotne statystycznie różnice w każdej z badanych kategorii. Liczba pęcherzyków pierwotnych w grupie traktowanej osoczem bogatopłytkowym jest istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej ( $p=0,003$ ). Podobnie w przypadku pęcherzyków pierwszorzędowych ( $p=0,0006$ ). Mechanizm rekrutacji pęcherzyków do wzrostu jest widoczny w analizie liczby pęcherzyków drugorzędowych i antralnych, gdzie w grupie kontrolnej jest ich istotnie więcej (drugorzędowe:  $p=0,0016$ ; antralne:  $p=0,0048$ ) niż w grupie traktowanej osoczem bogatopłytkowym. Należy zaznaczyć, że porównania te odbywały się pomiędzy tkankami tych samych szczurów, co zwiększa istotność statystyczną porównań niwelując efekt heterogeniczności zwierząt.

Podobna zależność występuje w wynikach porównania grupy średnioterminowej, D7, po 7 dniach po przeszczepie.

W porównaniu z jajnikami z grupy D0 obie tkanki, zarówno tkanka traktowana osoczem jak i solą fizjologiczną (kontrolna) wykazywały statystycznie istotną różnicę w liczbie pęcherzyków różnych rodzajów. W przypadku pęcherzyków pierwotnych różnica była istotna statystycznie w przypadku porównania obu grup badawczych (D0 vs D7+PRP:  $p=0,04$ ; D0 vs D7 kontrola:  $p=0,0017$ ). W porównaniu liczby pęcherzyków pierwszorzędowych różnica istotna statystycznie dotyczyła tylko grupy kontrolnej ( $P<0,0001$ ), ale już w przypadku pęcherzyków wzrastających różnica dotyczyła obu tkanek ( $p<0,0001$ ;  $p<0,0001$ ). Pęcherzyki antralne w przypadku obu grup prezentowały średnio



większą liczbę niż w tkankach porównawczych D0, a liczba ta była istotnie statystycznie większa w tkankach z grupy kontrolnej ( $p=0,013$ ).

W porównaniu par tkanek jajników (jajników pochodzących od tego samego zwierzęcia) także zauważono istotne statystycznie różnice w zależności od protokołu operacji i udziału osocza bogatopłytkowego.

Różnica ta jest zauważalna zarówno w liczbie pęcherzyków pierwotnych i pierwszorzędowych, na rzecz grupy traktowanej osoczem bogatopłytkowym (pierwotne:  $p=0,04$ ; pierwszorzędowe:  $p=0,0004$ ), jak i w liczbie pęcherzyków zrekrutowanych do wzrostu, których jest zdecydowanie więcej w grupie kontrolnej (drugorzędowe:  $p=0,0002$ ; antralne:  $p=0,0031$ ). Należy zaznaczyć, że kontrolna D7 wykazała także mniejszą ogólną liczbę pęcherzyków, co może wpłynąć na obliczenia średnich liczb pęcherzyków danego typu.

Przeprowadzona analiza procentowego udziału pęcherzyków danego typu w tkance przybliżyła mechanikę zmian jakie zachodzą w tkance jajnika po przeszczepie i ilustruje mechanizm rekrutacji pęcherzyków.

Analiza powyższych wyników wskazuje na mechanizm rekrutacji pęcherzyków pierwotnych, jako że po 2 dniach od przeszczepu tkanki wykazywały stosunkowo dużą liczbę pęcherzyków pierwotnych i pierwszorzędowych i stosunkowo niską liczbę pęcherzyków antralnych, podobnie jak w jajniku porównawczym. Natomiast tydzień po transplantacji (D7) rozkład typów pęcherzyków uległ znaczącej zmianie na rzecz pęcherzyków drugorzędowych i antralnych, z których te drugie ponad dwukrotnie zwiększyły swój udział w tkance.

Taka charakterystyka wskazuje na początek gwałtownej i związanej ze stresem rekrutacji pęcherzyków pierwotnych, tzw. zespół wypalenia rezerwy jajnikowej (ang.: *burnout syndrome*).

Zespół wypalenia rezerwy pęcherzykowej jest jednym z problemów z którymi borykają się lekarze i naukowcy zajmujący się przeszczepem tkanki jajnika. Polega on na nagłej utracie rezerwy pęcherzyków pierwotnych i pierwszorzędowych, które podlegają gwałtownej rekrutacji i dojrzewaniu, zwykle kończących się ich atrezią (Roness *et al.*, 2013). W efekcie czas trwałości i funkcjonalności przeszczepu tkanki jest bardzo krótki, pomimo wysokiej wyjściowej jakości zamrożonej tkanki. Wystąpienie zespołu wypalenia jest konsekwencją zachwiania dynamicznej równowagi, gwarantowanej przez endokrynną działalność

obecnych w jajniku pęcherzyków wzrastających, ale także fizycznych właściwości środowiska jajnika.

Liczne badania dowodzą, że w czasie krioprezerwacji tkanki takiej jak tkanka jajnika cieńsze skrawki będą podlegać łatwiejszej penetracji krioprotektantów i efektywniej podlegać procesowi mrożenia (Kolbe, Walter and Rulicke, 2019). Z drugiej jednak strony, trójwymiarowa struktura sztywnej macierzy, w której zawieszono są różnego typu pęcherzyki odgrywa niezwykle istotną rolę w utrzymaniu ich właściwości fizycznych i możliwości komunikacji między pęcherzykami (Hornick *et al.*, 2012). Proces przygotowania tkanki do mrożenia, a więc przygotowanie skrawków, powoduje nie tylko utratę części pęcherzyków, ale w konsekwencji także zaburzenie homeostazy środowiska jajnika. Brak większych pęcherzyków: wzrastających i owulacyjnych, powoduje spadek stężenia hormonu anty-Mullerowskiego, który jest m.in. inhibitorem procesu dojrzewania pęcherzyków (Roness *et al.* 2013).

Oczywiście, analizując wyniki badania w kontekście porównania ich z literaturą nie można pominąć wpływu zastosowania witrifikacji na strukturę tkanki jajnika. Dowiedziono, że uszkodzenia związane z szokiem termicznym i tworzeniem się kryształków lodu podczas kriokonserwacji negatywnie wpływają na jajnik, powodując utratę rezerwy pęcherzyków (Chen, Tan and Tzeng, 2014).

Wpływ kriokonserwacji na tkankę jajnika gryzoni został poddany dogłębnej analizie, m. in. w pracy Youm *et al.* (Youm *et al.*, 2013). Wnioski z powyższej pracy, wraz z proponowanym protokołem ekwilibracji tkanki do witrifikacji, zostały zaadaptowane do badania opisywanego w niniejszej dysertacji. Wpływ procesu witrifikacji został uwzględniony w analizie histologicznej, dlatego podane wyniki liczby i rodzaju pęcherzyków dotyczą jedynie pęcherzyków o prawidłowej strukturze. Pęcherzyki o wyraźnych cechach patologicznych nie były uwzględniane w badaniu. Dzięki takiemu podejściu wyniki porównania pomiędzy grupami są niezależne od samego wpływu krioprezerwacji tkanki, a porównywanie wyników do grupy „0”, czyli tkanek poddanych temu samemu procesowi witrifikacji, jest bardziej zasadne niż porównywanie ich do świeżej tkanki jajnika szczura. Dzięki zastosowanemu modelowi badawczemu zredukowane zostały: negatywny wpływ na strukturę tkanki będący wynikiem samego procesu zamrażania oraz błędy wynikające z porównywania tkanek poddanych różnej obróbce (Chen *et al.* 2014; Barbato *et al.* 2018), a analiza i wnioski są bardziej miarodajne.

W badaniu będącym przedmiotem tej dysertacji można łatwo zaobserwować efekt zespołu wypalenia. W grupie krótkoterminowej D2 liczba pęcherzyków pierwotnych w grupie traktowanej osoczem bogatopłytkowym niewiele różni się od jajnika porównawczego, który nie został poddany przeszczepowi, natomiast w grupie kontrolnej różnica ta jest statystycznie istotna. Porównanie tkanek jajników traktowanych osoczem i kontrolnych tych samych szczurów także wskazuje na statystycznie istotną różnicę w liczbie pęcherzyków pierwotnych, podkreślając zmniejszanie się liczby pęcherzyków pierwotnych w tkankach kontrolnych. W grupach D7 liczba pęcherzyków znacznie się zmniejszyła, zmianie uległa także struktura tkanki pod względem udziału typów pęcherzyków. Porównanie grup traktowanych osoczem bogatopłytkowym i grup kontrolnych w konkretnych grupach czasowych D2 i D7 wskazuje na istotne statystycznie różnice w liczbach pęcherzyków pierwotnych, drugorzędowych i antralnych.

Analizując wyniki otrzymane w badaniu prezentowanym w niniejszej pracy można stwierdzić ochronny wpływ osocza bogatopłytkowego na zachowanie rezerwy pęcherzykowej i spowolnienie zespołu wypalenia (ang. *burnout syndrome*). Mechanizm działania prawdopodobnie związany jest z opisywanym wcześniej wpływem osocza i zawartych w nim czynników promujących wzrost naczyń krwionośnych na poprawę ukrwienia przeszczepionej tkanki, a także z wpływem substancji odżywczych zawartych w wysięku białek osocza powstałym na szlaku destabilizacji naczyń i migracji komórek śródbłonna (van der Zee *et al.* 1997; Wang *et al.* 2012).

Wyniki te pozostają w zgodzie z opisaną wcześniej analizą wpływu unaczynienia tkanki na jakość przeszczepu i korespondują z wynikami innych badaczy stosujących wybrane czynniki poprawiające angiogenezę w przeszczepianej tkance (Gao *et al.* 2013; Wang *et al.* 2012; Kong *et al.* 2017a; Manavella, Cacciottola, Pommé, *et al.* 2018).

### 6.3 *Ocena żywotności tkanki. Występowanie obszarów zmienionych fibrotycznie i nekrotycznie. Apoptoza w komórkach przeszczepionych tkanek jajników. Wpływ osocza bogatopłytkowego zachowanie żywotności przeszczepionej tkanki.*

W literaturze związanej z zamrażaniem i transplantacją tkanki jajnika dobrze udokumentowano, że powolne zamrażanie tak jak i witrifikacja tkanek powoduje nieuniknione uszkodzenia (Sanfilippo *et al.* 2015; Lee *et al.* 2019; Zhao *et al.* 2019). Jak wspomniano wcześniej, procedura przygotowania tkanki do zamrożenia polega

m. in na zachowaniu równowagi pomiędzy pozytywnym aspektem zachowania jak największego skrawka tkanki, a co za tym idzie – prawidłowej struktury fizycznej, a przygotowaniu odpowiednio cienkiego skrawka tkanki, aby umożliwić najskuteczniejsze przenikanie krioprotektantów, a co za tym idzie prawidłowy proces zamrażania (Kolbe, Walter and Rulicke, 2019). Metoda powolnego mrożenia jest preferowana w konserwacji tkanek ludzkich jajników, ze względu na mniejszą dawkę krioprotektantów potrzebnych podczas zabiegu, a tym samym mniejszą toksyczność procedury (Lee *et al.*, 2019). Witryfikacja jest mniej popularną metodą kriokonserwacji tkanki jajnika, chociaż udowodniono jej przydatność i skuteczność (Sanfilippo *et al.* 2015; Barbato *et al.* 2018). W opisywanym w poniższej dysertacji badaniu, został wykorzystany protokół witryfikacji opisany przez Youm *et al.* (2013).

W trakcie analizy histologicznej zauważono niewielki odsetek poważnych uszkodzeń tkanki, m. in obecność zdeformowanych pęcherzyków, co jest prawdopodobnie nieuchronną konsekwencją procesu kriokonserwacji.

Część skrawków otrzymanych z tkanek zwierząt doświadczalnych została więc przeznaczona na obiektywną analizę żywotności tkanki. Na preparatach histologicznych, wybarwianych metodą trójbarwną wg. Massona, oceniane było także występowanie i procent obszaru zmian włóknistych i nekrotycznych (w odniesieniu do powierzchni danej tkanki) świadczących postępującej degeneracji przeszczepionej tkanki. Wyniki otrzymane w doświadczeniu zdają się wskazywać na większy procent obszarów zmienionych w grupach kontrolnych, nie są to jednak różnice statystycznie istotne w żadnej z grup czasowych ( $p > 0,05$  dla: D2, D7), ani w porównaniu z tkanką nie poddaną przeszczepowi (D0).

W badaniu Ru An *et al.*, opisującym wpływ mikrocząsteczek plastiku (badanie prowadzone *in vivo*, ekspozycja została przeprowadzona w formie spożywania przez zwierzęta wody zawierającej cząsteczkę mikroplastiku) na jajniki, prowadzonym na szczurach stwierdzono, że stres oksydacyjny, któremu podlegała tkanka jajnika, spowodował zwiększenie włóknienia tkanki, a w konsekwencji obniżenie liczebności pęcherzyków i zmniejszenia ekspresji AMH (ang. *anti-Mullerian hormone*) (An *et al.*, 2021). Biorąc pod uwagę wyniki analizy unaczynienia tkanek, być może, w przeprowadzonym w niniejszej dysertacji doświadczeniu, miała miejsce podobna zależność zwłóknienia fragmentu tkanki na skutek występującego stresu oksydacyjnego komórek. Zależność ta polega na aktywacji tzw. mechanizmu uszkodzenia na tle niedotlenienia i niedokrwienia / reperfuzji (ang. *ischemia/reperfusion injury*). Stres oksydacyjny może nastąpić w wyniku

przejściowego stanu niedożywienia i niedotlenienia tkanki. Po przedłużającym się okresie niedotlenienia, komórki zmieniają metabolizm na beztlenowy, produkując niższy poziom ATP (adenozyno-trój-fosforan) i antyoksydantów, w efekcie wchodząc w stan kwasicy metabolicznej. Ponadto na powierzchni błony komórkowej takich komórek, obniża się funkcjonalność pomp sodowo potasowych (ATP-aza  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) oraz wapniowych (ATP-aza  $\text{Ca}^{2+}$ ), powodując kaskadę akumulacji kationów wodoru, potasu i wapnia i hiperosmolalność cytoplazmy. Napływ wody do komórki powoduje obniżenie aktywności enzymów oraz rybosomów i zmniejszenie syntezy białek. Komórka pozostająca w wyżej opisanym stanie, posiada znacznie obniżoną koncentrację czynników przeciwutleniających, a także zmniejszoną reaktywność na zmiany środowiska, co naraża ją na uszkodzenia i indukcję szlaku apoptozy. Dzieje się tak, kiedy w wyniku reperfuzji tkanki, wraz z krwią i substancjami odżywczymi, poziom wolnych rodników tlenowych raptownie się zwiększa (Sinning, Westermann, and Clemmensen 2017).

Opisywany powyżej mechanizm mógłby tłumaczyć zaobserwowaną tendencję do włóknienia tkanki, prezentowaną przez grupy kontrolne. Jeżeli przyjąć wyniki uzyskane podczas analizy unaczynienia, zwiększona liczba naczyń i szybsze tempo reperfuzji, spowodowały, że komórki tkanek traktowanych osoczem bogatopłytkowym były mniej narażone na mechanizm uszkodzenia na tle niedotlenienia/reperfuzji.

Opinie środowiska naukowego, na temat wpływu osocza bogatopłytkowego na stres oksydacyjny są jednak podzielone. Część doświadczeń prowadzonych na różnych modelach badawczych, wskazują na ochronny wpływ osocza na komórki narażone na stres oksydacyjny, niezależnie od tkanki (Martins *et al.* 2016; Bader *et al.* 2020; Ma *et al.* 2021). Aby w pełni umieścić badanie będące przedmiotem tej pracy w kontekście prac innych badaczy potrzeba by było przytoczyć mechanizm niedotlenienia i niedokrwienia / reperfuzji i efekty stresu oksydacyjnego na komórki tkanki jajnika. Niestety, w literaturze naukowej niewiele jest prac dotyczących stresu oksydacyjnego na tkance jajnika. Jedno z doniesień opisuje wstępne wyniki działania osocza bogatopłytkowego zastosowanego na jajniki policystyczne, na modelu szczurzym (Seyyed Anvari, Dehgan and Razi, 2019). Wyniki tej pracy, obejmujące poza oceną hormonalnych funkcji jajnika, także porównanie ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym, wskazują na pozytywne, ochronne działanie terapii osoczem bogatopłytkowym. Inni naukowcy nie potwierdzają jednak antyoksydacyjnego działania osocza bogatopłytkowego, nie znajdując w wynikach doświadczeń różnic istotnych statystycznie (Belebecha *et al.*, 2020) bądź wręcz wskazując na odwrotną tendencję (Hudgens *et al.*, 2016).

Stres oksydacyjny jest także przyczynkiem do zwiększonej apoptozy w komórkach narażonych na działanie wolnych rodników tlenowych. W celu weryfikacji metabolicznej kondycji przeszczepionych tkanek, a także porównania tkanek między sobą, przeprowadzono badanie apoptozy komórek metodą TUNEL (ang.: *terminal deoxynucleotide transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling of DNA fragments*).

W wyniku tego badania stwierdzono znaczne nasilenie procesów apoptotycznych w badanych tkankach w porównaniu do tkanki porównawczej (D0), widoczne jako wzrost liczby komórek odznaczających się jądrami apoptotycznymi.

W grupie krótkoterminowej, dwa dni po przeszczepie, zauważono nasilenie apoptozy we wszystkich badanych tkankach. Porównanie tkanek grupy D2 i tkanek grupy D0 wykazało, że proces ten odznaczał się istotnością statystyczną o mniejszym natężeniu w tkankach traktowanych osoczem (D2+PRP:  $p=0,027$ ) niż w tkankach kontrolnych (D2 kontrola:  $p<0,001$ ).

W grupach D7, siedem dni po przeszczepie, także wykazano istotne statystycznie różnice o podobnym charakterze co w poprzedniej grupie. W grupach tkanek przeszczepionych znajdowało się prawie dwukrotnie więcej komórek apoptotycznych niż w tkance porównawczej D0. Jednakże, porównanie wyników tkanek traktowanych osoczem bogatopłytkowym i tkanek kontrolnych również wskazuje na mniejsze nasilenie procesów apoptozy w tkankach traktowanych osoczem bogatopłytkowym (D7+PRP:  $p=0,011$ ) niż w tkankach kontrolnych (D7 kontrola:  $p<0,001$ ).

Powyższe wyniki wskazują na konsekwencje wykonania samej procedury kriokonserwacji, a następnie przeszczepienia tkanki, podczas której część komórek tworzących tkankę jajnika pod wpływem stresu kriogenicznego i czasowego niedokrwienia weszło w procesy prowadzące do apoptozy. Proces ten jest niemożliwy do uniknięcia podczas przeszczepów kriokonserwowanej tkanki, jednakże różnice, które wykazano poprzez porównanie tkanek z grupy badanej i kontrolnej, czyli po zastosowaniu różnego protokołu przygotowania wskazują na możliwość ograniczenia negatywnych efektów towarzyszących procedurze przeszczepu.

Różnica pomiędzy tkankami, które zostały potraktowane osoczem bogatopłytkowym, a ich tkankami kontrolnymi jest wyraźna już podczas porównania wyników jajników tych samych zwierząt w drugiej dobie od przeszczepu (D2kontrola vs D2 =PRP:  $p<0,001$ ). Ta sama tendencja zauważalna jest w siódmej dobie po przeszczepie tkanki (D7 kontrola vs D7+PRP:  $p<0,001$ ).

Wynik badania odsetka apoptozy w siódmej dobie można powiązać z wynikami liczby i gęstości naczyń. Z prezentowanych wyników można wysnuć wniosek, że dostatecznie rozbudowana sieć naczyń krwionośnych zapewnia odpowiednie odżywienie przeszczepionej tkanki, wynikiem czego jest zmniejszenie nasilenia śmierci komórek przeszczepionej tkanki.

Innym mechanizmem, który mógł przyczynić się do lepszej przeżywalności komórek tkanki przeszczepionego jajnika, a który mógłby tłumaczyć różnicę w wynikach tkanek traktowanych osoczem i kontrolnych, jest obecność białek osocza dostarczających składników odżywczych tkance przed utworzeniem sieci funkcjonalnych naczyń krwionośnych. Wyższy poziom czynników proangiogennych, takich jak VEGF powoduje zwiększenie przepuszczalności naczyń w tkankach organizmu biorcy otaczających przeszczep (Wang *et al.*, 2012). Powstały wysięk zawiera białka osocza, które wytrącają obecną w tkance fibrynę tworząc tymczasowy zręb tkanki, a także zapewniają odżywienie nieukrwionego przeszczepu (van der Zee *et al.*, 1997). W następstwie zwiększonej proliferacji śródbłonna i utworzenia tymczasowego zrębu fibrynowego powstaje szkielet przyszłej sieci funkcjonalnych naczyń krwionośnych łączących organizm z przeszczepioną tkanką (Chen, Tan and Tzeng, 2014).

Wszystkie powyżej opisane mechanizmy łączą się z istotnością ukrwienia tkanki i szybkością odbudowy sieci naczyń w tkance przeszczepu. Wyniki uzyskane w badaniu stanowiącym podstawę tej pracy zdają się potwierdzać tezę o pozytywnym działaniu osocza bogatopłytkowego na utrzymanie żywotności tkanki i zmniejszenia apoptozy komórek przeszczepionej tkanki.

#### 6.4 *Ekspresja mRNA genów związanych ze endokrynną funkcją jajnika. Ocena wpływu osocza bogatopłytkowego na zachowanie funkcjonalności osi podwzgórze-jajnik oraz na wewnętrzne procesy regulacyjne jajnika.*

Kolejnym etapem badania efektywności przeszczepu w proponowanym modelu była analiza ekspresji genów związanych z funkcją wydzielniczą jajnika.

Badanie ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowego miało na celu stwierdzenie obecności i poziomu ekspresji receptorów dla najważniejszych hormonów regulujących czynności jajnika. W ten sposób oznaczono aktywność wydzielniczą

i responsywność przeszczepionej tkanki, a co za tym idzie jej funkcjonalność jako gruczołu dokrewnego (Tang *et al.*, 2019). Wyniki ekspresji porównywano z jajnikiem kontrolnym, tj. jajnikiem pozyskanym ze szczura w fazie *diestrus* cyklu rujowego i poddanym jedynie procesowi witrifikacji i rozmrożenia.

Gonadotropiny są hormonami wydzielanymi z przedniego płata przysadki mózgowej, niezbędnymi w regulacji rozwoju jajników, a także dalszych czynności tego narządu: steroidogenezy i gametogenezy. Podczas gdy hormon folikulotropowy (FSH) promuje rozwój pęcherzyków jajnikowych, hormon luteinizujący (LH) reguluje przedowulacyjne dojrzewanie oocytów, owulację i późniejsze utworzenie ciała żółtego (Barros and Gustafsson, 2011).

Receptory FSH i LH w jajniku są receptorami sprzężonymi z białkami G, które aktywują kinazy białkowe działając przez mechanizmy szlaku cyklicznego adenylozomonofosforanu (ang. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP). Kolejne istotne etapy odpowiedzi na gonadotropiny odbywają się poprzez aktywację lub hamowanie czynników transkrypcyjnych niezbędnych do ekspresji genów w pęcherzykach. Receptory estrogenowe, klasyczne regulatory transkrypcji, odgrywają kluczową rolę w regulacji wydzielania gonadotropin z osi podwzgórze-przysadka oraz funkcji gonadotropin w narządach docelowych, takich jak jajnik (Lee *et al.*, 2021).

Estrogen jest hormonem o działaniu systemowym. Receptory estrogenowe *alfa* i *beta* (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) podlegają ekspresji w tkankach całego ciała, nie wyłączając mózgu, tkanki łącznej, tarczycy, wątroby i oczywiście gonad oraz macicy (Pelletier, 2000). Estrogen w jajniku jest zatem hormonem niezbędnym w regulacji wzrostu i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych. Estrogen działa również stymulująco na proliferację komórek ziarnistych. Obecność estrogenu zwiększa poziom receptorów dla gonadotropin w warstwie granulozy, przyczyniając się do powstania sprzężenia zwrotnego dodatniego i, w efekcie, do zwiększenia czułości komórek pęcherzyka na regulację zewnętrzną. Kaskada dojrzewania pęcherzyka, napędzana przez hormony steroidowe zwiększa nie tylko liczbę komórek ziarnistych, ale także stymuluje je do produkcji androgenów, dojrzewania oocytu i w efekcie utworzenia pęcherzyka antralnego gotowego do owulacji (Sar and Welsch, 1999). Oba typy receptorów, w jajniku szczura podlegają ekspresji w różnych rejonach pęcherzyków i jajnika. Receptor ER $\alpha$  podlega niezmiennej ekspresji w całym jajniku, zwłaszcza w komórkach zrębu i osłonki pęcherzyka bez względu



na typ pęcherzyka i cykl rujowy. Natomiast receptor ER $\beta$  jest kluczowym regulatorem wzrostu pęcherzyków (Fitzpatrick *et al.* 1999; Chakravarthi *et al.* 2021). Badania prowadzone na tkankach różnych gatunków wskazują, że podlega on zwiększonej ekspresji w komórkach granulozy pęcherzyków pierwszorzędowych i wzrastających, a następnie ekspresja jego zmniejsza się w pęcherzykach przedowulacyjnych (Byers *et al.* 1997; Sar and Welsch 1999; Pelletier 2000; Co więcej, wyniki doświadczeń na myszach pozbawionych genu receptora typu *alpha* wskazują, że receptor ten nie jest niezbędny do procesu dojrzewania pęcherzyków, chociaż brak tego receptora powoduje bezpłodność u obu płci (Lubahn *et al.* 1993; Korach 1994), natomiast brak receptora typu *beta* blokuje dojrzewanie oocytów i pęcherzyków powyżej poziomu pęcherzyka wzrastającego (Barros and Gustafsson, 2011; Lee *et al.*, 2021).

Receptor progesteronowy (ang.: *progesterone receptor*, PGR), usytuowany jest w jądrach komórek ziarnistych pęcherzyków owulacyjnych. PGR jest kluczowym elementem owulacji u większości zwierząt i ludzi. Ekspresja PGR jest prowokowana przez wyrzut przysadkowego hormonu luteinizującego (LH). Dalszy mechanizm promujący ekspresję PGR w wybranych pęcherzykach nie jest dokładnie poznany, niemniej wiadomo, że swój udział ma aktywacja kinazy białkowej typu A i szlak regulatorów transkrypcji Sp1/Sp3 (ang.: *specificity protein 1/3*) (Robker, Akison and Russell, 2009). Receptor progesteronowy jest także kluczowym czynnikiem redukującym stan zapalny powstały w jajniku w wyniku owulacji (Park *et al.* 2020).

Badanie opisane w niniejszej dysertacji zawiera analizę ekspresji mRNA receptorów: progesteronowego, a także obu receptorów estrogenowych *alpha* i *beta*. Miała ona na celu niezależną ocenę metabolicznej aktywności przeszczepionych tkanek. Analiza ekspresji receptora estrogenowego typu *alpha* dostarczyła informacji o funkcjonalności metabolicznej komórek stromy jajnika. Analiza receptora estrogenowego typu *beta* miała na celu określenie aktywności żywotnych pęcherzyków pierwszorzędowych, drugorzędowych (wzrastających) i antralnych. Analiza poziomu ekspresji receptora progesteronowego miał posłużyć jako niezależny marker obecności pęcherzyków antralnych zdolnych do owulacji.

Wyniki analizy ekspresji mRNA wskazują na nieistotne statystycznie zmiany w profilu ekspresji jajników po 2 dniach od przeszczepu (grupy D2) w porównaniu do jajnika

kontrolnego (mrożonego). Statystycznie istotna różnica była zauważalna pomiędzy ekspresją w jajnikach z grupy badanej siedem dni po przeszczepie (D7 PRP, D7 kontrola). W przypadku receptora ER $\alpha$ , którego ekspresja związana jest z komórkami nabłonka, zrębu i osłonek pęcherzyków, a więc z ogólną liczbą komórek funkcjonujących w jajniku, w siódmym dniu po przeszczepie obie przeszczepione tkanki wykazywały obniżony poziom ER $\alpha$  względem tkanki porównawczej. Różnica pomiędzy tkanką porównawczą D0, a tkanką traktowaną osoczem była jednak mniej istotna ( $p=0,04$ ), niż różnica pomiędzy tkanką porównawczą D0 i kontrolną D7 ( $p=0,001$ ). Wyniki wskazują na istotny wpływ osocza bogatopłytkowego na utrzymanie się jakości przeszczepionej tkanki, co potwierdza sama różnica pomiędzy grupą traktowaną PRP i kontrolną u tych samych zwierząt ( $p=0,047$ ).

Ekspresja drugiego z receptorów estrogenowych, estrogenowego receptora *beta* była prawie dwukrotnie wyższa (niezależnie od grup czasowych) niż ekspresja receptora typu *alpha*, co pozostaje w zgodzie z prawidłowym profilem ekspresji tych receptorów w jajniku szczura (Fitzpatrick *et al.* 1999; Sar and Welsch 1999; Pelletier 2000; Chakravarthi *et al.* 2021). Ekspresja tego receptora pozostała niezmienną w grupach po dwóch dniach od przeszczepu (D2 +PRP, D2 kontrola) w relacji do jajników porównawczych, co wskazuje na brak istotnych statystycznie zmian w liczbie aktywnych metabolicznie pęcherzyków jajników. ER $\beta$  jest wydzielany przez komórki ziarniste, ale jego ekspresję wykazują głównie komórki pęcherzyków drugorzędowych i antralnych, stanowiących pulę aktywnych pęcherzyków w jajniku (Agca, Lucy and Agca, 2009; Cacciottola *et al.*, 2020; Shams Mofarahe, Ghaffari Novin and Salehnia, 2020). Wyższa ekspresja tego receptora w tkankach jajników po 7 dniach od przeszczepu wskazuje na zmianę aktywności metabolicznej w tkance poprzez wzrost liczby pęcherzyków wzrastających. Różnica ekspresji receptora estrogenowego *beta* pomiędzy tkanką porównawczą D0, a tkanką D7 traktowaną PRP jest jednak nieistotna statystycznie ( $p=0,38$ ), w przeciwieństwie do porównania pomiędzy tkanką D0, a tkanką kontrolną D7 ( $p=0,001$ ). Porównanie samych wyników z grupy D7 u tych samych zwierząt także wskazuje na istotny wpływ osocza bogatopłytkowego na zwiększenie ekspresji ER $\beta$  w tkankach kontrolnych ( $p=0,038$ ). Wyniki te są spójne z wynikami obliczeń liczby pęcherzyków drugorzędowych i antralnych w przeszczepionych tkankach, które wskazują na wyższą liczbę pęcherzyków wzrastających w tkankach kontrolnych, w porównaniu z tkankami traktowanymi osoczem bogatopłytkowym.

Podobną tendencję można zauważyć porównując wyniki ekspresji receptora progesteronowego. Ponownie porównanie ekspresji tego receptora w tkankach grup D2 z jajnikiem porównawczym D0 nie wykazało istotnych statystycznie różnic. W badaniu ekspresji tkanek pochodzących od zwierząt z grupy D7, w jajnikach z próby kontrolnej, w których stwierdzono wyższy odsetek pęcherzyków antralnych, zaobserwowano wyższą ekspresję PGR niż w jajnikach z tej samej grupy czasowej traktowanych osoczem bogatopłytkowym ( $p=0,009$ ). Podczas analizy wyników ekspresji receptora progesteronowego należy jednak zwrócić uwagę, że relatywny poziom ekspresji w tkankach był bardzo niski (w porównaniu do ekspresji pozostałych badanych receptorów), na granicy czułości użytego aparatu. Istotność statystyczną porównania wyników tego receptora należy więc traktować ostrożnie.

### 6.5 *AMH – marker rezerwy jajnikowej*

Hormon antymullerowski (ang.: *anti-mullerian hormone*, AMH), znany również jako substancja hamująca Mullera należy do nadrodziny transformujących czynników wzrostu i różnicowania *beta* (TGF $\beta$ ) do której należą także aktywina, inhibina i białka morfogenetyczne kości (ang.: *bone morphogenetic proteins*, BMP). W przeciwieństwie do innych członków tej rodziny, którzy pełnią szeroki zakres funkcji w wielu tkankach, główną funkcją AMH jest indukowanie regresji przewodów Mullera i aktywacja w komórkach Sertoliego podczas różnicowania płci męskiej (Grootegoed, Baarends and Themmen, 1994; Josso, di Clemente and Gouédard, 2001).

AMH w nowoczesnej medycynie rozrodu pełni rolę biomarkera rezerwy jajnikowej, a jego oznaczenia są uznawane za lepiej korelujące z poziomem rezerwy jajnikowej niż dotychczas stosowana liczba pęcherzyków antralnych (ang.: *antral follicle count*, AFC) (Lew 2019; Bedenk, Vrtačnik-Bokal, and Virant-Klun 2020).

AMH w jajniku pełni rolę modyfikatora wzrostu i rekrutacji pęcherzyków, uczestnicząc w dwóch krytycznych punktach selekcji rozwoju pęcherzyków: hamuje rekrutację pęcherzyków pierwotnych do puli pęcherzyków wzrastających, a także, działając przez kompleks swoich receptorów (AMH + AMHR1 + AMHR2) zmniejsza reaktywność wzrastających pęcherzyków na hormon folikulotropowy (FSH) blokując ich dalszy wzrost (Grootegoed, Baarends and Themmen, 1994; Josso, di Clemente and Gouédard, 2001; Durlinger, Visser and Themmen, 2002; Bedenk, Vrtačnik-Bokal and Virant-Klun, 2020).

Wyniki analizy ekspresji mRNA hormonu antymullerowskiego oraz jego receptora typu pierwszego (AMHR1), w opisywanym w tej pracy badaniu wskazują na wyraźną, istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupami badanymi i kontrolnymi D2 ( $p < 0,001$ ) wskazującą na wyższy poziom ekspresji AMH w grupie traktowanej osoczem bogatopłytkowym. W grupach D7 występuje podobna, choć słabiej zaznaczona, tendencja ( $p = 0,02$ ). Co ciekawe, nie znaleziono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą traktowaną osoczem D2 i jajnikiem porównawczym D0, natomiast porównania wszystkich innych tkanek wykazywały wysoką istotność statystyczną i obniżenie ekspresji AMH względem jajnika porównawczego (D2 kontrola:  $p = 0,003$ ; D7 kontrola:  $p < 0,001$ ; D7+PRP:  $p < 0,001$ ). Analiza ekspresji receptora AMHR1 nie wykazała istotności statystycznej w żadnym z porównań ekspresji, a poziom mRNA tego czynnika pozostawał na granicy detekcji.

Poziom AMH jest uważany za reprezentatywny marker rezerwy jajnikowej, a także za wyznacznik żywotności jajnika. Coraz powszechniej wykonywane w diagnostyce medycznej płodności kobiet oznaczania markera AMH przyniosło zaskakujące wyniki. Pacjentki dotknięte zespołem policystycznych jajników (ang.: *polycystic ovary syndrome*, PCOS) posiadały wysokie oznaczenia poziomu AMH w surowicy (Wiweko *et al.* 2018; Dewailly *et al.* 2020; Rudnicka *et al.* 2021). Co prawda, wysoki wynik biomarkera rezerwy jajnikowej powinien wskazywać na wysoką liczbę pęcherzyków, co jest pozytywnym markerem płodności. Z drugiej jednak strony, policystyczność jajników jest cechą patologiczną, związaną z obniżeniem płodności (Teede *et al.* 2019; Rudnicka *et al.* 2021), chociaż nie wpływa na jakość otrzymywanych oocytów (Nikbakht *et al.*, 2021).

Ma to istotne znaczenie dla wyników omawianego badania. Z jednej strony, analiza poziomu ekspresji AMH wskazuje na pozytywny efekt działania osocza bogatopłytkowego, pozostając w korelacji z ogólną liczbą wszystkich pęcherzyków, zatem dowodząc zachowania rezerwy jajnikowej w grupach traktowanych osoczem bogatopłytkowym.

Z drugiej strony, analizując poziom wydzielania AMH w zależności od typu pęcherzyków (Durlinger, Visser and Themmen, 2002; Jeppesen *et al.*, 2013), widzimy wyraźnie większą sekrecję tego czynnika przez duże pęcherzyki drugorzędowe i antralne, co wskazuje na załamanie równowagi typu pęcherzyków w jajniku na rzecz pęcherzyków wzrastających. Taka charakterystyka jest już związana z opisywanym wcześniej syndromem wypalania rezerwy pęcherzykowej (ang. *burnout syndrome*), a więc negatywnym markerem jakości i prognozy przeżycia przeszczepionej tkanki (Roness *et al.*,

2013). Najwyższy poziom ekspresji AMH wykazywały jajniki porównawcze (poddane tylko mrożeniu) i jajniki traktowane osoczem z grupy D2, pomimo relatywnie niższej niż w grupie kontrolnej liczbie pęcherzyków wzrastających (drugorzędowych) i antralnych. Jeżeli jednak do puli pęcherzyków wydzielających AMH dodać pęcherzyki pierwszorzędowe, które wg. Jeppesen także wydzielają wysokie stężenia tego czynnika, relatywny poziom AMH pozostanie w korelacji z ogólną liczbą pęcherzyków prezentowaną na wynikach analizy histologicznej (Jeppesen *et al.*, 2013).

#### 6.6 Ocena efektów długofalowych: grupa D30

W celu oceny długoterminowego efektu przeszczepu tkanki jajnikowej, ze zwierząt biorących udział w badaniu wydzielono trzecią grupę szczurów, które zostały poddane eutanazji po 30 dniach od przeszczepu tkanki. Szczury z tej grupy były codziennie monitorowane w celu określenia cyklu rujowego za pomocą wymazów waginalnych (Barrett *et al.* 2018; Ajayi and Akhigbe 2020).

Ocena wyników doświadczenia długoterminowego jest problematyczna. Z grupy pięciu szczurów, dwa zaprezentowały pełne objawy cyklu rujowego (potwierzonego wymazem cytologicznym z pochwy). Pozostałe samice, pomimo całkowitej, ogólnej rekonwalescencji nie wykazały objawów fazy *estrus* cyklu. Po wykonaniu preparatów histologicznych poddanych tej samej ocenie co reszta próbek grupy doświadczalnej (m. in: barwienie trójbarwne wg. Massona, TUNEL) zauważono wyraźną różnicę w żywotności i histologii przeszczepionej tkanki. Tkanki jajników pochodzące od szczurzy, u których potwierdzono powrót cyklu *estrus*, posiadały zachowaną histologicznie strukturę jajnika wraz z prawidłowymi morfologicznie pęcherzykami wszystkich typów (pierwotne, pierwszorzędowe, drugorzędowe/wzrastające i antralne), natomiast tkanki pochodzące od pozostałych zwierząt z grupy D30 wykazywały cechy zwłóknienia, przerastania tkanką tłuszczową i posiadały cechy zaawansowanej apoptozy. Podobne wyniki otrzymano w przypadku oznaczenia mRNA wybranych markerów funkcji jajnika: w próbkach pochodzących z tkanek zwierząt wykazujących fizjologiczny powrót cyklu otrzymano wyniki ekspresji wszystkich wybranych genów. U pozostałych zwierząt wyniki ekspresji były nieklasyfikowalne lub występowały poniżej poziomu detekcji. Analiza wyników jest więc nieistotna statystycznie, ze względu na niejednorodność badanej grupy (Bedyńska, Niewiarowski and Cypryańska, 2013).

Zwierzęta doświadczalne pochodziły z jednego szczepu, były w jednym wieku i takiej samej kondycji zdrowotnej, a operacje przeprowadzane przez ten sam zespół badawczy, co powinno zminimalizować efekt heterogeniczności. Zaobserwowana w doświadczeniu różnorodność wyników długofalowej aktywności przeszczepionej tkanki ma, jednakże, swoje odzwierciedlenie w przypadkach praktyki klinicznej. U pacjentek, u których przeprowadzono procedurę wszczepienia autologicznej tkanki jajnika, powrót miesiączki, uznany jako jeden z podstawowych markerów funkcjonalności tkanki, może nastąpić od 2 miesięcy do nawet 1 roku po operacji (Poirot *et al.*, 2019; Sheshpari *et al.*, 2019b). Sam przeszczep może zachowywać swoją funkcjonalność nawet do 8 lat po transplantacji (Andersen *et al.*, 2012), lub utracić aktywność pół roku po zabiegu (Sheshpari *et al.*, 2019a). Przyczyny zmienności efektu transplantacji tkanki jajnika mogą być różne. Jednym z prawdopodobnie negatywnych czynników prognostycznych jakości tkanki, a co za tym idzie sukcesu przeszczepu i odzyskania aktywności endokrynalnej i płodności jest mutacja genu BRCA. Wpływ mutacji tego genu na płodność i rezerwę jajnikową, a także na sukces procedury zachowania płodności u pacjentek jest szeroko badany (Amy Louise Winship *et al.* 2019), jednakże pozostaje bez jednoznacznej odpowiedzi (Ghunaim *et al.*, 2020).

Nie bez znaczenia jest także miejsce, w które tkanka jajnika zostaje wszczepiona podczas procedury zachowania płodności. Odpowiednie techniki chirurgiczne i optymalne miejsca przeszczepu były szeroko omawiane w literaturze. Metody heterotopowe, w tym podskórne, brzuszne, domięśniowe itp. były szeroko badane w modelach zwierzęcych (Yang *et al.* 2008b; Wang *et al.* 2012, 2013; Gao *et al.* 2013; Chen *et al.* 2014; Kong *et al.* 2017a; Lee *et al.* 2017), a także ludzkich (Kim, Hwang, and Lee 2004; Samuel Kim 2012; Oktay *et al.* 2019) natomiast lokalizacje około i ortotopowe (do pozostałego jajnika, na jajnik, w okolicie więzadła szerokiego macicy, do otrzewnej miednicy) są najbardziej obiecujące dla przywrócenia płodności pacjentek (Silber 2016; Lotz *et al.* 2019; Takae and Suzuki 2019).

Wyłącznie przeszczepy ulokowane ortotopowo są procedurą stwarzającą prawdopodobieństwo naturalnego poczęcia (Donnez *et al.* 2004; Andersen *et al.* 2012; Lotz *et al.* 2019; Sheshpari *et al.* 2019b) i pozwoliły na większość żywych urodzeń u pacjentek po operacji przeszczepienia tkanki.

W badaniach prowadzonych na zwierzętach, heterotopowe miejsca wszczepienia tkanki (na przykład podskórnie lub domięśniowo) są preferowane ze względu na łatwiejszą procedurę chirurgiczną i możliwość monitorowania *in vivo* rozwoju pęcherzyków (Schnorr *et al.* 2002; Tavana *et al.* 2017; Lee *et al.* 2017; Manavella, Cacciottola, Pomme, *et al.*

2018). Celem modelu badawczego prezentowanego w tej dysertacji, było zbadanie przeżywalności przeszczepu w środowisku jak najbardziej zbliżonym do ortotopowego, aby stworzyć model zbliżony do procedury wykonywanej w medycynie ludzkiej.

W prezentowanym badaniu przeszczepiono tkanki jajnika na najbardziej unaczyniony brzeg więzadła szerokiego macicy, co było celową praktyką, ukierunkowaną na zminimalizowanie rozdzielania tkanek i ułatwienie procesu neowaskularyzacji. Dodatek osocza bogatopłytkowego w postaci medium, w którym tkanka została inkubowana bezpośrednio przed wszczepieniem, a także w postaci iniekcji podawanych bezpośrednio na miejsca przeszczepów, zgodnie z opisanymi powyżej wynikami, okazał się przyspieszać postęp neowaskularyzacji, co zaowocowało większym unaczynieniem tkanek i zwiększeniem liczby pęcherzyków w tkankach grup D2 i D7 w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie jest jednak jasnym jaki efekt na przeszczep miała zastosowana praktyka w ocenie długoterminowej. W celu zminimalizowania błędów heterogeniczności, każdemu zwierzęciu przeszczepiono zarówno własną tkankę jajnika traktowaną osoczem (prawy jajnik) i tkankę jajnika kontrolną (lewy jajnik). Ten model badania okazał się przydatny do obserwacji krótkoterminowej (D2) i średnioterminowej (D7), lecz utrudniał obiektywną ocenę w przypadku oceny długoterminowego wpływu PRP na przeszczep. Model badania okazał się także problematyczny w przypadku rozważanej analizy ogólnoustrojowego wpływu zastosowanej metody, np. przez badanie krwi. Problem ten dotyczy zwłaszcza zwierząt z grupy D30, u których nie stwierdzono powrotu cyklu rujowego za pomocą analizy wymazów waginalnych. Ze względu na występujące u nich przerastanie tkanki wszczepionej tkanką tłuszczową oraz zwłóknienia, rozdzielanie fragmentów przeszczepionych tkanek od siebie i tkanek je otaczających stanowiło pewną trudność. Należy wspomnieć, że zwłóknienie tkanki jest procesem naturalnym i cechą charakterystyczną jajników starszych zwierząt. W badaniu Lliberos *et al.* prowadzonym na myszach, dowiedziono, że starsze samice myszy posiadają podwyższony poziom cytokin prozapalnych (IL-6; IL-18, TNF $\alpha$ ) w surowicy (Lliberos *et al.*, 2021). Środowisko chronicznego stanu zapalnego, charakterystyczne dla starzejącego się organizmu, działa także na organy takie jak jajnik, prowadząc do podwyższenia lokalnej ekspresji cytokin prozapalnych, a w następstwie do podwyższonej produkcji kolagenu i zwłóknienia jajnika. Wielokrotne owulacje, które są również związane są z przejściowym stanem zapalnym, mediowanym przez progesteron (Park *et al.*, 2020) powodują utratę wydolności mechanizmów przeciwzapalnych tkanki. W trakcie kolejnych cykli estrus liczba

pęcherzyków, a także aktywność metaboliczna i ekspresja czynników modulujących stan zapalny zmniejsza się, co przyczynia się do zwiększenia wrażliwości organu na włóknienie (Lliberos *et al.*, 2021).

Analiza preparatów histologicznych w.w szczurów spowodowała więc pytanie o możliwość reakcji zapalnej po przeszczepie, której konsekwencje, w dalszym czasie, mogłyby powodować włóknienie i przerastanie tkanką tłuszczową. Obraz ten, charakterystyczny dla jajników starszych osobników mógłby oznaczać uboczny efekt procedury w postaci przedwczesnej utraty funkcji jajników, podobnej do opisywanego w medycynie ludzkiej zespołu POF (ang.: *premature ovarian failure*), związanego z przedwczesną menopauzą (Sullivan *et al.* 2016; Bryson *et al.* 2022).

Rozszerzeniem prowadzonego doświadczenia było więc przeprowadzenie dodatkowej próby ekspresji mRNA czynnika martwicy nowotworów *alpha* (ang.: *tumor necrosis factor alpha*, TNF $\alpha$ ), jako markera stanu zapalnego tkanek (Bradley, 2008). Co ciekawe, wyniki otrzymane we wszystkich grupach krótkoterminowych wskazują na wyraźnie wyższy odczyn zapalny w tkankach traktowanych osoczem bogatopłytkowym, zarówno w grupie po dwóch jak i po siedmiu dniach od przeprowadzenia przeszczepu. Grupa długoterminowa D30 reprezentowała wyniki nie stanowiące jednorodnej grupy, a więc nie spełnia wymagań istotności statystycznej, niemniej jednak, w przypadkach dwóch zwierząt, u których został stwierdzony powrót cyklu, marker zapalenia utrzymywał się na poziomie zbliżonym do poziomu prezentowanego przez tkankę porównawczą (kriokonserwowaną, nie przeszczepioną).

Co ciekawe, lokalny wzrost ekspresji markerów zapalenia (w tym TNF $\alpha$ ) jest opisywany jako jedna z konsekwencji zastosowania osocza bogatopłytkowego jako czynnika przyspieszającego gojenie ran (Borrione *et al.* 2015). Płytki osocza zawierają wysokie stężenia czynników wzrostu i cytokin, które mogą pełnić kluczową rolę w procesie gojenia poprzez modulację odpowiedzi zapalnej (Sanchez-Gonzalez, Mendez-Bolaina and Trejo-Bahena, 2012). Wysokie stężenia czynników wzrostu i cytokin aplikowane miejscowo zwiększają napływ komórek zapalnych, co tłumaczyłoby zwiększoną ekspresję TNF $\alpha$  w grupach D2+PRP i D7+PRP. Dalsze działanie czynników wzrostu i makrofagów zwiększa przepuszczalność naczyń włosowatych i sekrecję białek osocza, które w następstwie odżywiają przeszczepioną tkankę (van der Zee *et al.*, 1997). W efekcie, pomimo podwyższonych markerów reakcji zapalnej, sama przeszczepiona tkanka pozostała lepiej odżywiona, a wyższe stężenie czynników wzrostu, w tym czynników



wzrostu naczyń spowodowała szybszą penetrację naczyń krwionośnych i utworzenie funkcjonalnej sieci naczyń. Przedstawiona hipoteza nie tłumaczy jednak zróżnicowania efektu długofalowego przeszczepu w grupie D30. Być może czynnikiem decydującym o długotrwałym sukcesie transplantu była wyjściowa jakość tkanki jajnika danych szczurów, na wzór występującej u ludzi zależności od ekspresji mutacji genu BRCA (Winship *et al.* 2019; Ghunaim *et al.* 2020). Niestety, jednym z ograniczeń opisywanego w niniejszej dysertacji badania była mała liczba zwierząt poddanych procedurze, dlatego dane uzyskane w doświadczeniu należy traktować jako wynik badania pilotażowego, przeprowadzonego w celu uzyskania przydatnych wskazówek do przyszłych analiz mających na celu zbadanie długoterminowego wpływu PRP na przeszczepy jajników.

Jak wspomniano we wstępie do tego opracowania, przeszczep tkanki jajnika mający na celu przywrócenie płodności i czynności hormonalnej u kobiet, jest tematem zyskującym coraz większe zainteresowanie specjalistów rozrodu z całego świata. Próby poprawienia jakości przeszczepu, utrzymania jego żywotności i skrócenia okresu niedokrwienia i niedotlenienia są tematem badań wielu jednostek naukowych. Dotychczasowe próby badawcze, przeprowadzane na modelach zwierzęcych obejmowały zastosowanie różnych, wyizolowanych czynników wzrostu (Wang *et al.* 2012; Gao *et al.* 2013; 2013 Kong *et al.* 2017a), a także komórek macierzystych (Manavella, Cacciottola, Pomme, *et al.* 2018; Dolmans *et al.* 2019; Huang *et al.* 2019; Ling *et al.* 2019; Bahrehbar *et al.* 2020; Cacciottola *et al.* 2020; Chen *et al.* 2021) na efektywność i żywotność przeszczepu tkanki jajnika. Grupa naukowców z Chin przeprowadziła nawet doświadczenie badające wpływ czerwonej szalwii (*Salvia miltiorrhiza* z rodzaju *Salvia*) na poprawę unaczynienia i w efekcie jakości przeszczepu na modelu ksenogenicznym ludzkiego jajnika na myszy (Wu *et al.*, 2009, 2010). Innym podejściem do problemu jest próba odtworzenia środowiska jajnika w modelach trójwymiarowych hodowli tkanki *in vitro* (Pais *et al.*, 2021) lub stworzenie sztucznego narządu, w którym miano by implementować wyizolowane z tkanki jajnika pęcherzyki (Laronda *et al.*, 2017). Wszystkie te badania poszerzają wiedzę na temat fizjologii jajnika po przeszczepie i możliwości odzyskania płodności oraz poprawy jakości życia pacjentek onkologicznych i narażonych na przedwczesną utratę funkcji jajnika.

Według najlepszej wiedzy autorki, prezentowane w niniejszej dysertacji badanie jest pierwszą próbą przetestowania efektu osocza bogatopłytkowego na przeszczep kriokonserwowanej tkanki jajnika na translacyjnym modelu zwierzęcym.

Temat wykorzystania osocza bogatopłytkowego w terapii ginekologicznej zyskał zainteresowanie naukowców i klinicystów. Zainteresowanie wzbudziło, na przykład, zastosowanie osocza bogatopłytkowego w terapii zwiększenia receptywności i wzrostu endometrium (Chang *et al.* 2015; Aghajanova, Houshdaran, Balayan, Manvelyan, Juan C Irwin, *et al.* 2018; Bos-Mikich *et al.* 2019). Pierwsze badania nad wpływem osocza bogatopłytkowego na jajnik dotyczyły ochronnego wpływu osocza na jajnik dotknięty eksperymentalnym niedotlenieniem (Bakacak *et al.*, 2016). W 2017 roku zostało przeprowadzone pierwsze badanie przedkliniczne porównujące wpływ osocza bogatopłytkowego i surowicy bydłowej na izolowane jajniki ludzkie, prowadzące do wzrostu pęcherzyków w hodowli 3D *in vitro* (Hosseini *et al.*, 2017). We wrześniu 2018 roku, została opublikowana pierwsza praca<sup>1</sup> dokumentująca wyniki dojajnikowej iniekcji osocza bogatopłytkowego (Sills *et al.*, 2018). Autorzy opisują w niej pojedynczy przypadek przywrócenia płodności i transferu zarodka zakończonego ciążą (Sills *et al.*, 2018). Kolejne opisy przypadków opublikowane przez: Sfakinoudis *et al.* (Sfakianoudis, Simopoulou, and Nitsos 2019); Farimani *et al.* (2019); Pantos *et al.* (2019) oraz Hsu *et al.* (2020) potwierdzają pozytywny wpływ terapii osoczem bogatopłytkowym na przywrócenie czynności jajników prowadzącej do aktywnej folikulogenezy i produkcji dojrzałych oocytów, a nawet w paru przypadkach, do spontanicznych, zdrowych ciąż.

Dalsze badania na modelach zwierzęcych także eksplorują efekty wpływu terapii osoczem na jajniki, na przykład badanie przeprowadzone *in vivo* na jajnikach krów, dowiodło, że osocze bogatopłytkowe może wpłynąć na poprawę wyników indukowanej superowulacji (Cremonesi *et al.*, 2020). W 2020 roku zostało także opublikowane badanie przeprowadzone na szczurach traktowanych gonadotoksycznymi chemioterapeutykami,

---

<sup>1</sup> Atkinson w swoim przeglądzie wspomina o pracy Pantos *et al.* z 2016 roku opublikowanej w czasopiśmie *Human Reproduction* (Atkinson, Martin and Sturme, 2021). Praca miała być opisem 8 przypadków pacjentek dotkniętych perimenopauzą, u których zastosowano terapię osoczem bogatopłytkowym. Niestety, pomimo poszukiwań nie udało się odnaleźć tekstu źródłowego, a we wspomnianym zaszycie nr 31 tego periodyku nie zostaje wymieniona praca o tej tematyce, dlatego praca Sills *et al.* zostaje wymieniona jako pierwsza opublikowana praca w tym temacie, zgodnie z jej tytułem (Sills *et al.*, 2018).

dokumentujące poprawę czynności jajników po terapii osoczem bogatopłytkowym (Ahmadian *et al.*, 2020).

Pierwsze wyniki badania opisanego w powyższej dysertacji zostały zaprezentowane w formie posteru na konferencji SRR (ang.: *Society for the Study of Reproduction*), która odbyła się 18-23 czerwca 2019 roku w San Jose, w Kaliforni, w Stanach Zjednoczonej Ameryki oraz EVSSAR w Berlinie, w Niemczech, 28-29 czerwca 2019 roku. Badanie to wpisuje się więc w sam początek doniesień naukowych dotyczących wpływu osocza na tkankę jajnika w kontekście zachowania lub przywrócenia jego funkcji endokrynalnych i rozrodczych i jest pierwszym badaniem opisującym wpływ osocza na jajnik poddany kriokonserwacji.

Wyniki otrzymane w doświadczeniu wskazują, że proponowany protokół operacji, tj. inkubacja tkanki w osoczu bogatopłytkowym bezpośrednio przed operacją, a także w formie lokalnych iniekcji wydaje się łagodzić poziom stresu niedokrwiennego i śmierci tkanki poprzez promowanie i przyspieszenie procesu neowaskularyzacji tkanki, co także skutkuje zmniejszeniem utraty pęcherzyków rezerwy jajnikowej i zachowaniem prawidłowej struktury pęcherzykowej jajnika. Efekt długoterminowy proponowanego protokołu operacji pozostaje, jednakże, niesprecyzowany ze względu na nieistotne statystycznie wyniki.

Wnioski uzyskane w pracy mogą stanowić podstawę do dalszych badań i rozwoju metodologii przeszczepu tkanki jajnika jako jednej z metod zachowania płodności, niemniej jednak tematyka skuteczności terapii osoczem bogatopłytkowym, a także długofalowych konsekwencji jego zastosowania wymaga dalszych badań.



## 7. *Wnioski:*

1. Prezentowany model wzbogaconej osoczem bogatopłytkowym procedury autologicznego przeszczepu witrifikowanych tkanek jajnika z użyciem szczurów, opracowany i wykorzystany w niniejszej pracy badawczej umożliwia trafną i rzetelną ocenę wpływu osocza bogatopłytkowego na przeżywalność i funkcjonalność przeszczepionych tkanek.
2. Wzbogacenie badanej procedury poprzez dodatek osocza bogatopłytkowego przyspiesza neowaskularyzację, zwiększa obszar neowaskularyzacji oraz zachowuje fizjologiczny poziom procesów rekrutacji i hamowania wzrostu pęcherzyków w witrifikowanych tkankach jajnika, a także zmniejsza odsetek apoptozy w przeszczepionych tkankach, a co za tym idzie poprawia perfuzję, skraca okres wstrząsu niedokrwienego oraz umożliwia zachowanie funkcji hormonalnych i rozrodczych przeszczepianych tkanek jajnika.
3. Wzbogacenie procedury przeszczepu tkanek jajnika przez dodatek osocza bogatopłytkowego na etapie inkubacji po ogrzaniu oraz w formie iniekcji lokalnej w okolicy przeszczepu zwiększa efektywność autologicznego przeszczepu witrifikowanych tkanek jajnika.
4. Wzbogacenie procedury przeszczepu tkanek jajnika poprzez dodatek osocza bogatopłytkowego wywiera pozytywny krótko- i średnio- trwały wpływ na strukturę i funkcje witrifikowanych i przeszczepionych tkanek jajnika, a także znacznie ogranicza efekt wypalenia rezerwy pęcherzykowej.



## 8. Spis fotografii, rycin i tabel

### 8.1 Fotografie

|  |    |
|--|----|
| Fotografia 1. Pęcherzyki jajnikowe w poszczególnych stadiach rozwoju.....  | 68 |
| Fotografia 2. Tkanka jajnika. Analiza makroskopowa i histologiczna.....  | 68 |
| Fotografia 3. Przykładowa fotografia badania TUNEL na fragmencie tkanki jajnika<br>szczura z grupy D7.....                     | 77 |
| Fotografia 4. Zdjęcia tkanek jajnika pochodzących z grupy D7 barwionych metodą<br>immunohistochemiczną na obecność CD-31. .... | 79 |
| Fotografia 5. Cytologiczne wymazy waginalne pobrane od szczurów z grupy D30. ....  | 89 |

### 8.2 Ryciny

|   |    |
|---|----|
| Rycina 1. Graficzne przedstawienie liczby zdiagnozowanych przypadków<br>wystąpienia chorób nowotworowych z podziałem na nowotwory różnych typów<br>wśród kobiet w wieku. ....   | 21 |
| Rycina 2. Schemat ortotopcznego przeszczepu kriokonserwowanej tkanki jajnika..<br>.....   | 29 |
| Rycina 3. Schemat aktywacji płytek krwi. ....   | 43 |
| Rycina 4. Schemat doświadczenia stanowiącego przedmiot dysertacji.....  | 55 |
| Rycina 5. Porównanie ogólnej liczby pęcherzyków stwierdzonych w tkankach<br>jajników szczurów we wszystkich badanych grupach.....   | 69 |
| Rycina 6. Procentowy udział pęcherzyków poszczególnych stadiów rozwojowych w<br>tkankach jajników w analizowanych grup.....   | 70 |
| Rycina 7. Średnia liczba różnych typów pęcherzyków w grupie porównawczej (D0)<br>oraz w grupie traktowanej osoczem bogatopłytkowym (PRP) i grupie<br>kontrolnej w drugim dniu od wykonania przeszczepu jajnika. ....  | 71 |
| Rycina 8. Średnia liczba różnych typów pęcherzyków w grupie porównawczej (D0)<br>oraz w grupie traktowanej osoczem bogatopłytkowym (PRP) i grupie<br>kontrolnej w siódmym dniu od wykonania przeszczepu jajnika. .... | 72 |
| Rycina 9. Porównanie par tkanek jajników tego samego zwierzęcia pod względem<br>liczby i rodzaju pęcherzyków w grupie krótkoterminowej D2.....  | 74 |
| Rycina 10. Porównanie par tkanek jajników tego samego zwierzęcia pod względem<br>liczby i rodzaju pęcherzyków w grupie średnioterminowej D7.....  | 75 |
| Rycina 11. Odsetek powierzchni o cechach zwłóknienia w zależności od<br>przynależności do różnych grup badanych. ....   | 76 |

|  |    |
|--|----|
| Rycina 12. Odsetek jąder apoptotycznych w zależności od badanej grupy.   | 78 |
| Rycina 13. Porównanie ogólnej liczby naczyń w tkankach jajnika. ....   | 80 |
| Rycina 14. Wartość współczynników korelacji między gęstością naczyń, a liczbą pęcherzyków danego typu w tkankach jajników poddanych przeszczepowi.....         | 82 |
| Rycina 15. Wyniki ekspresji receptorów estrogenowych ESR $\alpha$ (Ryc. 15A) i ESR $\beta$ (Ryc. 15B) w tkankach jajników w zależności od badanej grupy.. .... | 84 |
| Rycina 16. Wyniki ekspresji receptora progesteronowego w tkankach jajników w zależności od badanej grupy. ....   | 85 |
| Rycina 17. Wyniki ekspresji mRNA dla hormonu antymullerowskiego w tkankach jajników w zależności od badanej grupy. ....  | 86 |
| Rycina 18. Wyniki ekspresji receptora dla hormonu antymullerowskiego w tkankach jajników w zależności od badanej grupy.. ....                                  | 87 |
| Rycina 19. Wyniki ekspresji czynnika martwicy nowotworów typu alpha (TNF $\alpha$ ) w tkankach jajników w zależności od badanej grupy.. ....                   | 88 |

### 8.3 Tabele

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 Wybrane składniki osocza bogatopłytkowego o udowodnionym w literaturze wpływie na jajnik. .... | 46 |
|---|----|



## 9. Bibliografia i odniesienia

1. Abir, R. *et al.* (2008) 'Selection of patients before and after anticancer treatment for ovarian cryopreservation', *Human Reproduction*, 23(4), pp. 869–877. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dem413>.
2. Agca, C., Lucy, M.C. and Agca, Y. (2009) 'Gene expression profile of rat ovarian tissue following xenotransplantation into immune-deficient mice', *REPRODUCTION*, 137(6), pp. 957–967. Available at: <https://doi.org/10.1530/REP-09-0048>.
3. Aghajanova, L., Houshdaran, S., Balayan, S., Manvelyan, E., Irwin, Juan C., *et al.* (2018) 'In vitro evidence that platelet-rich plasma stimulates cellular processes involved in endometrial regeneration', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(5), pp. 757–770. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1130-8>.
4. Aghajanova, L., Houshdaran, S., Balayan, S., Manvelyan, E., Irwin, Juan C, *et al.* (2018) 'In vitro evidence that platelet-rich plasma stimulates cellular processes involved in endometrial regeneration', *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018/02/05, 35(5), pp. 757–770. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1130-8>.
5. Ahmadian, S. *et al.* (2020) 'Intra-ovarian injection of platelet-rich plasma into ovarian tissue promoted rejuvenation in the rat model of premature ovarian insufficiency and restored ovulation rate via angiogenesis modulation', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1), p. 78. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00638-4>.
6. Ajayi, A.F. and Akhigbe, R.E. (2020) 'Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update', *Fertility Research and Practice*, 6(1), p. 5. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>.
7. Akel, R.A. *et al.* (2020) 'Ovarian Stimulation Is Safe and Effective for Patients with Gynecologic Cancer', *Journal of Adolescent and Young Adult Oncology*, 9(3), pp. 367–374. Available at: <https://doi.org/10.1089/jayao.2019.0124>.
8. Alan, E. and Kulak, Y. (2021) 'The immunoexpression patterns of fibroblast growth factors in the pregnant and postpartum rat ovary', *Reproduction, Fertility and Development*, 33(16), p. 817. Available at: <https://doi.org/10.1071/RD21025>.

9. Allahbadia, G., Kuwayama, M. and Gandhi, G. (2015) *Vitrification in Assisted Reproduction*.
10. Amireault, P. and Dubé, F. (2005) ‘Serotonin and Its Antidepressant-Sensitive Transport in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes and Early Embryos<sup>1</sup>’, *Biology of Reproduction*, 73(2), pp. 358–365. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.039313>.
11. An, R. *et al.* (2021) ‘Polystyrene microplastics cause granulosa cells apoptosis and fibrosis in ovary through oxidative stress in rats’, *Toxicology*, 449, p. 152665. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152665>.
12. Andersen, C.Y. *et al.* (2012) ‘Long-term duration of function of ovarian tissue transplants: case reports’, *Reproductive BioMedicine Online*, 25(2), pp. 128–132. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.03.014>.
13. Anderson, R.A. *et al.* (2006) ‘The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer’, *Human Reproduction*, 21(10), pp. 2583–2592. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/del201>.
14. Anderson, R.A. *et al.* (2018) ‘The impact of cancer on subsequent chance of pregnancy: a population-based analysis’, *Human Reproduction*, 33(7), pp. 1281–1290. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dey216>.
15. Armuand, G.M. *et al.* (2012) ‘Sex Differences in Fertility-Related Information Received by Young Adult Cancer Survivors’, *Journal of Clinical Oncology*, 30(17), pp. 2147–2153. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.6470>.
16. Arroyo, A., Kim, B. and Yeh, J. (2020) ‘Luteinizing Hormone Action in Human Oocyte Maturation and Quality: Signaling Pathways, Regulation, and Clinical Impact’, *Reproductive Sciences*, 27(6), pp. 1223–1252. Available at: <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00137-x>.
17. Ataman, L.M. *et al.* (2022) ‘A synopsis of global frontiers in fertility preservation’, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02570-5>.
18. Atkinson, L., Martin, F. and Sturmeay, R.G. (2021) ‘Intraovarian injection of platelet-rich plasma in assisted reproduction: too much too soon?’, *Human reproduction (Oxford, England)*, 36(7), pp. 1737–1750. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/deab106>.

19. Bader, R. *et al.* (2020) 'In vitro effect of autologous platelet-rich plasma on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human spermatozoa', *Andrology*, 8(1), pp. 191–200. Available at: <https://doi.org/10.1111/andr.12648>.
20. Bahrehbar, K. *et al.* (2020) 'Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells improved premature ovarian failure', *World Journal of Stem Cells*, 12(8), pp. 857–878. Available at: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i8.857>.
21. Bakacak, M. *et al.* (2016) 'Protective Effect of Platelet Rich Plasma on Experimental Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Ovary', *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 81(3), pp. 225–231. Available at: <https://doi.org/10.1159/000440617>.
22. Barbato, V. *et al.* (2018) 'Slush nitrogen vitrification of human ovarian tissue does not alter gene expression and improves follicle health and progression in long-term in vitro culture', *Fertility and Sterility*, 110(7), pp. 1356–1366. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.08.020>.
23. Barrett, K.E. *et al.* (2018) 'Reproductive Development & Function of the Female Reproductive System', in *Ganong's Review of Medical Physiology*, 25e. New York, NY: McGraw-Hill Education. Available at: [accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1115830583](https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1115830583).
24. Barros, R.P.A. and Gustafsson, J.-Å. (2011) 'Estrogen Receptors and the Metabolic Network', *Cell Metabolism*, 14(3), pp. 289–299. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.005>.
25. Bayefsky, M. *et al.* (2022) 'Navigating parent–child disagreement about fertility preservation in minors: scoping review and ethical considerations', *Human Reproduction Update*, 28(5), pp. 747–762. Available at: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac019>.
26. Becker, K. and Schöneich, J. (1982) 'Expression of genetic damage induced by alkylating agents in germ cells of female mice', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 92(1–2), pp. 447–464. Available at: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(82\)90243-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(82)90243-3).
27. Beckmann, M. *et al.* (2016) 'Surgical Aspects of Ovarian Tissue Removal and Ovarian Tissue Transplantation for Fertility Preservation', *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 76(10), pp. 1057–1064. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0042-115017>.

28. Bedenk, J., Vrtačnik-Bokal, E. and Virant-Klun, I. (2020) ‘The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility’, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(1), pp. 89–100. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01622-7>.
29. Bedyńska, S., Niewiarowski, J. and Cypryńska, M. (2013) ‘Wprowadzenie do analizy wariancji [Introduction to Analysis of Variance]’, *Statystyczny drogowskaz*, 2, pp. 13–26.
30. Bebebecha, V. *et al.* (2020) ‘Effect of the platelet-rich plasma covering of polypropylene mesh on oxidative stress, inflammation, and adhesions’, *International Urogynecology Journal*, 31(1), pp. 139–147. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00192-019-03938-5>.
31. Blumenfeld, Z. (2019) ‘Fertility Preservation Using GnRH Agonists: Rationale, Possible Mechanisms, and Explanation of Controversy’, *Clinical Medicine Insights: Reproductive Health*, 13, p. 117955811987016. Available at: <https://doi.org/10.1177/1179558119870163>.
32. Blumenfeld, Z., Katz, G. and Evron, A. (2014) “‘An ounce of prevention is worth a pound of cure’”: the case for and against GnRH-agonist for fertility preservation’, *Annals of Oncology*, 25(9), pp. 1719–1728. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu036>.
33. Borrione, P. *et al.* (2015) ‘Systemic effects of locally injected platelet rich plasma in a rat model: an analysis on muscle and bloodstream.’, *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. Italy, pp. 251–258.
34. Borrione P *et al.* (2015) ‘Systemic effects of locally injected platelet rich plasma in a rat model:an analysis on muscle and bloodstream’, *Journal of biological regulators & homeostatic agents* , 29(1), pp. 251–258.
35. Bos-Mikich, A. *et al.* (2019) ‘Platelet-rich plasma or blood-derived products to improve endometrial receptivity?’, *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2019/01/04, 36(4), pp. 613–620. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1386-z>.
36. Bradley, J. (2008) ‘TNF-mediated inflammatory disease’, *The Journal of Pathology*, 214(2), pp. 149–160. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.2287>.
37. Bryson, A. *et al.* (2022) ‘The consequences of early menopause and menopause symptoms for labour market participation’, *Social Science & Medicine*, 293, p. 114676. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2021.114676>.

38. Bu, S. *et al.* (2006) ‘Localization and temporal regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 in mouse ovary’, *Reproduction*, 131(6), pp. 1099–1107. Available at: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00810>.
39. Byers, M. *et al.* (1997) ‘Estrogen Receptor- $\beta$  mRNA Expression in Rat Ovary: Down-Regulation by Gonadotropins’, *Molecular Endocrinology*, 11(2), pp. 172–182. Available at: <https://doi.org/10.1210/mend.11.2.9887>.
40. Byers, S.L., Wiles, M. v and Taft, R.A. (2009) ‘Surgical oocyte retrieval (SOR): a method for collecting mature mouse oocytes without euthanasia.’, *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 48(1), pp. 44–51.
41. Cacciottola, L. *et al.* (2018) ‘In vivo characterization of metabolic activity and oxidative stress in grafted human ovarian tissue using microdialysis’, *Fertility and Sterility*, 110(3), pp. 534-544.e3. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.009>.
42. Cacciottola, L. *et al.* (2020) ‘Long-Term Advantages of Ovarian Reserve Maintenance and Follicle Development Using Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Ovarian Tissue Transplantation’, *Journal of Clinical Medicine*, 9(9), p. 2980. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm9092980>.
43. Cacciottola, L., Donnez, J. and Dolmans, M.-M. (2021) ‘Ovarian tissue damage after grafting: systematic review of strategies to improve follicle outcomes’, *Reproductive BioMedicine Online*, 43(3), pp. 351–369. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.06.019>.
44. Callejo, J. *et al.* (2001) ‘Long-Term Ovarian Function Evaluation after Autografting by Implantation with Fresh and Frozen-Thawed Human Ovarian Tissue’, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(9), pp. 4489–4494. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.86.9.7871>.
45. Cavagna, F. *et al.* (2017) ‘A specific controlled ovarian stimulation (COS) protocol for fertility preservation in women with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy’, *Współczesna Onkologia*, 21(4), pp. 290–294. Available at: <https://doi.org/10.5114/wo.2017.72395>.
46. Cavallo, C. *et al.* (2016) ‘Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules’, *BioMed Research International*, 2016, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/6591717>.
47. Chakravarthi, V.P. *et al.* (2021) ‘Granulosa cell genes that regulate ovarian follicle development beyond the antral stage: The role of estrogen receptor  $\beta$ ’, *Molecular*

- and Cellular Endocrinology*, 528. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111212>.
48. Chang, Y. *et al.* (2015) 'Autologous platelet-rich plasma promotes endometrial growth and improves pregnancy outcome during in vitro fertilization', *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(1), pp. 1286–1290. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25785127>.
  49. Chen, C.-H., Tan, S.-J. and Tzeng, C.-R. (2014) 'In vivo fate mapping of cryopreserved murine ovarian grafts.', *Journal of ovarian research*, 7, p. 81. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0081-7>.
  50. Chen, H. *et al.* (2019) 'Adjuvant gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in premenopausal women', *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021(8). Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008018.pub3>.
  51. Chen, H. *et al.* (2021) 'Autologous transplantation of thecal stem cells restores ovarian function in nonhuman primates', *Cell Discovery*, 7(1), p. 75. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00291-0>.
  52. Chen, Y., Yuan, Y. and Li, W. (2018) 'Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from  $\alpha$ -granules', *Bioscience Reports*, 38(5). Available at: <https://doi.org/10.1042/BSR20180458>.
  53. Chibeleian, C.B. *et al.* (2020) 'State of the Art in Fertility Preservation for Female Patients Prior to Oncologic Therapies', *Medicina*, 56(2), p. 89. Available at: <https://doi.org/10.3390/medicina56020089>.
  54. Chiti, M.C. *et al.* (2018) 'A novel fibrin-based artificial ovary prototype resembling human ovarian tissue in terms of architecture and rigidity', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(1), pp. 41–48. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1091-3>.
  55. Cho, E. *et al.* (2019) 'A new possibility in fertility preservation: The artificial ovary', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(8), pp. 1294–1315. Available at: <https://doi.org/10.1002/term.2870>.
  56. Cho, J.H. *et al.* (2021) 'Functional Assessment of Platelet Dense Granule ATP Release', *American Journal of Clinical Pathology*, 155(6), pp. 863–872. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa196>.

57. Choi, J., Minn, K.W. and Chang, H. (2012) ‘The efficacy and safety of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells: an update.’, *Archives of plastic surgery*, 39(6), pp. 585–92. Available at: <https://doi.org/10.5999/aps.2012.39.6.585>.
58. Christ, J., Herndon, C.N. and Yu, B. (2021) ‘Severe ovarian hyperstimulation syndrome associated with long-acting GnRH agonist in oncofertility patients’, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(3), pp. 751–756. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02051-7>.
59. Cobo, A. *et al.* (2015) ‘Six years’ experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate’, *Fertility and Sterility*, 104(6), pp. 1426-1434.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.020>.
60. Coppinger, J.A. *et al.* (2004) ‘Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions’, *Blood*, 103(6), pp. 2096–2104. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2804>.
61. Cozzi, E. *et al.* (2005) ‘Xenotransplantation—current status and future perspectives’, *British Medical Bulletin*, 75–76(1), pp. 99–114. Available at: <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh061>.
62. Cremonesi, F. *et al.* (2020) ‘Improvement of Embryo Recovery in Holstein Cows Treated by Intra-Ovarian Platelet Rich Plasma before Superovulation’, *Veterinary Sciences*, 7(1), p. 16. Available at: <https://doi.org/10.3390/vetsci7010016>.
63. Delgado-Rosas, F. *et al.* (2009) ‘Superficial ovarian cortex vascularization is inversely related to the follicle reserve in normal cycling ovaries and is increased in polycystic ovary syndrome’, *Human Reproduction*, 24(5), pp. 1142–1151. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dep008>.
64. Demeestere, I. *et al.* (2009) ‘Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation’, *Human Reproduction Update*, 15(6), pp. 649–665. Available at: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp021>.
65. Dewailly, D. *et al.* (2020) ‘Role of Anti-Müllerian Hormone in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome’, *Frontiers in Endocrinology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00641>.
66. Dhurat, R. and Sukesh, M. (2014) ‘Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author’s Perspective’, *Journal of cutaneous*

- and aesthetic surgery*, 7(4), pp. 189–197. Available at: <https://doi.org/10.4103/0974-2077.150734>.
67. Díaz-García, C. *et al.* (2019) ‘Dexamethasone does not prevent malignant cell reintroduction in leukemia patients undergoing ovarian transplant: risk assessment of leukemic cell transmission by a xenograft model’, *Human Reproduction*, 34(8), pp. 1485–1493. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dez115>.
  68. Dolmans, M. *et al.* (2019) ‘Translational research aiming to improve survival of ovarian tissue transplants using adipose tissue-derived stem cells’, *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 98(5), pp. 665–671. Available at: <https://doi.org/10.1111/aogs.13610>.
  69. Dolmans, M.-M. *et al.* (2007) ‘Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice’, *Reproduction*, 134(2), pp. 253–262. Available at: <https://doi.org/10.1530/REP-07-0131>.
  70. Dolmans, M.-M. *et al.* (2010) ‘Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe’, *Blood*, 116(16), pp. 2908–2914. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-265751>.
  71. Dolmans, M.M. *et al.* (2016) ‘Evaluation of minimal disseminated disease in cryopreserved ovarian tissue from bone and soft tissue sarcoma patients’, *Human Reproduction*, 31(10), pp. 2292–2302. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dew193>.
  72. Dolmans, M.-M. *et al.* (2021) ‘Transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a series of 285 women: a review of five leading European centers’, *Fertility and Sterility*, 115(5), pp. 1102–1115. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.008>.
  73. Dolmans, M.-M., Falcone, T. and Patrizio, P. (2020) ‘Importance of patient selection to analyze in vitro fertilization outcome with transplanted cryopreserved ovarian tissue’, *Fertility and Sterility*, 114(2), pp. 279–280. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.04.050>.
  74. Dolmans, M.-M. and Masciangelo, R. (2018) ‘Risk of transplanting malignant cells in cryopreserved ovarian tissue’, *Minerva Obstetrics and Gynecology*, 70(4). Available at: <https://doi.org/10.23736/S0026-4784.18.04233-8>.
  75. Donnez J *et al.* (2004) ‘Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue’, *Lancet*, 364, pp. 1405–1410.



76. Donnez, J. *et al.* (2015) ‘Ovarian cortex transplantation: time to move on from experimental studies to open clinical application’, *Fertility and Sterility*, 104(5), pp. 1097–1098. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.005>.
77. Donnez, J. and Dolmans, M.-M. (2017) ‘Fertility Preservation in Women’, *New England Journal of Medicine*, 377(17), pp. 1657–1665. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1614676>.
78. Du, C. *et al.* (2021) ‘FGF2/FGFR signaling promotes cumulus–oocyte complex maturation in vitro’, *Reproduction*, 161(2), pp. 205–214. Available at: <https://doi.org/10.1530/REP-20-0264>.
79. Durlinger, A., Visser, J. and Themmen, A. (2002) ‘Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone’, *Reproduction*, pp. 601–609. Available at: <https://doi.org/10.1530/rep.0.1240601>.
80. Dziennik Ustaw Rzeczpospolitej Polskiej; (2015) *Ustawa o leczeniu niepłodności*, z dnia 25 czerwca 2015r. [http://orka.sejm.gov.pl/proc7.nsf/ustawy/608\\_u.htm](http://orka.sejm.gov.pl/proc7.nsf/ustawy/608_u.htm).
81. Eijkenboom, L. *et al.* (2021) ‘Purging human ovarian cortex of contaminating leukaemic cells by targeting the mitotic catastrophe signalling pathway’, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(6), pp. 1571–1588. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02081-9>.
82. Eijkenboom, L. *et al.* (2022) ‘Strategies to safely use cryopreserved ovarian tissue to restore fertility after cancer: a systematic review’, *Reproductive BioMedicine Online* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.05.020>.
83. Elghblawi, E. (2018) ‘Platelet-rich plasma, the ultimate secret for youthful skin elixir and hair growth triggering’, *Journal of Cosmetic Dermatology*, 17(3), pp. 423–430. Available at: <https://doi.org/10.1111/jocd.12404>.
84. Emer, J. (2019) ‘Platelet-Rich Plasma (PRP): Current Applications in Dermatology’, *Skin therapy letter*, 24(5), pp. 1–6.
85. Eppig, J.J. *et al.* (2008) ‘Effect of in vitro maturation of mouse oocytes on the health and lifespan of adult offspring’, *Human Reproduction*, 24(4), pp. 922–928. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/den466>.
86. Everts, P.A. *et al.* (2021) ‘Platelet Rich Plasma in Orthopedic Surgical Medicine.’, *Platelets*, 32(2), pp. 163–174. Available at: <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1869717>.

87. van Eyck, A.-S. *et al.* (2009) ‘Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting’, *Fertility and Sterility*, 92(1), pp. 374–381. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.012>.
88. van Eyck, A.-S. *et al.* (2010) ‘Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model.’, *Fertility and sterility*, 93(5), pp. 1676–1685. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.048>.
89. Fahy, G.M. *et al.* (1984) ‘Vitrification as an approach to cryopreservation’, *Cryobiology*, 21(4), pp. 407–426. Available at: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(84\)90079-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(84)90079-8).
90. Farimani, M. *et al.* (2019) ‘A report on three live births in women with poor ovarian response following intra-ovarian injection of platelet-rich plasma (PRP)’, *Molecular Biology Reports*, 46(2), pp. 1611–1616. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04609-w>.
91. Ferlay J *et al.* (no date) *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer., 2020. Available at: <https://gco.iarc.fr/today> (Accessed: 28 September 2022).
92. Fitzpatrick, S.L. *et al.* (1999) ‘Expression of Estrogen Receptor- $\beta$  Protein in Rodent Ovary’, *Endocrinology*, 140(6), pp. 2581–2591. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo.140.6.6928>.
93. Fuller, B. and Paynter, S. (2004) ‘Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine’, *Reproductive BioMedicine Online*, 9(6), pp. 680–691. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61780-4](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61780-4).
94. Gandolfi, F. *et al.* (2006) ‘Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models’, *Fertility and Sterility*, 85, pp. 1150–1156. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.062>.
95. Gao, J.-M. *et al.* (2013) ‘Improvement in the quality of heterotopic allotransplanted mouse ovarian tissues with basic fibroblast growth factor and fibrin hydrogel.’, *Human reproduction (Oxford, England)*, 28(10), pp. 2784–2793. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/det296>.
96. Gavish, Z. *et al.* (2014) ‘Follicle activation and “burn-out” contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness’,

- Human Reproduction*, 29(5), pp. 989–996. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/deu015>.
97. Gavish, Z. *et al.* (2018) ‘Follicle activation is a significant and immediate cause of follicle loss after ovarian tissue transplantation’, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(1), pp. 61–69. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1079-z>.
98. Ghunaim, S. *et al.* (2020) ‘Fertility preservation in patients with BRCA mutation’, *ecancermedicalscience*, 14. Available at: <https://doi.org/10.3332/ecancer.2020.1033>.
99. Golebiewska, E.M. and Poole, A.W. (2015) ‘Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond’, *Blood Reviews*, 29(3), pp. 153–162. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>.
100. Gonfloni, S. *et al.* (2009) ‘Inhibition of the c-Abl–TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death’, *Nature Medicine*, 15(10), pp. 1179–1185. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.2033>.
101. Gosden, R.G. *et al.* (1994) ‘Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice.’, *Journal of reproduction and fertility*, 101(3), pp. 619–623. Available at: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010619>.
102. Goto, M., Iwase, A. and Ando, H. (2007) ‘PTEN and Akt expression during growth of human ovarian follicles’, pp. 541–546. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-007-9156-3>.
103. Gracia, C.R. *et al.* (2012) ‘Impact of cancer therapies on ovarian reserve’, *Fertility and Sterility*, 97(1), pp. 134–140.e1. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.10.040>.
104. Greenaway, J. *et al.* (2007) ‘Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1)’, *Journal of Cellular Physiology*, 210(3), pp. 807–818. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.20904>.
105. Grootegoed, J.A., Baarends, W.M. and Themmen, A.P.N. (1994) ‘Welcome to the family: the anti-müllerian hormone receptor’, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 100(1–2), pp. 29–34. Available at: [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)90274-7](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90274-7).
106. Gupta, P. *et al.* (2006) ‘Menopausal symptoms in women treated for breast cancer: the prevalence and severity of symptoms and their perceived effects on quality of

- life’, *Climacteric*, 9(1), pp. 49–58. Available at: <https://doi.org/10.1080/13697130500487224>.
107. Gupta, S., Paliczak, A. and Delgado, D. (2021) ‘Evidence-based indications of platelet-rich plasma therapy’, *Expert Review of Hematology*, 14(1), pp. 97–108. Available at: <https://doi.org/10.1080/17474086.2021.1860002>.
  108. Hardy, R. and Kuh, D. (2002) ‘Change in psychological and vasomotor symptom reporting during the menopause’, *Social Science & Medicine*, 55(11), pp. 1975–1988. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0277-9536\(01\)00326-4](https://doi.org/10.1016/S0277-9536(01)00326-4).
  109. Hawkins, M.M. (1994) ‘Pregnancy outcome and offspring after childhood cancer’, *BMJ*, 309(6961), pp. 1034–1034. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.309.6961.1034>.
  110. Henriksen, R., Dizeyi, N. and Abrahamsson, P.-A. (2012) ‘Expression of serotonin receptors 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2B and 5-HT4 in ovary and in ovarian tumours.’, *Anticancer research*, 32(4), pp. 1361–6.
  111. Henry, L. *et al.* (2022) ‘Oocyte Cryopreservation in Patients with Endometriosis: Current Knowledge and Number Needed to Treat’, *Journal of Clinical Medicine*, 11(15), p. 4559. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm11154559>.
  112. Hornick, J.E. *et al.* (2012) ‘Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro.’, *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(6), pp. 1801–1810. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/der468>.
  113. Hossay, C., Donnez, J. and Dolmans, M.-M. (2020) ‘Whole Ovary Cryopreservation and Transplantation: A Systematic Review of Challenges and Research Developments in Animal Experiments and Humans’, *Journal of Clinical Medicine*, 9(10), p. 3196. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm9103196>.
  114. Hosseini, L. *et al.* (2017) ‘Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage’, *Reproductive BioMedicine Online*, 35(4), pp. 343–350. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.04.007>.
  115. Hsu, C.-C. *et al.* (2020) ‘Live Birth in Woman With Premature Ovarian Insufficiency Receiving Ovarian Administration of Platelet-Rich Plasma (PRP) in Combination With Gonadotropin: A Case Report’, *Frontiers in Endocrinology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00050>.

116. Huang, B. *et al.* (2019) 'Fetal liver mesenchymal stem cells restore ovarian function in premature ovarian insufficiency by targeting MT1', *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), p. 362. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1490-8>.
117. Hudgens, J.L. *et al.* (2016) 'Platelet-Rich Plasma Activates Proinflammatory Signaling Pathways and Induces Oxidative Stress in Tendon Fibroblasts', *The American Journal of Sports Medicine*, 44(8), pp. 1931–1940. Available at: <https://doi.org/10.1177/0363546516637176>.
118. Hudson, M.M. *et al.* (2013) 'Clinical Ascertainment of Health Outcomes Among Adults Treated for Childhood Cancer', *JAMA*, 309(22), p. 2371. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2013.6296>.
119. Iliodromiti, S. *et al.* (2013) 'Consistent high clinical pregnancy rates and low ovarian hyperstimulation syndrome rates in high-risk patients after GnRH agonist triggering and modified luteal support: a retrospective multicentre study', *Human Reproduction*, 28(9), pp. 2529–2536. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/det304>.
120. Imai, A. *et al.* (2007) 'Direct Protection by a Gonadotropin-Releasing Hormone Analog from Doxorubicin-Induced Granulosa Cell Damage', *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 63(2), pp. 102–106. Available at: <https://doi.org/10.1159/000096062>.
121. Ishikawa, T. *et al.* (2014) 'Oxygen consumption rate of early pre-antral follicles from vitrified human ovarian cortical tissue', *Journal of Reproduction and Development*, 60(6), pp. 460–467. Available at: <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-009>.
122. Israely, T. *et al.* (2004) 'Angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation: multiparameter characterization of the neovasculature by dynamic contrast-enhanced MRI.', *Magnetic resonance in medicine*, 52(4), pp. 741–750. Available at: <https://doi.org/10.1002/mrm.20203>.
123. Jee, C.-H. *et al.* (2016) 'Effect of autologous platelet-rich plasma application on cutaneous wound healing in dogs', *Journal of Veterinary Science*, 17(1), p. 79. Available at: <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.1.79>.
124. Jeppesen, J. v. *et al.* (2013) 'Which follicles make the most anti-Mullerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection', *Molecular Human Reproduction*, 19(8), pp. 519–527. Available at: <https://doi.org/10.1093/molehr/gat024>.

125. Jeukens, C.R.L.P.N. *et al.* (2020) ‘Gonad shielding in pelvic radiography: modern optimised X-ray systems might allow its discontinuation’, *Insights into Imaging*, 11(1), p. 15. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13244-019-0828-1>.
126. Ji, J. *et al.* (2013) ‘The optimum number of oocytes in IVF treatment: an analysis of 2455 cycles in China’, *Human Reproduction*, 28(10), pp. 2728–2734. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/det303>.
127. Johnson, J. *et al.* (2004) ‘Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary’, *Nature*, 428(6979), pp. 145–150. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature02316>.
128. Josso, N., di Clemente, N. and Gouédard, L. (2001) ‘Anti-Müllerian hormone and its receptors’, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179(1–2), pp. 25–32. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00467-1](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00467-1).
129. Jurk, K. and Kehrel, B.E. (2005) ‘Platelets: Physiology and Biochemistry’, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 31(04), pp. 381–392. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2005-916671>.
130. Khattak, H. *et al.* (2022) ‘Why are women considering ovarian tissue cryopreservation to preserve reproductive and hormonal ovarian function? A qualitative study protocol’, *BMJ Open*, 12(4), p. e051288. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-051288>.
131. Kim, S Samuel (2012) ‘Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study.’, *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(6), pp. 489–493. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9757-3>.
132. Kim, S. Samuel (2012) ‘Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study’, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(6), pp. 489–493. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9757-3>.
133. Kim, S.S., Hwang, I.-T. and Lee, H.-C. (2004) ‘Heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue as a strategy to restore ovarian function.’, *Fertility and sterility*, 82(4), pp. 930–932. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.137>.
134. Kitajima, Y. *et al.* (2006) ‘Hyperstimulation and a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Modulate Ovarian Vascular Permeability by Altering Expression

- of the Tight Junction Protein Claudin-5', *Endocrinology*, 147(2), pp. 694–699. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2005-0700>.
135. Kolbe, T., Walter, I. and Rulicke, T. (2019) 'Influence of graft size, histocompatibility, and cryopreservation on reproductive outcome following ovary transplantation in mice.', *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(12), pp. 2583–2591. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01620-9>.
  136. Kometas, M. *et al.* (2021) 'Methods of Ovarian Tissue Cryopreservation: Is Vitrification Superior to Slow Freezing?—Ovarian Tissue Freezing Methods', *Reproductive Sciences*, 28(12), pp. 3291–3302. Available at: <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00591-6>.
  137. Kong, H.S. *et al.* (2017a) 'Effect of treatment with angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor on the quality of xenografted bovine ovarian tissue in mice', *PLOS ONE*. Edited by C.E. Ambrósio, 12(9), p. e0184546. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184546>.
  138. Kong, H.S. *et al.* (2017b) 'Effect of treatment with angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor on the quality of xenografted bovine ovarian tissue in mice', *PLOS ONE*, 12(9), p. e0184546. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184546>.
  139. Kopczyńska, E., Makarewicz, R. and Tyrakowski, T. (2007) 'The role of angiopoietins 1 and 2 in the regulation of tumor angiogenesis', *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 11(7), pp. 350–354. Available at: <https://www.termedia.pl/The-role-of-angiopoietins-1-and-2-in-the-regulation-of-tumor-angiogenesis,3,9036,1,1.html>.
  140. Korach, K. (1994) 'Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor', *Science*, 266(5190), pp. 1524–1527. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.7985022>.
  141. Koupenova, M. *et al.* (2018) 'Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis', *Circulation Research*, 122(2), pp. 337–351. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310795>.
  142. Krawczyk, P. (2018) 'Sewofluran w ginekologii i położnictwie Sevoflurane in gynecology and obstetrics', *Anestezjologia i Ratownictwo*, 12, pp. 443–449.
  143. Krotz, S.P. *et al.* (2010) 'In vitro maturation of oocytes via the pre-fabricated self-assembled artificial human ovary', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(12), pp. 743–750. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9468-6>.

144. Küçük, L. *et al.* (2014) 'Effects of platelet-rich plasma on nerve regeneration in a rat model', 48(4), pp. 449–454. Available at: <https://doi.org/10.3944/AOTT.2014.13.0029>.
145. Labied, S. *et al.* (2013) 'Isoform 111 of Vascular Endothelial Growth Factor ( VEGF 111 ) Improves Angiogenesis of Ovarian Tissue Xenotransplantation', 95(3), pp. 426–433. Available at: <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318279965c>.
146. Lambertini, M. *et al.* (2019) 'Ovarian protection with gonadotropin-releasing hormone agonists during chemotherapy in cancer patients: From biological evidence to clinical application', *Cancer Treatment Reviews*, 72, pp. 65–77. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.11.006>.
147. Laronda, M.M. *et al.* (2014) 'Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(8), pp. 1013–1028. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0252-x>.
148. Laronda, M.M. *et al.* (2017) 'A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice', *Nature Communications*, 8(1), p. 15261. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms15261>.
149. Lawson, K. a and Pedersen, R. a (1987) 'Cell fate, morphogenetic movement and population kinetics of embryonic endoderm at the time of germ layer formation in the mouse.', *Development (Cambridge, England)*, 101(3), pp. 627–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3502998>.
150. Ledee, N. *et al.* (2008) 'Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor', *Human Reproduction*, 23(9), pp. 2001–2009. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/den192>.
151. Lee, D.M. *et al.* (2017) 'Subcutaneous ovarian tissue transplantation in nonhuman primates: duration of endocrine function and normalcy of subsequent offspring as demonstrated by reproductive competence, oocyte production, and telomere length.', *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(11), pp. 1427–1434. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1019-y>.
152. Lee, E.B. *et al.* (2021) 'ER $\beta$  Regulation of Gonadotropin Responses during Folliculogenesis', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), p. 10348. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms221910348>.



153. Lee, S. *et al.* (2019) ‘Comparison between Slow Freezing and Vitrification for Human Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation’, *International journal of molecular sciences*, 20(13), p. 3346. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20133346>.
154. Letourneau, J.M. *et al.* (2011) ‘A changing perspective: improving access to fertility preservation’, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(1), pp. 56–60. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.133>.
155. Levoux, J. *et al.* (2021) ‘Platelets Facilitate the Wound-Healing Capability of Mesenchymal Stem Cells by Mitochondrial Transfer and Metabolic Reprogramming’, *Cell Metabolism*, 33(2), pp. 283-299.e9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.12.006>.
156. Lew, R. (2019) ‘Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure’, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 55, pp. 2–13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.05.005>.
157. Li, F. *et al.* (2021) ‘Outcome study of five cases receiving in vitro fertilization after treatment of intrauterine platelet-rich plasma (PRP) for chronic endometritis’, *Panminerva Medica* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.23736/S0031-0808.20.04247-0>.
158. Lin, Y., Qi, J. and Sun, Y. (2021) ‘Platelet-Rich Plasma as a Potential New Strategy in the Endometrium Treatment in Assisted Reproductive Technology’, *Frontiers in Endocrinology*, 12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.707584>.
159. Ling, L. *et al.* (2019) ‘Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism’, *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), p. 46. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1136-x>.
160. Liu, M. *et al.* (2021) ‘Potential of thrombospondin-1 in treatment of polycystic ovary syndrome rat model: a preliminary study’, *Gynecological Endocrinology*, 37(11), pp. 1020–1026. Available at: <https://doi.org/10.1080/09513590.2021.1950682>.
161. Lliberos, C. *et al.* (2021) ‘Evaluation of inflammation and follicle depletion during ovarian ageing in mice’, *Scientific Reports*, 11(1), p. 278. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79488-4>.

162. Lopes, F. *et al.* (2020) ‘Single and combined effects of cisplatin and doxorubicin on the human and mouse ovary in vitro’, *Reproduction*, 159(2), pp. 193–204. Available at: <https://doi.org/10.1530/REP-19-0279>.
163. Lotz, L. *et al.* (2014) ‘Spontaneous antral follicle formation and metaphase II oocyte from a non-stimulated prepubertal ovarian tissue xenotransplant’, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), p. 41. Available at: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-41>.
164. Lotz, L. *et al.* (2019) ‘Ovarian Tissue Transplantation: Experience From Germany and Worldwide Efficacy’, *Clinical medicine insights. Reproductive health*, 13, pp. 1179558119867357–1179558119867357. Available at: <https://doi.org/10.1177/1179558119867357>.
165. Lubahn, D.B. *et al.* (1993) ‘Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(23), pp. 11162–11166. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11162>.
166. Luyckx, V. *et al.* (2013) ‘First step in developing a 3D biodegradable fibrin scaffold for an artificial ovary’, *Journal of Ovarian Research*, 6(1), p. 83. Available at: <https://doi.org/10.1186/1757-2215-6-83>.
167. Ma, Y. *et al.* (2021) ‘Platelet-rich plasma protects human melanocytes from oxidative stress and ameliorates melanogenesis induced by UVB irradiation’, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 85(7), pp. 1686–1696. Available at: <https://doi.org/10.1093/bbb/zbab085>.
168. Maidarti, M. *et al.* (2019) ‘Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response.’, *Human reproduction (Oxford, England)*, 34(2), pp. 297–307. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dey354>.
169. Manavella, D.D., Cacciottola, L., Pommé, S., *et al.* (2018) ‘Two-step transplantation with adipose tissue-derived stem cells increases follicle survival by enhancing vascularization in xenografted frozen – thawed human ovarian tissue’, (April), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dey080>.
170. Manavella, D.D., Cacciottola, L., Pomme, S., *et al.* (2018) ‘Two-step transplantation with adipose tissue-derived stem cells increases follicle survival by enhancing vascularization in xenografted frozen-thawed human ovarian tissue.’,

- Human reproduction (Oxford, England)*, 33(6), pp. 1107–1116. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dey080>.
171. Marjoribanks, J. *et al.* (2018) ‘Cochrane corner: long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women’, *Heart*, 104(2), pp. 93–95. Available at: <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2017-311583>.
172. Marklund, A. *et al.* (2020) ‘Efficacy and safety of controlled ovarian stimulation using GnRH antagonist protocols for emergency fertility preservation in young women with breast cancer—a prospective nationwide Swedish multicenter study’, *Human Reproduction*, 35(4), pp. 929–938. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa029>.
173. Martins, R.P. *et al.* (2016) ‘Platelet-rich plasma reduces the oxidative damage determined by a skeletal muscle contusion in rats’, *Platelets*, 27(8), pp. 784–790. Available at: <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1184752>.
174. Masciangelo, R. *et al.* (2018) ‘Safety of ovarian tissue transplantation in patients with borderline ovarian tumors.’, *Human reproduction (Oxford, England)*, 33(2), pp. 212–219. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dex352>.
175. Masoudi, E. *et al.* (2016) ‘Platelet-Rich Blood Derivatives for Stem Cell-Based Tissue Engineering and Regeneration’, *Current stem cell reports*. 2016/02/13, 2(1), pp. 33–42. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0034-8>.
176. del Mastro, L. *et al.* (2014) ‘Gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in cancer women: Systematic review and meta-analysis of randomized trials’, *Cancer Treatment Reviews*, 40(5), pp. 675–683. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.12.001>.
177. del Mastro, L. and Lambertini, M. (2017) ‘Gonadotropin-releasing hormone analogs for ovarian function protection during chemotherapy in young early breast cancer patients: the last piece of the puzzle?’, *Annals of Oncology*, 28(8), pp. 1683–1685. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx277>.
178. McElhinney, B. and McClure, N. (2000) ‘Ovarian hyperstimulation syndrome’, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 14(1), pp. 103–122. Available at: <https://doi.org/10.1053/beog.1999.0066>.
179. Meirow, D. *et al.* (2001) ‘Administration of cyclophosphamide at different stages of follicular maturation in mice: effects on reproductive performance and fetal

- malformations’, *Human Reproduction*, 16(4), pp. 632–637. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/16.4.632>.
180. Milachich, T. and Shterev, A. (2016a) ‘Are there optimal numbers of oocytes, spermatozoa and embryos in assisted reproduction?’, *JBRA Assisted Reproduction*, 20. Available at: <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160032>.
  181. Milachich, T. and Shterev, A. (2016b) ‘Are there optimal numbers of oocytes, spermatozoa and embryos in assisted reproduction?’, *JBRA Assisted Reproduction*, 20. Available at: <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160032>.
  182. Mlynarek, R.A., Kuhn, A.W. and Bedi, A. (2016) ‘Platelet-Rich Plasma (PRP) in Orthopedic Sports Medicine.’, *American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.)*, 45(5), pp. 290–326.
  183. Monget, P., McNatty, K. and Monniaux, D. (2021) ‘The Crazy Ovary’, *Genes*, 12(6), p. 928. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes12060928>.
  184. Morgan, S. *et al.* (2012) ‘How do chemotherapeutic agents damage the ovary?’, *Human Reproduction Update*, 18(5), pp. 525–535. Available at: <https://doi.org/10.1093/humupd/dms022>.
  185. Mouanness, M. *et al.* (2021) ‘Use of Intra-uterine Injection of Platelet-rich Plasma (PRP) for Endometrial Receptivity and Thickness: a Literature Review of the Mechanisms of Action’, *Reproductive Sciences* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00579-2>.
  186. Mulder, C.L. *et al.* (2019) ‘Enhancing the safety of ovarian cortex autotransplantation: cancer cells are purged completely from human ovarian tissue fragments by pharmacological inhibition of YAP/TAZ oncoproteins’, *Human Reproduction*, 34(3), pp. 506–518. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dey384>.
  187. Muñoz, E. (2015) ‘Ovarian stimulation in patients with breast cancer’, *ecancermedicalscience*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.504>.
  188. Myers, M. *et al.* (2004) ‘Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary’, *Reproduction*, 127(5), pp. 569–580. Available at: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00095>.
  189. Nachman, R.L. and Rafii, S. (2008) ‘Platelets, Petechiae, and Preservation of the Vascular Wall’, *New England Journal of Medicine*, 359(12), pp. 1261–1270. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra0800887>.

190. Ní Dhonnabháin, B. *et al.* (2022) ‘A comparison of fertility preservation outcomes in patients who froze oocytes, embryos, or ovarian tissue for medically indicated circumstances: a systematic review and meta-analysis’, *Fertility and Sterility*, 117(6), pp. 1266–1276. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.03.004>.
191. Nikbakht, R. *et al.* (2021) ‘Evaluation of oocyte quality in Polycystic ovary syndrome patients undergoing ART cycles’, *Fertility Research and Practice*, 7(1), p. 2. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00094-z>.
192. Nisolle, M. *et al.* (2000) ‘Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice’, *Fertility and Sterility*, 74(1), pp. 122–129. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00548-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00548-3).
193. O’Brien, M.J., Pendola, J.K. and Eppig, J.J. (2003) ‘A Revised Protocol for In Vitro Development of Mouse Oocytes from Primordial Follicles Dramatically Improves Their Developmental Competence<sup>1</sup>’, *Biology of Reproduction*, 68(5), pp. 1682–1686. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013029>.
194. Oktay, K. *et al.* (2019) ‘Robot-assisted orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation techniques: surgical advances since our first success in 2000.’, *Fertility and sterility*, 111(3), pp. 604–606. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.042>.
195. Oktay, K., Newton, H. and Gosden, R.G. (2000) ‘Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice’, *Fertility and Sterility*, 73(3), pp. 599–603. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00548-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00548-8).
196. Pais, A.S. *et al.* (2021) ‘The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D culture’, *Journal of Ovarian Research*, 14(1), p. 147. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00892-z>.
197. Pantos, K. *et al.* (2019) ‘A Case Series on Natural Conceptions Resulting in Ongoing Pregnancies in Menopausal and Prematurely Menopausal Women Following Platelet-Rich Plasma Treatment’, *Cell transplantation*. 2019/07/04, 28(9–10), pp. 1333–1340. Available at: <https://doi.org/10.1177/0963689719859539>.
198. Paris, F. *et al.* (2002) ‘Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring’, *Nature Medicine*, 8(9), pp. 901–902. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm0902-901>.

199. Park, C.J. *et al.* (2020) ‘Progesterone Receptor Serves the Ovary as a Trigger of Ovulation and a Terminator of Inflammation’, *Cell Reports*, 31(2), p. 107496. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.060>.
200. Park, S., Sorenson, C.M. and Sheibani, N. (2015) ‘PECAM-1 isoforms, eNOS and endoglin axis in regulation of angiogenesis.’, *Clinical science (London, England : 1979)*, 129(3), pp. 217–234. Available at: <https://doi.org/10.1042/CS20140714>.
201. Pelletier, G. (2000) ‘Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues.’, *Histology and histopathology*, 15(4), pp. 1261–70. Available at: <https://doi.org/10.14670/HH-15.1261>.
202. Petrillo, S.K. *et al.* (2011) ‘Detection of DNA damage in oocytes of small ovarian follicles following phosphoramidate mustard exposures of cultured rodent ovaries in vitro’, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253(2), pp. 94–102. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.03.012>.
203. Picut, C.A. *et al.* (2015) ‘Postnatal Ovary Development in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters’, *Toxicologic Pathology*, 43(3), pp. 343–353. Available at: <https://doi.org/10.1177/0192623314544380>.
204. di Pietro, M. *et al.* (2018) ‘Ovarian angiogenesis in polycystic ovary syndrome’, *Reproduction*, 155(5), pp. R199–R209. Available at: <https://doi.org/10.1530/REP-17-0597>.
205. Pilcher, H. and Pearson, H. (2004) ‘Ovarian transplant produces baby’, *Nature* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1038/news040920-15>.
206. Poirot, C. *et al.* (2019) ‘Impact of cancer chemotherapy before ovarian cortex cryopreservation on ovarian tissue transplantation.’, *Human reproduction (Oxford, England)*, 34(6), pp. 1083–1094. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dez047>.
207. Policiano, C. *et al.* (2020) ‘Impact of ABVD chemotherapy on ovarian reserve after fertility preservation in reproductive-aged women with Hodgkin lymphoma’, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(7), pp. 1755–1761. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01844-0>.
208. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2019) ‘Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion’, *Fertility and Sterility*, 112(6), pp. 1022–1033. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.09.013>.

209. Prashant, P. *et al.* (2018) 'Primary ovarian insufficiency and fertility preservation: review article', *Journal of Obstetrics and Gynecological Investigations*, 1(1), pp. 79–83. Available at: <https://doi.org/10.5114/jogi.2018.81046>.
210. Qureshi, A.H. *et al.* (2009) 'Proteomic and Phospho-Proteomic Profile of Human Platelets in Basal, Resting State: Insights into Integrin Signaling', *PLoS ONE*, 4(10), p. e7627. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007627>.
211. Raja-Khan, N. *et al.* (2014) 'The Role of TGF- $\beta$  in Polycystic Ovary Syndrome', *Reproductive Sciences*, 21(1), pp. 20–31. Available at: <https://doi.org/10.1177/1933719113485294>.
212. Regan, S.L.P. *et al.* (2018) 'Involvement of Bone Morphogenetic Proteins (BMP) in the Regulation of Ovarian Function', in, pp. 227–261. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.015>.
213. Repsold, L. and Joubert, A.M. (2021) 'Platelet Function, Role in Thrombosis, Inflammation, and Consequences in Chronic Myeloproliferative Disorders', *Cells*, 10(11), p. 3034. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10113034>.
214. Rimon-Dahari, N. *et al.* (2016) 'Ovarian Folliculogenesis', in, pp. 167–190. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_7).
215. Rippentrop, S.M. *et al.* (2021) 'Effectiveness of Platelet-Rich Plasma in the Prevention of Chlamydia-Induced Hydrosalpinx in a Murine Model', *Reproductive Sciences*, 28(4), pp. 1031–1040. Available at: <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00329-w>.
216. Rivas Leonel, E.C., Lucci, C.M. and Amorim, C.A. (2019) 'Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: A Review', *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46(3), pp. 173–181. Available at: <https://doi.org/10.1159/000499054>.
217. Robker, R.L., Akison, L.K. and Russell, D.L. (2009) 'Control of oocyte release by progesterone receptor-regulated gene expression', *Nuclear Receptor Signaling*, 7(1), p. nrs.07012. Available at: <https://doi.org/10.1621/nrs.07012>.
218. Roness, H. *et al.* (2013) 'Ovarian follicle burnout: a universal phenomenon?', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. United States, pp. 3245–3246. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.26358>.
219. Rubino, C. *et al.* (2003) 'Radiation dose, chemotherapy, hormonal treatment and risk of second cancer after breast cancer treatment', *British Journal of Cancer*, 89(5), pp. 840–846. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601138>.

220. Rudnicka, E. *et al.* (2021) ‘Anti-Müllerian Hormone in Pathogenesis, Diagnostic and Treatment of PCOS’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), p. 12507. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222212507>.
221. Sánchez, M. *et al.* (2020) ‘Isolation, Activation, and Mechanism of Action of Platelet-Rich Plasma and Its Applications for Joint Repair’, in *Regenerative Medicine*. IntechOpen. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.90543>.
222. Sanchez-Gonzalez, D.J., Mendez-Bolaina, E. and Trejo-Bahena, N.I. (2012) ‘Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration.’, *International journal of peptides*, 2012, p. 532519. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/532519>.
223. Sanfilippo, S. *et al.* (2015) ‘Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing’, *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 13, p. 67. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0065-5>.
224. Sar, M. and Welsch, F. (1999) ‘Differential Expression of Estrogen Receptor- $\beta$  and Estrogen Receptor- $\alpha$  in the Rat Ovary’, *Endocrinology*, 140(2), pp. 963–971. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo.140.2.6533>.
225. Schmahl, J., Rizzolo, K. and Soriano, P. (2008) ‘The PDGF signaling pathway controls multiple steroid-producing lineages’, *Genes & Development*, 22(23), pp. 3255–3267. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1723908>.
226. Schnorr, J. *et al.* (2002) ‘Functional studies of subcutaneous ovarian transplants in non-human primates: steroidogenesis, endometrial development, ovulation, menstrual patterns and gamete morphology.’, *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(3), pp. 612–619. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.612>.
227. Seyyed Anvari, S., Dehgan, G.H. and Razi, M. (2019) ‘Preliminary Findings of Platelet-Rich Plasma-Induced Ameliorative Effect on Polycystic Ovarian Syndrome.’, *Cell journal*, 21(3), pp. 243–252. Available at: <https://doi.org/10.22074/cellj.2019.5952>.
228. Sfakianoudis K, Simopoulou M and Nitsos N (2019) ‘A Case Series on Platelet-Rich Plasma Revolutionary Management of Poor Responder Patients.’, *Gynecol Obstet Invest.*, 84(1):99-106. Available at: <https://doi.org/10.1159/000491697>.
229. Sfikianoudis, K. *et al.* (2019) ‘Successful Implantation and Live Birth Following Autologous Platelet-rich Plasma Treatment for a Patient with Recurrent Implantation Failure and Chronic Endometritis’, *In Vivo*, 33(2), pp. 515–521. Available at: <https://doi.org/10.21873/invivo.11504>.



230. Shams Mofarahe, Z., Ghaffari Novin, M. and Salehnia, M. (2020) 'Folliculogenesis-Associated Genes Expression in Human Vitrified Ovarian Tissue after Xenotransplantation in  $\gamma$ -Irradiated Mice.', *Cell journal*, 22(3), pp. 350–357. Available at: <https://doi.org/10.22074/cellj.2020.6553>.
231. Shaw, J.M. *et al.* (1996) 'Ovary and Ovulation: Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients', *Human Reproduction*, 11(8), pp. 1668–1673. Available at: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019467>.
232. Shen, H. *et al.* (2017) 'Identification of key genes induced by platelet-rich plasma in human dermal papilla cells using bioinformatics methods', *Molecular Medicine Reports*, 15(1), pp. 81–88. Available at: <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5988>.
233. Shen, L. *et al.* (2019) 'CCL5 secreted by senescent theca-interstitial cells inhibits preantral follicular development via granulosa cellular apoptosis', *Journal of Cellular Physiology*, 234(12), pp. 22554–22564. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.28819>.
234. Sheshpari, S. *et al.* (2019a) 'Ovarian function and reproductive outcome after ovarian tissue transplantation: a systematic review', *Journal of Translational Medicine*, 17(1), p. 396. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02149-2>.
235. Sheshpari, S. *et al.* (2019b) 'Ovarian function and reproductive outcome after ovarian tissue transplantation: a systematic review', *Journal of Translational Medicine*, 17(1), p. 396. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02149-2>.
236. Shi, Q. *et al.* (2017) 'Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis', *Scientific Reports*, 7(1), p. 8538. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09005-7>.
237. Signorello, L.B. *et al.* (2006) 'Female Survivors of Childhood Cancer: Preterm Birth and Low Birth Weight Among Their Children', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 98(20), pp. 1453–1461. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/djj394>.
238. Silber, S. (2015) 'Unifying theory of adult resting follicle recruitment and fetal oocyte arrest', *Reproductive BioMedicine Online*, 31(4), pp. 472–475. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.022>.

239. Silber, S. (2016) ‘Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications’, *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016/10/08, 33(12), pp. 1595–1603. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0814-1>.
240. Sills, E.S. *et al.* (2018) ‘First data on *in vitro* fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium gluconate-activated autologous platelet rich plasma’, *Gynecological Endocrinology*, 34(9), pp. 756–760. Available at: <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1445219>.
241. Silva, L.Q. da *et al.* (2016) ‘Platelet Activation Is Not Crucial for Platelet-Rich Plasma (PRP), When Used As Autologous Therapeutic Product, and Could be Lyophilized without Any Growth Factor Loss’, *Blood*, 128(22), pp. 2639–2639. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.2639.2639>.
242. Sinning, C., Westermann, D. and Clemmensen, P. (2017) ‘Oxidative stress in ischemia and reperfusion: current concepts, novel ideas and future perspectives’, *Biomarkers in Medicine*, 11(11), pp. 11031–1040. Available at: <https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0110>.
243. Smitz, J. *et al.* (2010) ‘Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture , *in vitro* follicle development and transplantation : implications for fertility preservation’, 16(4), pp. 395–414. Available at: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp056>.
244. Soleimani, R. *et al.* (2011a) ‘Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise’, *Aging*, 3(8), pp. 782–793. Available at: <https://doi.org/10.18632/aging.100363>.
245. Soleimani, R. *et al.* (2011b) ‘Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise’, *Aging*, 3(8), pp. 782–793. Available at: <https://doi.org/10.18632/aging.100363>.
246. Sonmezer, M. and Oktay, K. (2010a) ‘Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation’, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 24(1), pp. 113–126. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2009.09.002>.
247. Sonmezer, M. and Oktay, K. (2010b) ‘Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation’, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 24(1), pp. 113–126. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2009.09.002>.
248. Sullivan, S.D., Sarrel, P.M. and Nelson, L.M. (2016) ‘Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause’,

- Fertility and Sterility*, 106(7), pp. 1588–1599. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.046>.
249. Sung, S. *et al.* (2022) ‘Hot flushes and sweating, sleep problems, joint and muscular discomfort, and physical and mental exhaustion in breast cancer survivors during the first 24 months of tamoxifen therapy: a prospective observational study’, *Frontiers in Oncology*, 12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.844926>.
  250. Sunkara, S.K. *et al.* (2011) ‘Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles’, *Human Reproduction*, 26(7), pp. 1768–1774. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/der106>.
  251. Takae, S. and Suzuki, N. (2019) ‘Current state and future possibilities of ovarian tissue transplantation.’, *Reproductive medicine and biology*, 18(3), pp. 217–224. Available at: <https://doi.org/10.1002/rmb2.12268>.
  252. Tang, Z.-R. *et al.* (2019) ‘Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease’, *Cells*, 8(10), p. 1123. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8101123>.
  253. Tavana, S. *et al.* (2017) ‘Auto-transplantation of whole rat ovary in different transplantation sites.’, *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 8(4), pp. 275–280.
  254. Teede, H. *et al.* (2019) ‘Anti-Müllerian Hormone in PCOS: A Review Informing International Guidelines.’, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 30(7), pp. 467–478. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.04.006>.
  255. Telfer, E.E. and Andersen, C.Y. (2021) ‘In vitro growth and maturation of primordial follicles and immature oocytes’, *Fertility and Sterility*, 115(5), pp. 1116–1125. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.004>.
  256. Thomas, M. and Storey, R. (2015) ‘The role of platelets in inflammation’, *Thrombosis and Haemostasis*, 114(09), pp. 449–458. Available at: <https://doi.org/10.1160/TH14-12-1067>.
  257. Utah Histology - Surgical Pathology (2017) ‘Collagen - Masson’s Trichrome Stain (TRI)’, pp. 1–4. Available at: <http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/MASSONS.PDF>.
  258. Varlas, V.N. *et al.* (2021) ‘Social Freezing: Pressing Pause on Fertility’, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(15), p. 8088. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph18158088>.

259. van der Ven, H. *et al.* (2016) ‘Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates’, *Human Reproduction*, 31(9), pp. 2031–2041. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dew165>.
260. Walker, Z., Lanes, A. and Ginsburg, E. (2022) ‘Oocyte cryopreservation review: outcomes of medical oocyte cryopreservation and planned oocyte cryopreservation’, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1), p. 10. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00884-0>.
261. Wallace, W.H.B. *et al.* (2005) ‘Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries’, *International Journal of Radiation Oncology\*Biological\*Physics*, 62(3), pp. 738–744. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.11.038>.
262. Wallace, W.H.B. and Kelsey, T.W. (2010) ‘Human Ovarian Reserve from Conception to the Menopause’, *PLoS ONE*. Edited by V.J. Vitzthum, 5(1), p. e8772. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008772>.
263. Wallach, E.E. and Robertson, J.A. (1987) ‘Ethical and legal issues in cryopreservation of human embryos’, *Fertility and Sterility*, 47(3), pp. 371–381. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)59040-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59040-2).
264. Wang, L. *et al.* (2013) ‘VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model’, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(10), pp. 1301–1311. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0043-9>.
265. Wang, Y. *et al.* (2012) ‘Effects of HMG on revascularization and follicular survival in heterotopic autotransplants of mouse ovarian tissue’, *Reproductive BioMedicine Online*, 24(6), pp. 646–653. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.02.025>.
266. Wasterlain, A.S. *et al.* (2013) ‘The systemic effects of platelet-rich plasma injection.’, *The American journal of sports medicine*, 41(1), pp. 186–193. Available at: <https://doi.org/10.1177/0363546512466383>.
267. Winship, Amy Louise *et al.* (2019) ‘Do BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers have a reduced ovarian reserve? Protocol for a prospective observational study’, *BMJ Open*, 9(11), p. e033810. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-033810>.

268. Winship, Amy L *et al.* (2019) ‘Vincristine Chemotherapy Induces Atresia of Growing Ovarian Follicles in Mice’, *Toxicological Sciences*, 169(1), pp. 43–53. Available at: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz022>.
269. Wiweko, B. *et al.* (2018) ‘The correlation between serum AMH and HOMA-IR among PCOS phenotypes.’, *BMC research notes*, 11(1), p. 114. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3207-y>.
270. Woodruff, T.K. and Shea, L.D. (2011) ‘A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health’, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(1), pp. 3–6. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9478-4>.
271. Wright, J.H. (1906) ‘The Origin and Nature of the Blood Plates’, *The Boston Medical and Surgical Journal*, 154(23), pp. 643–645. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM190606071542301>.
272. Wu, D. *et al.* (2009) ‘The effect of danshen on the angiogenesis of the frozen-thawed human fetal ovarian tissue after transplantation.’, *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi = Zhongguo yingyong shenglixue zazhi = Chinese journal of applied physiology*, 25(3), pp. 330–3.
273. Wu, D. *et al.* (2010) ‘Angiogenesis of the Frozen-Thawed Human Fetal Ovarian Tissue at the Early Stage after Xenotransplantation and the Positive Effect of *Salviae miltiorrhizae*’, *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 293(12), pp. 2154–2162. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.21228>.
274. Xu, X.R. *et al.* (2016) ‘Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond’, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 53(6), pp. 409–430. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408363.2016.1200008>.
275. Yan, R. *et al.* (2017) ‘Intratendon Delivery of Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma Improves Healing Compared With Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma in a Rabbit Achilles Tendinopathy Model’, *The American Journal of Sports Medicine*, 45(8), pp. 1909–1920. Available at: <https://doi.org/10.1177/0363546517694357>.
276. Yang, H. *et al.* (2008a) ‘Assessment of vascular endothelial growth factor expression and apoptosis in the ovarian graft: can exogenous gonadotropin promote angiogenesis after ovarian transplantation?’, *Fertility and sterility*, 90(4

- Suppl), pp. 1550–1558. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.08.086>.
277. Yang, H. *et al.* (2008b) ‘Assessment of vascular endothelial growth factor expression and apoptosis in the ovarian graft: can exogenous gonadotropin promote angiogenesis after ovarian transplantation?’, *Fertility and Sterility*, 90(4), pp. 1550–1558. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.08.086>.
278. Yin, H. *et al.* (2016) ‘Survival and growth of isolated pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue during long-term 3D culture’, *Human Reproduction*, 31(7), pp. 1531–1539. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dew049>.
279. Youm, H.W. *et al.* (2013) ‘Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation : effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified – warmed ovarian tissue survival’, 0(0), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/det449>.
280. Yucebilgin, M.S. *et al.* (2004) ‘Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: An animal model of premature ovarian failure and infertility’, *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 44(1), pp. 6–9. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2004.00143.x>.
281. van der Zee, R. *et al.* (1997) ‘Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor Augments Nitric Oxide Release From Quiescent Rabbit and Human Vascular Endothelium’, *Circulation*, 95(4), pp. 1030–1037. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.95.4.1030>.
282. Zhao, Q. *et al.* (2019) ‘Vitrification freezing of large ovarian tissue in the human body’, *Journal of ovarian research*, 12(1), p. 77. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0553-x>.
283. Zhu, Y. *et al.* (2020) ‘Platelet-Rich Plasma Combined with Low-Dose Ultrashort Wave Therapy Accelerates Peripheral Nerve Regeneration’, *Tissue Engineering Part A*, 26(3–4), pp. 178–192. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0187>.

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW  
po roku 2024.

.....