

Srovnání histologické struktury kryokonzervované ovariální tkáně metodou pomalého zamražení

Comparative analysis of the histological architecture of ovarian tissue following slow-freezing cryopreservation

V. Hončová¹, J. Vodička¹, Z. Slobodová², R. Pilka¹

¹ Porodnicko-gynekologická klinika LF UP a FN Olomouc

² Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc

Souhrn: **Cíl:** Cílem této studie bylo ověřit metodiku kryokonzervace ovariální tkáně metodou pomalého mražení jako metodu pro zachování fertility a její možné zavedení do klinické praxe Centra asistované reprodukce Fakultní nemocnice Olomouc. Současně byla optimalizována a nacvičena technika samotné kryokonzervace. **Soubor a metodika:** Studie probíhala v období od dubna 2022 do prosince 2024 na Porodnicko-gynekologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc a zahrnovala šest transgender pacientek ve věku 19–25 let, které podstoupily laparoskopickou hysterektomii s oboustrannou adnexektomií v rámci chirurgické tranzice. Získaná ovariální tkáň byla bezprostředně po vyjmutí zpracována a kryokonzervována metodou pomalého zamrazování v Centru asistované reprodukce Fakultní nemocnice Olomouc. Histopatologické hodnocení ovariální tkáně bylo provedeno před kryokonzervací, následně po rozmražení vzorků na Ústavu klinické a molekulární patologie Fakultní nemocnice Olomouc. **Výsledky:** Výsledky morfologického hodnocení ovariální tkáně po kryokonzervaci potvrdily zachovalost strukturálních charakteristik folikulů i stromální komponenty bez známek výrazné degenerace. **Závěr:** Výsledky tak potvrzují, že použitý protokol kryokonzervace ovariální tkáně metodou pomalého mražení je vhodný a dostatečně šetrný pro klinické využití. Tato metodika představuje spolehlivou možnost zachování plodnosti u pacientek podstupujících gonadektomii, s potenciálním uplatněním při následné transplantaci či *in vitro* kultivaci folikulů.

Klíčová slova: zachování fertility – kryokonzervace ovariální tkáně – pomalé mražení – onkofertilita – asistovaná reprodukce – *in vitro* fertilizace – transgender

Summary: **Objective:** The aim of this study was to validate the methodology of ovarian tissue cryopreservation using the slow freezing technique as a fertility preservation approach and to assess its potential implementation in clinical practice at the Assisted Reproduction Centre of the University Hospital Olomouc. In parallel, the technical procedure of cryopreservation was optimized and standardized. **Materials and methods:** The study was conducted between April 2022 and December 2024 at the Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Olomouc, and included six transgender patients aged 19–25 years who underwent laparoscopic hysterectomy with bilateral adnexectomy as part of gender-affirming surgery. Ovarian tissue obtained during the procedure was immediately processed and cryopreserved using the slow freezing method at the Assisted Reproduction Centre of the University Hospital Olomouc. Histopathological evaluation of the ovarian tissue was performed both prior to cryopreservation and after thawing at the Department of Clinical and Molecular Pathology. **Results:** Morphological assessment of the ovarian tissue after cryopreservation confirmed preservation of structural characteristics of follicles and stromal components, without signs of significant degeneration. **Conclusion:** The results confirm that the applied slow freezing protocol for ovarian tissue cryopreservation is appropriate and sufficiently gentle for clinical use. This method represents a reliable option for fertility preservation in patients undergoing gonadectomy, with potential applications in subsequent autologous transplantation or *in vitro* follicle culture.

Key words: fertility preservation – ovarian tissue cryopreservation – slow-freezing – oncofertility – assisted reproduction – *in vitro* fertilization – transgender

Úvod

Kryokonzervace ovariální tkáně (OTC – ovarian tissue cryopreservation) představuje slibnou možnost zachování plodnosti u žen a dívek, které jsou vystaveny riziku předčasného ovariálního selhání (POI – premature ovarian insufficiency) [1]. K tomuto riziku může vést onkologická léčba, genetické predispozice, autoimunitní onemocnění nebo chirurgické zákroky na reprodukčních orgánech [2]. Chemoterapie a radioterapie poškozují ovariální rezervu, což může mít za následek nejen neplodnost, ale i ztrátu hormonální funkce vaječníků s následným negativním dopadem na kostní metabolismus, kardiovaskulární systém a metabolismus [3]. Na rozdíl od kryokonzervace oocytů nebo embryí, která vyžaduje řízenou ovariální stimulaci gonadotropními hormony, je OTC vhodná i pro ženy, které hormonální terapii nemohou podstoupit, a lze ji provádět i u prepubertálních dívek [4]. Procedura zahrnuje laparoskopický odběr ovariální tkáně, která obsahuje nezralé primordiální folikuly, následné zamrazení ovariální tkáně, v časovém odstupu rozmrazení a transplantace ovariální tkáně zpět do těla pacientky. Po transplantaci může dojít nejen k obnovení plodnosti, ale také k obnovení hormonální funkce vaječníků, což může oddálit nástup menopauzy a zlepšit kvalitu života [5–7]. Od prvního úspěšného případu transplantace a porodu v roce 2004 došlo k významnému pokroku v této oblasti. Dnes již bylo celosvětově dosaženo více než 200 porodů po transplantaci kryokonzervované ovariální tkáně [8,9]. Americká společnost pro reprodukční medicínu (ASRM – the American Society for Reproductive Medicine) přestala v roce 2019 tuto metodu považovat za experimentální [10]. Výhodou metody je, že není závislá na menstruačním cyklu ani přítomnosti partnera a umožňuje provedení bezprostředně před zahájením gonadotoxické léčby [11]. Navzdory svým úspěchům se metoda potýká s problémy. Hlavními

problémy zůstává ztráta folikulů, oxidační a ischemické poškození [12]. U pacientů s akutní leukemií se OTC nedoporučuje kvůli riziku přenosu maligních buněk [13,14]. Transplantovaná tkáň má navíc omezenou životnost a někdy vyžaduje opakované transplantace [15].

Fyziologie a morfologie ovaria, význam primordiálních folikulů

Ovarium je párový orgán ženského reprodukčního systému s hlavními funkcemi gametogeneze (produkce oocytů) a endokrinní funkcí (hormonální sekrece). Nachází se v pánevní dutině, kde se jeho struktura i funkce během menstruačního cyklu a reprodukčního života mění [16,17].

Z histologického hlediska se ovarium skládá z kortexu, který obsahuje folikuly v různých vývojových stádiích, oocyty a podpůrné buňky, a z meduly obsahující krevní a lymfatické cévy, nervy a vazivo. Povrch ovaria tvoří jednovrstevný kubický epitel krytý tunica albuginea [18,19].

Folikulogeneze

Folikulogeneze je složitý proces vývoje folikulů od klidových primordiálních folikulů až po zralé Graafovy folikuly schopné ovulace. Proces se dělí na preantrální fázi řízenou lokálními autokrinními a parakrinními růstovými faktory nezávislými na gonadotropinech, a antrální fázi, v níž působí gonadotropiny (FSH – folikulostimulační hormon, LH – luteinizační hormon) a růstové faktory společně [20,21].

Primordiální folikuly jsou základní neobnovitelnou zásobou folikulů tvořenou oocytem zastaveným v profázi I meiózy, obklopeným jednou vrstvou plochých pregranulózních buněk. Tyto folikuly většinu života zůstávají v klidovém stavu a jejich počet představuje zásadní faktor určující reprodukční potenciál ženy [22,23].

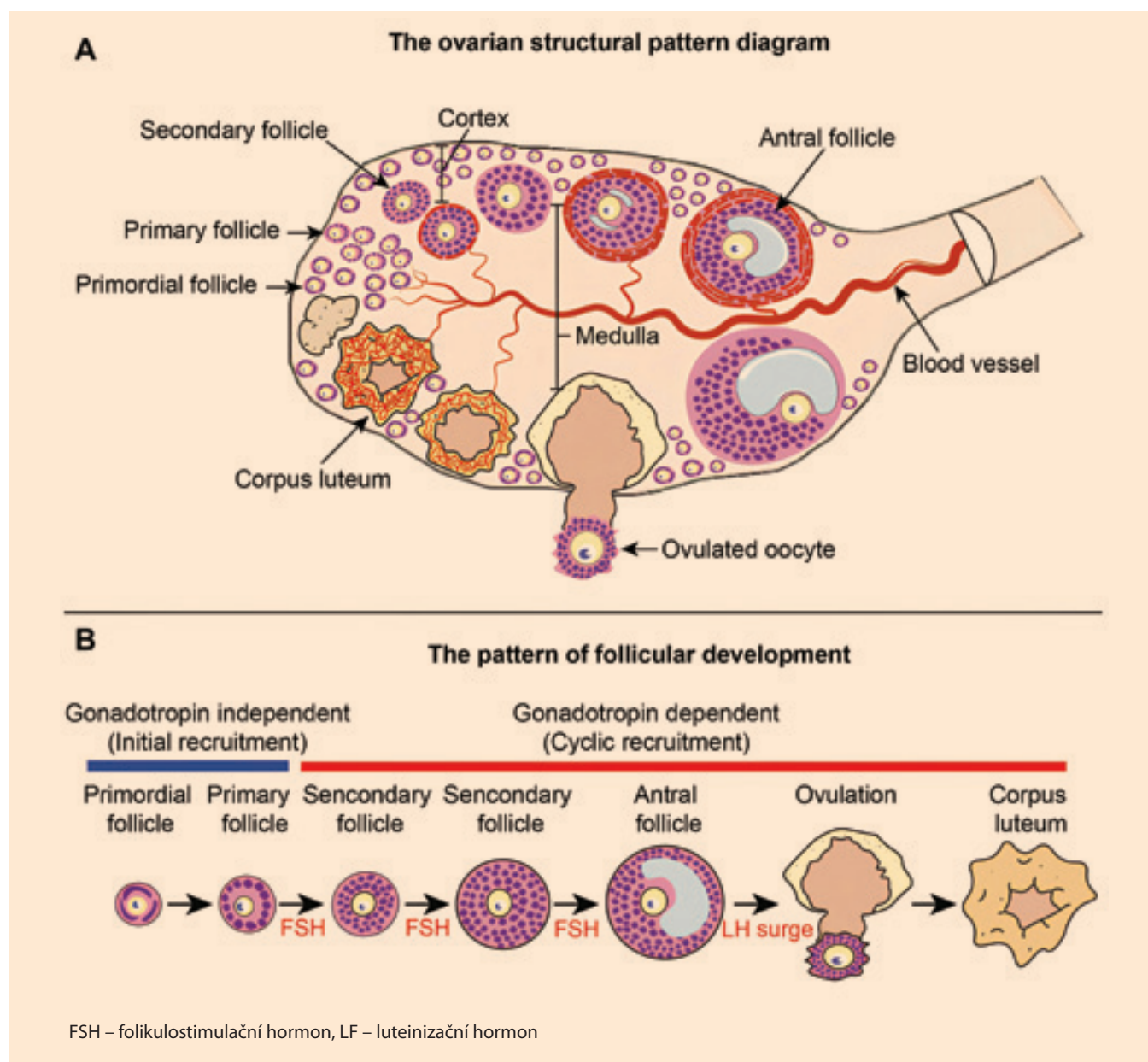
Primární folikul obsahuje oocyt obklopený jednovrstevnou vrstvou kubických granulózových buněk a je obalen

zona pellucida – glykoproteinovou vrstvou důležitou pro fertilizaci [24,25]. Sekundární folikul vykazuje vícevrstevnou granulózovou strukturu a vzniká obal theky. Jeho vývoj je řízen růstovými faktory produkovanými oocytem a okolními buňkami. Antrální folikul se vyznačuje vznikem tekutinou naplněného antra, které vytváří vhodné prostředí pro metabolickou a signální podporu oocyty, který je uložen v cumulus oophorus [26]. Graafovy folikuly představují zralé velké folikuly (18–25 mm), které pod vlivem LH dokončují meiózu I a uvolňují sekundární oocyt při ovulaci. Mezi nimi se rozlišují zdravé folikuly, které rostou a diferencují se, a atretické, které podléhají apoptóze (obr. 1) [27–29].

Metody kryokonzervace ovariální tkáně

Pomalé mrazení (slow-freezing) je v současnosti nejčastěji používanou metodou pro kryokonzervaci ovariální tkáně. Využívá řízené ochlazování pomocí programovatelného mrazicího zařízení, které podporuje tvorbu ledových krystalů převážně v extracelulárním prostoru. Tím dochází ke zvýšení osmolality a výstupu vody z buněk, čímž se minimalizuje riziko intracelulární krystalizace – hlavní příčiny poškození buněk při rychlém zamrazení. Příliš pomalé ochlazování však může způsobit dehydrataci a osmotický stres, což může negativně ovlivnit folikulární struktury. Moderní protokoly se proto snaží vyvážit ochranné a toxické účinky pomocí optimalizovaných chladicích křivek a kombinací permeačních a nepermeačních kryoprotektivních látek [30–32].

Vitrifikace je alternativní metoda založená na ultrarychlém ochlazení a vysoké koncentraci kryoprotektivních látek, které umožňují přechod do sklovitého (amorfního) stavu bez tvorby krystalů. Vyžaduje přesné a rychlé provedení – při zpomalení hrozí vznik krystalů a poškození buněk. Úspěšnost vitrifikace lze posoudit podle čírého vzhledu



Obr. 1. Schéma struktury ovaria a vývoje folikulů [23].

A) Folikuly v různých vývojových stádiích tvoří základní strukturální a funkční jednotku vaječníku. Primordiální folikuly se nacházejí hlavně v kůře, rostoucí folikuly se nacházejí hlavně v dřeni. Cévní systém ovaria zásobuje vaječnickovou tkáň a folikuly živinami, přičemž cévní systém kolem každého folikulu je relativně nezávislý.

B) Vývoj primordiálních folikulů do primárních folikulů je nezávislý na gonadotropinech, tento proces se nazývá aktivace primordiálních folikulů. Proces od vývoje primárních folikulů po ovulaci je fáze závislá na gonadotropinech. Proces vývoje primárních folikulů do preantrálních folikulů se nazývá cyklický nábor a je to fáze reakce na FSH. Antrální folikuly ovulují pod stimulací LH. Po ovulaci se granulózní buňky luteinizují a tvoří žluté tělísko.

Fig. 1. Diagram of the structure of the ovary and follicle development [23].

A) Follicles at various developmental stages represent the fundamental structural and functional units of the ovary. Primordial follicles are primarily located in the ovarian cortex, while growing follicles are mainly found in the medulla. The ovarian vascular system supplies nutrients to the ovarian tissue and follicles, with the vasculature surrounding each follicle being relatively independent.

B) The development of primordial follicles into primary follicles is independent of gonadotropins and is referred to as primordial follicle activation. The progression from primary follicles to ovulation constitutes the gonadotropin-dependent phase. The growth from primary to preantral follicles is known as cyclic recruitment and represents the FSH-responsive phase. Antral follicles undergo ovulation under LH stimulation. Following ovulation, granulosa cells undergo luteinization and form the corpus luteum.

vzorku, zakalení značí přítomnost ledu. Menší objem tkáně snižuje riziko krystalizace. I přes technickou dostupnost však chybí standardizovaný vitrificační protokol pro ovariální tkáň, což omezuje její širší využití [33,34].

Soubor pacientek

V období od dubna 2022 do prosince 2024 probíhala na Porodnicko-gynekologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL) studie zaměřená na analýzu ovariální tkáně u šesti transgender osob, které byly při narození přiřazeny jako ženy (AFAB – assigned female at birth). Účastnice studie byly ve věku 19–25 let, s průměrným věkem 21,7 roků a podstoupily chirurgickou změnu pohlaví (bilaterální ovariectomii).

Všechny pacientky byly dlouhodobě léčeny hormonální terapií s androgeny (Sustanon 500 mg i.m. 1krát za 2–4 týdny po dobu 12–36 měsíců). Provádění chirurgické změny pohlaví bylo možné pouze na základě souhlasného stanoviska odborné komise Ministerstva zdravotnictví České republiky pro provádění změn pohlaví u transsexuálních pacientů.

Pacientky poskytly informovaný souhlas nejen s provedením operace, ale také se zpracováním a využitím odebrané ovariální tkáně pro výzkumné účely. V rámci studie byly realizovány jednotlivé fáze – odběr, zpracování, kryokonzervace, rozmrazení a histopatologické zhodnocení ovariální tkáně.

Metodika a materiál

Chirurgický odběr

U všech pacientek bylo před samotným odběrem ovariální tkáně provedeno laboratorní vyšetření infekčních markerů sexuálně přenosných onemocnění (anti-HIV 1 a 2, HIV p24, HBsAg, anti-HBc, anti-HCV, syfilis) v souladu se standardy biologické bezpečnosti a příslušnými požadavky vyplývajícími ze zákona o specifických zdravotních službách a prováděcích předpisů pro oblast asistované

reprodukce. Tato vyšetření jsou nezbytná před uložením biologického materiálu do kapalného dusíku s cílem minimalizovat riziko kontaminace a přenosu infekce mezi vzorky uchovávanými v Dewarových nádobách.

Chirurgický odběr ovariální tkáně byl následně realizován v rámci laparoskopické hysterektomie s oboustrannou adnexektomií prováděné na Gynekologicko-porodnické klinice FNOL. Operační výkony proběhly podle standardních protokolů bez výskytu peroperačních komplikací. Peroperačně byla resekována část ovariální tkáně, která byla okamžitě přenesena do studeného manipulačního média G-MOPS (Vitrolife, Švédsko) a transportována k dalšímu zpracování do Centra asistované reprodukce FNOL. Resekovaná děloha s adnexy byla odeslána k histopatologickému vyšetření na Ústav klinické molekulární patologie FNOL [35,36].

Transport tkáně

Ovariální tkáň je před zpracováním transportována ve předem připraveném studeném médiu G-MOPS (Vitrolife, Švédsko), při teplotě 4–8 °C ve studeném izolovaném obalu. Veškerá manipulace se tkání je prováděna ve sterilním prostředí za použití sterilních pomůcek a technik. Tento teplotní rozsah je považován za bezpečný pro krátkodobou přepravu tkáně, obvykle do 48 hod, bez významného poškození folikulů. Studie prokázaly, že transport ovariální tkáně při 4–8 °C po dobu 24–48 hod nemá negativní dopad na folikulární aktivitu ani kvalitu tkáně [37,38]. Transport při této nízké teplotě odpovídá indukované hypotermii, která snižuje metabolickou aktivitu tkáně na minimum, a tím chrání buňky před poškozením. Klinické zkušenosti z Dánska a Německa dokumentují úspěšné těhotenství po transplantaci ovariální tkáně, která byla transportována ve studeném prostředí po dobu 5–20 hod před kryokonzervací, což potvrzuje relativní odolnost tkáně vůči chladu během přepravy [38–40].

Výhodou zavedení této metody na našem pracovišti je to, že operační zákrok i následné laboratorní zpracování probíhají v rámci jedné kliniky, čímž je doba transportu tkáně ze sálu do embryologické laboratoře minimální. To by mělo přispět k zachování vysoké kvality tkáně a optimalizaci výsledků kryokonzervace a následné transplantace.

Zpracování tkáně

Zpracování ovariální tkáně by mělo být zahájeno do 1 hod od jejího odběru, aby byla zachována maximální životaschopnost folikulů. Veškerá disekce by měla být prováděna za sterilních podmínek při teplotě 4 °C. Po odběru je nutné tkáň opláchnout ve studeném manipulačním médiu G-MOPS (Vitrolife, Švédsko) pro udržení optimálního pH. Během zpracování je nutné tkáň uchovávat v chladném médiu a pravidelně ji oplachovat, aby se zabránilo kontaminaci krví a zachovala se její kvalita. Pomocí tupé disekce je nutné pečlivě oddělit kortex od meduly ovaria. Kortikální tkáň by měla být důkladně očištěna od tukových a dřeňových zbytků (obr. 2) a upravena do plochého tenkého plátu (obr. 3). Pomocí sterilního skalpelu se kortikální plát nařeže na čtverce o velikosti 5,0 × 5,0 mm (obr. 4) nebo lamely o rozměrech 2,0 × 0,5 cm a maximální tloušťce 1 mm. Veškerá tkáň nevyužitá pro kryokonzervaci, převážně dřeň a také menší část kortexu, byla odeslána k histopatologickému vyšetření. Po dokončení zpracování ovariální tkáně je zaznamenán celkový počet získaných fragmentů kortikální tkáně, které jsou poté připraveny pro proces kryokonzervace metodou pomalého mražení.

Postup mražení

Pro zamrazení metodou pomalého zamražení bylo použito médium Embryo Freezing Pack, (Origio, Dánsko), které obsahuje 3 roztoky kryoprotektiv. Před zahájením samotného procesu mražení jsou předem připraveny zkumavky (CryoTubes) obsahující 0,9 ml

kryokonzervačního média (roztok č. 3), které jsou následně umístěny do lednice. Vlastní kryokonzervace začíná ekvilibrací ovariální tkáně v kryokonzervačním roztoku č. 1 po dobu 5 min při pokojové teplotě. Poté je tkáň přenesena do

roztoku č. 2 na 10 min a následně do roztoku č. 3, kde setrvá po dobu 15 min. Následně je tkáň vložena do připravené zkumavky (CryoTube) s vychlazeným roztokem č. 3 a doplněna na celkový objem 1,8 ml (obr. 5). Takto připravené

vzorky jsou umístěny na 30 min do lednice při teplotě 4 °C před následným mražením.

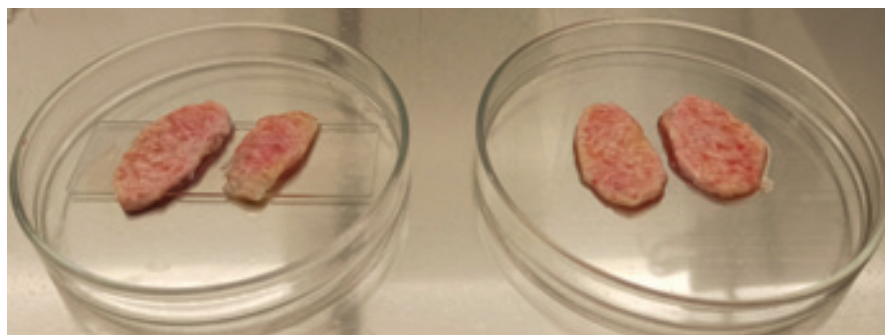
Mrazicí program

Následně jsou připravené vzorky ovariální tkáně umístěny do automatizovaného programovatelného mrazicího systému (Kryo-360, Planer, Velká Británie) (obr. 6). Proces mražení je řízen přesně definovaným programem s následující teplotní křivkou (obr. 7): ochlazování je zahájeno rychlostí -2 °C/min do teploty -9 °C . Po dosažení této teploty následuje 5 min ekvilibrace, po níž je proveden manuální seeding (obr. 8). Poté dojde k setrvání vzorku 5 min při této teplotě. Dále ochlazování pokračuje rychlostí $-0,3\text{ °C/min}$ do -40 °C , následně zrychleno na -10 °C/min do konečné teploty -140 °C . Poté jsou vzorky vyjmuty z přístroje a rychle přeneseny do Dewarovy nádoby s kapalným dusíkem (-196 °C) pro dlouhodobé skladování.



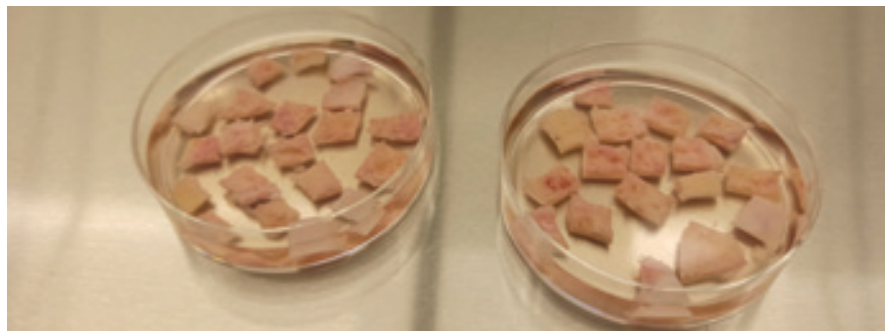
Obr. 2. Odstranění tukové a medulární části.

Fig. 2. Removal of the fatty and medullary parts.



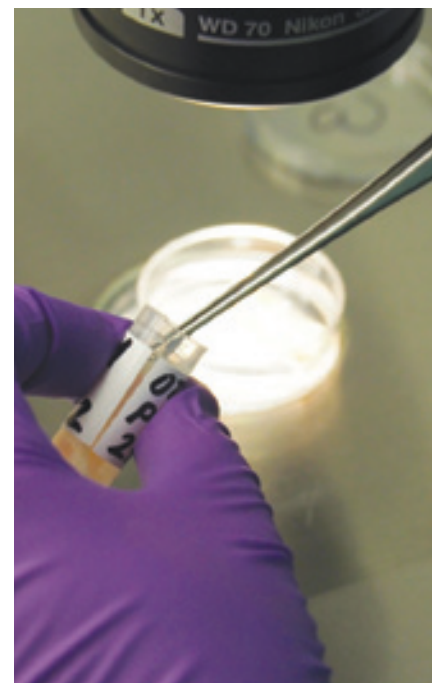
Obr. 3. Příprava tenkého plátu kortexu po odstranění tukové a medulární části.

Fig. 3. Preparation of a thin cortex slice after removal of the fatty and medullary parts.



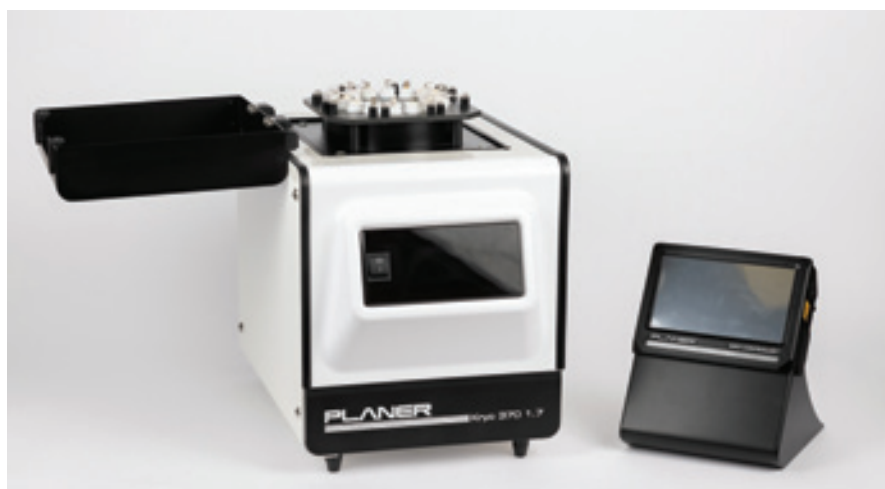
Obr. 4. Čtverečky kortexu (5 x 5 mm) připraveny pro kryokonzervaci.

Fig. 4. Cortex squares (5 x 5 mm) prepared for cryopreservation.



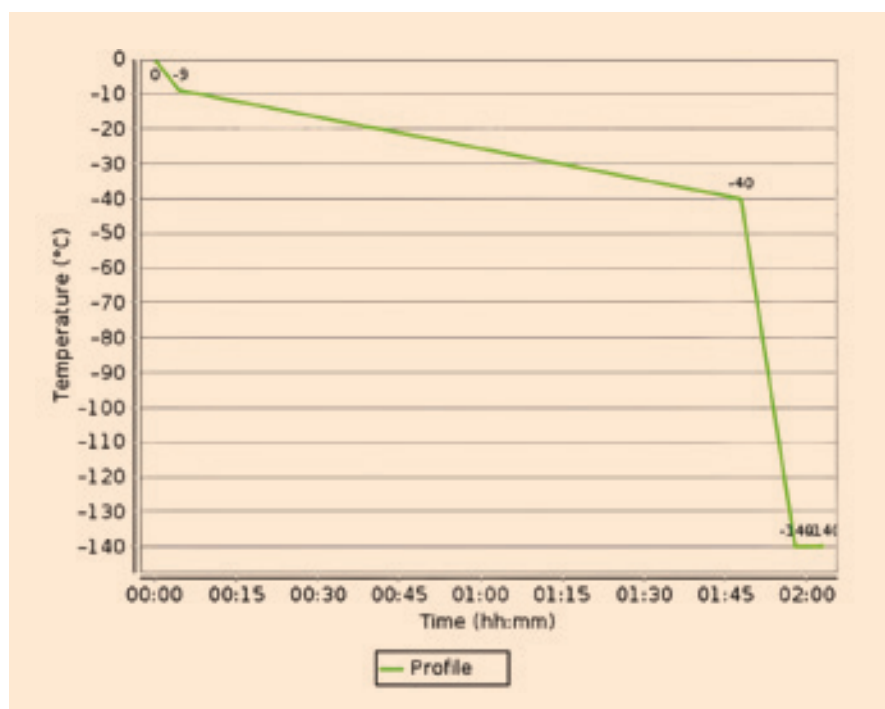
Obr. 5. Přesun ovariální tkáně do zkumavek pro následnou kryokonzervaci.

Fig. 5. Transfer of ovarian tissue to test tubes for subsequent cryopreservation.



Obr. 6. Kryogenní zařízení Planer Kryo 370 [41].

Fig. 6. Controlled freezing device Kryo 370 from Planer [41].



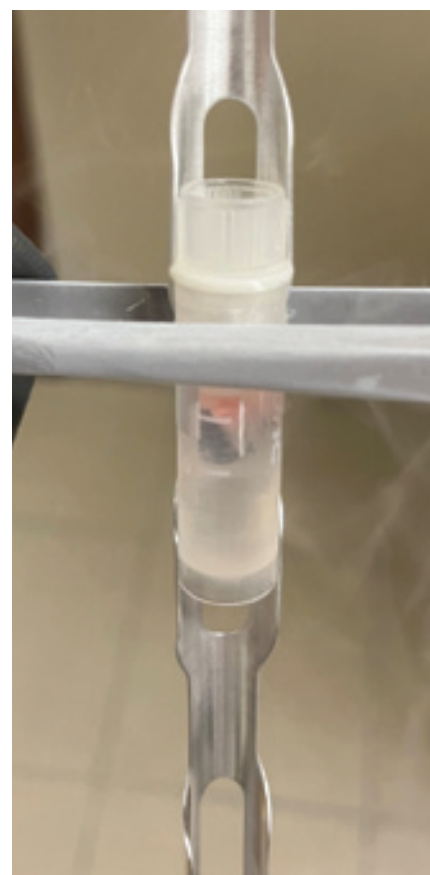
Obr. 7. Teplotní křivka procesu kryokonzervace (pomalé zamražení).

Fig. 7. Temperature curve of the cryopreservation process (slow-freezing).

Rozmražení

Rozmražení kryokonzervované ovariální tkáně probíhá podle standardizovaného protokolu, který zahrnuje postupnou rehydrataci a odstranění kryoprotektivních látek. Zkumavky s ovariální tkání jsou nejprve vyjmuty z kapalného dusíku a ponechány při pokojové teplotě po dobu 5 s. Následně jsou umístěny do vodní lázně o teplotě 37 °C na 2 min, čímž

dochází k řízenému rozmražení obsahu. Poté je ovariální tkáň postupně přenesena do série rozmrazovacích roztoků (Origio, Dánsko) při pokojové teplotě: nejprve do roztoku č. 1 po dobu 5 min, následně do roztoku č. 2 opět po dobu 5 min, poté do roztoku č. 3 na 10 min a nakonec do roztoku č. 4 bez časového omezení. Následně je tkáň přemíslena do manipulačního média G-MOPS



Obr. 8. Provedení manuálního seedingu.

Fig. 8. Performing manual seeding.

(Vitrolife, Švédsko) a ponechána zde po dobu 10 min před další manipulací. V našem případě ovariální tkáň nebyla použita k transplantaci, ale byla podrobena histopatologickému hodnocení za účelem posouzení kvality procesu kryokonzervace a následného rozmražení.

Histologické zpracování materiálu

Ovariální tkáň byla po odběru fixována v 10% neutrálně pufovaném formalínu po dobu 24 hod. Následně byly vzorky standardně zpracovány a zality do parafinových bloků na Ústavu klinické molekulární patologie FNOL. Od každé pacientky byly zpracovány všechny zaslané fragmenty, přičemž pro každý vaječník bylo připraveno 5–7 parafinových bloků. Stejný postup byl aplikován i u vzorků, které byly po kryokonzervaci znovu rozmrazeny. Z každého bloku byly připraveny 4 µm silné řezy, které byly obarveny

hematoxylinem a eozinem (HE). Takto připravené preparáty byly následně histologicky zhodnoceny patologem a vzájemně porovnány. Pro histologické zhodnocení byl použit mikroskop Olympus BX46.

Výsledky

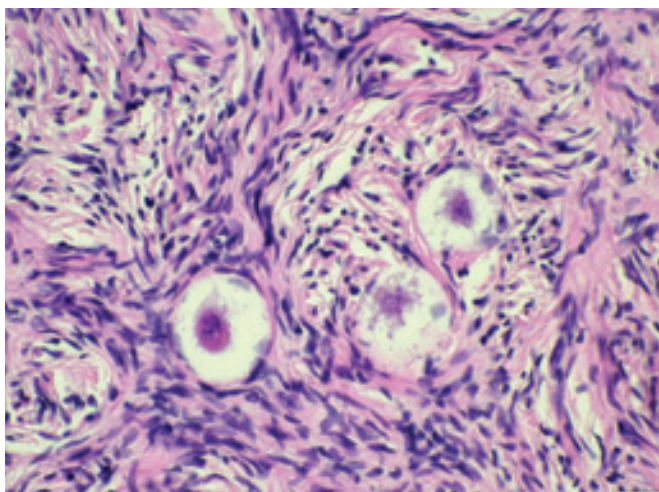
Ve zpracovaných fragmentech převažovala kortikální oblast s početným

zastoupením dobře zachovalých primordiálních folikulů (obr. 9a, 9b). Méně často byly přítomny folikuly primární (obr. 10a, 10b), nejméně četně byly detekovány folikuly sekundární (obr. 11a, 11b). Antrální folikuly (obr. 12a–12c) byly zachyceny pouze ojediněle a převážně ve formě parciálních fragmentů.

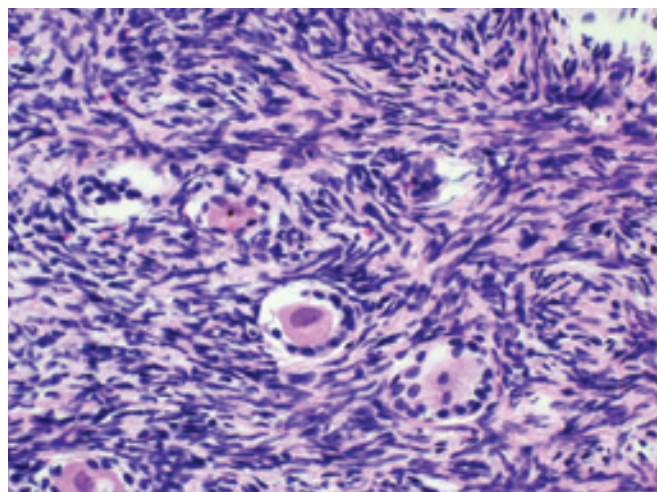
Medulární oblast tvořila přibližně 10–30 % objemu hodnoceného

materiálu. Její zastoupení bylo nižší u vzorků zpracovaných ve formě tkáňových kostek, naopak vyšší u vzorků připravených ve formě lamel.

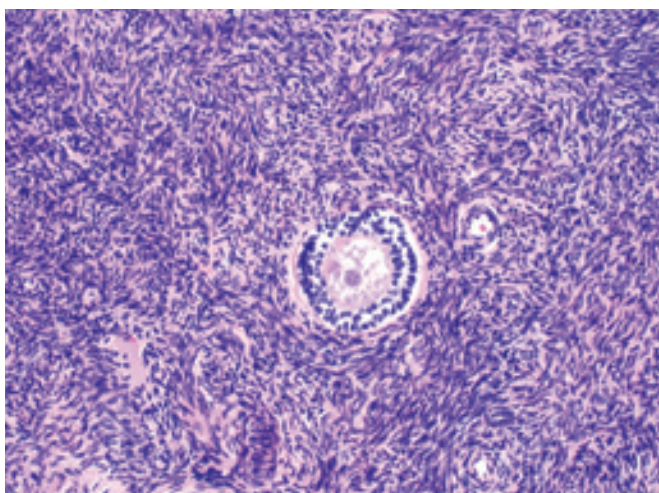
Ve vzorcích znovu rozmražené tkáně nebyly pozorovány výrazné morfologické odchylky ve srovnání s tkání, která neprošla procesem pomalého zamražení. Mírné prosáknutí až edém stromatu kortikální oblasti může být důsledkem



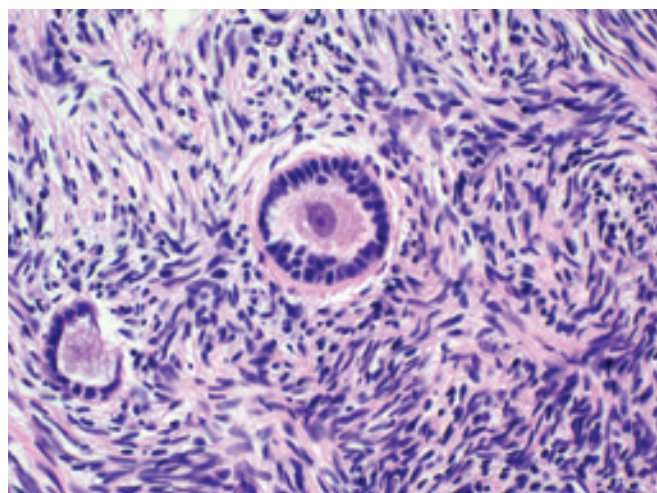
Obr. 9a. Histologický řez kortikální tkáně vaječníku před zamražením – primordiální folikl (barevný HE, 400×).
Fig. 9a. Histological section of ovarian cortical tissue before cryopreservation – primordial follicle (HE staining, 400×).
HE – hematoxylin a eozin



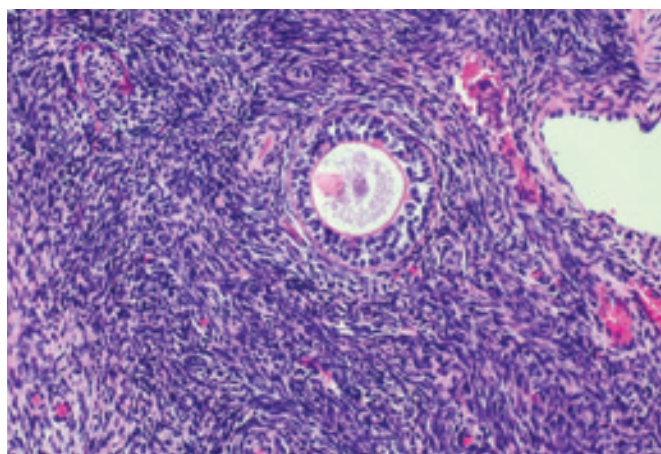
Obr. 9b. Histologický řez kortikální tkáně vaječníku po zamražení – primordiální folikl (barevný HE, 400×).
Fig. 9b. Histological section of ovarian cortical tissue after cryopreservation – primordial follicle (HE staining, 400×).
HE – hematoxylin a eozin



Obr. 10a. Histologický řez kortikální tkáně vaječníku před zamražením – primární folikl (barevný HE, 200×).
Fig. 10a. Histological section of ovarian cortical tissue before cryopreservation – primary follicle (HE staining, 200×).
HE – hematoxylin a eozin

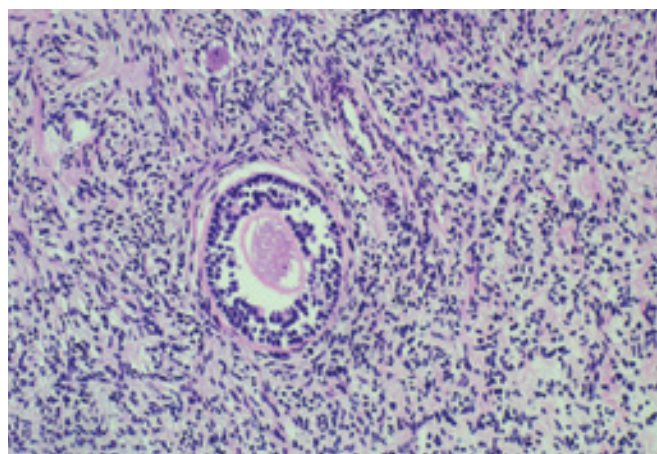


Obr. 10b. Histologický řez kortikální tkáně vaječníku po zamražení – primární folikl (barevný HE, 400×).
Fig. 10b. Histological section of ovarian cortical tissue after cryopreservation – primary follicle (HE staining, 400×).
HE – hematoxylin a eozin



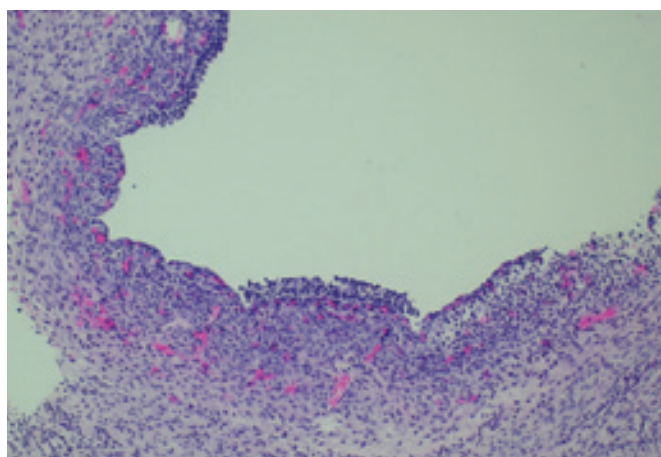
Obr. 11a. Histologický řez kortikální tkáně vaječníku před zamražením – sekundární folikl (barevný HE, 200×).

Fig. 11a. Histological section of ovarian cortical tissue before cryopreservation – secondary follicle (HE staining, 200×).
HE – hematoxylin a eozin



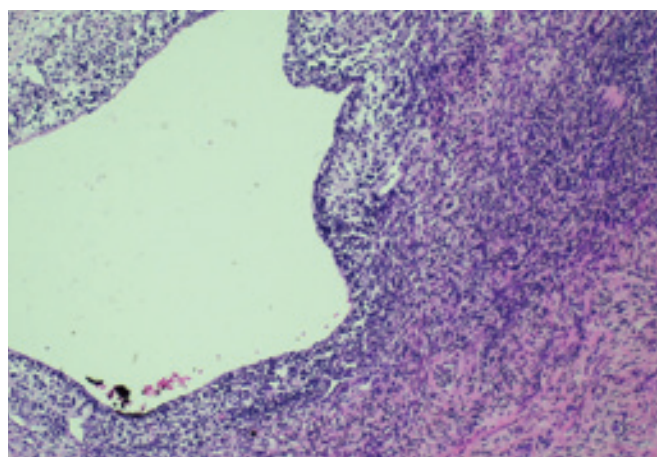
Obr. 11b. Histologický řez kortikální tkáně vaječníku po zamražení – sekundární folikl (barevný HE, 200×).

Fig. 11b. Histological section of ovarian cortical tissue after cryopreservation – secondary follicle (HE staining, 200×).
HE – hematoxylin a eozin



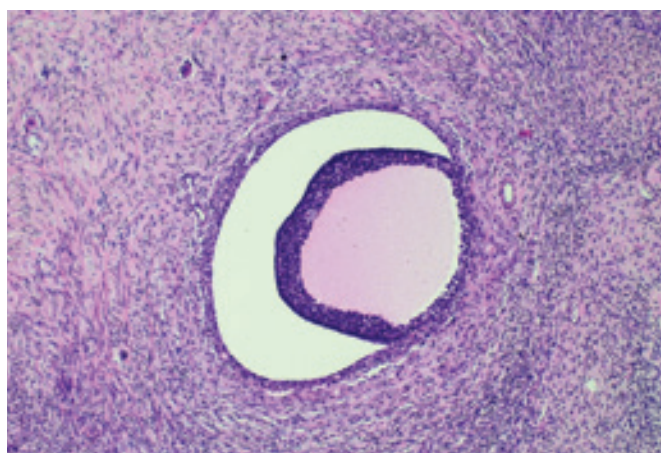
Obr. 12a. Histologický řez kortikální tkáně vaječníku před zamražením – antrální folikl (barevný HE, 100×).

Fig. 12a. Histological section of ovarian cortical tissue before cryopreservation – antral follicle (HE staining, 100×).
HE – hematoxylin a eozin



Obr. 12b. Histologický řez kortikální tkáně vaječníku po zamražení – antrální folikl (barevný HE, 100×).

Fig. 12b. Histological section of ovarian cortical tissue after cryopreservation – antral follicle (HE staining, 100×).
HE – hematoxylin a eozin



Obr. 12c. Histologický řez kortikální tkáně vaječníku po zamražení – antrální folikl (barevný HE, 100×).

Fig. 12c. Histological section of ovarian cortical tissue after cryopreservation – antral follicle (HE staining, 100×).
HE – hematoxylin a eozin

zpracování při fixaci a krájení, nelze však vyloučit ani vliv samotné kryokonzervace následného rozmražení. Tyto změny však nelze histologicky jednoznačně odlišit.

Morfologie folikulů všech vývojových stadií (primordiální, primární, sekundární) zůstala zachována, jednotlivé vrstvy folikulů byly dobře rozlišitelné a hodnotitelné.

V hodnocené ovariální tkáni nebyly přítomny žádné nádorové struktury, známky endometriózy ani jiné patologické změny.

Diskuze

Výsledky této studie ukazují, že kryokonzervace ovariální tkáně metodou pomalého mražení umožňuje zachování dobré morfologické integrity folikulů, zejména primordiálních, které tvoří klíčovou a nejpočetnější folikulární populaci v kortikální části ovaria. Tato zjištění potvrzují efektivitu metody pro uchování ovariální tkáně a podporují její využití v klinické praxi jako účinné strategie zachování plodnosti u vybraných skupin pacientek.

Dominance primordiálních folikulů ve vzorcích odpovídá jejich fyziologickému rozložení v ovariální tkáni mladých žen a potvrzuje správnost odběrové a zpracovatelské techniky, která upřednostňuje zachycení kortikální vrstvy. Ve všech hodnocených vzorcích byla morfologie primordiálních, primárních a sekundárních folikulů zachována, jednotlivé buněčné vrstvy byly histologicky rozlišitelné a nebyly patrné známky degenerace, apoptózy či ireverzibilního poškození. Přítomnost těchto struktur po kryokonzervaci a rozmražení odpovídá výsledkům dosavadních studií, které prokazují vysokou odolnost primordiálních folikulů vůči chladovému stresu a jejich schopnost přežít proces zamražení [42].

Mírné edematózní změny v kortikálním stromatu, pozorované u některých vzorků, mohou být částečně artefaktem fixace a parafinizace. Tyto změny jsou nicméně považovány za reverzibilní a nezhoršují hodnotitelnost ani kvalitu folikulární struktury. Podobné nálezy byly popsány i v jiných studiích zabývajících se histologickým hodnocením zamražené ovariální tkáně [43]. Zachování integrity stromatu je přitom důležité nejen z hlediska podpory přežívání folikulů, ale také pro revasularizaci transplantátu a jeho funkční integraci v místě reimplantace.

Z hlediska technického zpracování tkáně bylo zjištěno, že forma přípravy tkáně má přímý vliv na poměr zastoupení kortikální a medulární oblasti.

Zpracování tkáně do čtvercových bloků vede k vyššímu podílu kortexu, tedy vrstvy s nejvyšší folikulární hustotou a klinickým významem. Oproti tomu lamelární řezy obsahují více meduly, která je na folikuly chudší. Toto pozorování má významný dopad na optimalizaci laboratorních i operačních postupů, jelikož výběr vhodného tvaru a tloušťky preparátu může zvýšit efektivitu kryokonzervace a následné transplantace.

Laparoskopický odběr ovariální tkáně představuje v současnosti standardní přístup k zachování fertility u onkologických pacientek, a to zejména v případech, kdy není možné provést řízenou ovariální stimulaci a odběr oocytů – u prepubertálních dívek nebo u pacientek s potřebou urgentního zahájení gonadotoxické léčby. Výhodou této metody je nejen její univerzálnost, ale i fakt, že odběr lze provést nezávisle na menstruačním cyklu a bez nutnosti hormonální přípravy. Ve srovnání s jinými metodami nabízí transplantace ovariální tkáně také obnovení endogenní endokrinní funkce, což je významné z hlediska celkové kvality života pacientek po onkologické léčbě.

Významným přínosem této práce je detailní popsání celého procesu – od odběru přes laboratorní zpracování až po histopatologické vyhodnocení – v rámci jednoho pracoviště. Krátká doba transportu tkáně a zachování chladového řetězce zvyšují pravděpodobnost zachování folikulární integrity a podporují kvalitu výsledné kryokonzervace.

Studie rovněž ukazuje potenciál využití ovariální tkáně odebrané u transgender osob, které byly při narození přiřazeny jako ženy (AFAB). I přes dlouhodobou hormonální terapii androgeny byly ve všech případech nalezeny dobře zachovalé folikuly všech vývojových stadií.

Kryokonzervace ovariální tkáně metodou pomalého zmražení umožňuje zachování struktury folikulů i celkové histologické integrity tkáně.

Výsledky podporují použití této metody nejen u onkologických pacientek, ale i u dalších skupin, například pacientek s genetickým rizikem předčasného ovariálního selhání. Optimalizace laboratorních protokolů a standardizace operační techniky mohou dále zvýšit její klinickou efektivitu a bezpečnost. Zajištění multidisciplinární spolupráce mezi onkology, gynekology, embryology a patologií bude klíčem k úspěšnému začlenění této metody do širší klinické praxe zachování fertility.

Závěr

Histologické hodnocení potvrdilo, že ovariální tkáň kryokonzervovaná metodou pomalého zamražení si zachovává dobrou morfologii folikulů včetně intaktní struktury. Výsledky dále ukázaly, že zpracování tkáně ve formě čtverečků je lepší pro zachování vyššího podílu funkčně významné kortikální oblasti.

Nepřítomnost patologických struktur potvrzuje vhodnost takto uchované tkáně pro klinické využití, zejména v rámci autotransplantačních strategií fertilitní ochrany u onkologických pacientek.

Literatura

1. Spears N, Lopes F, Stefansdottir A et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Hum Reprod Update* 2019; 25(6): 673–693. doi: 10.1093/humupd/dmz027.
2. Sheshpari S, Shahnazi M, Mobarak H et al. Ovarian function and reproductive outcome after ovarian tissue transplantation: a systematic review. *J Transl Med* 2019; 17(1): 396. doi: 10.1186/s12967-019-02149-2.
3. Clark RA, Mostoufi-Moab S, Yasui Y et al. Predicting acute ovarian failure in female survivors of childhood cancer: a cohort study in the Childhood Cancer Survivor Study (CCSS) and the St Jude Lifetime Cohort (SJLIFE). *Lancet Oncol* 2020; 21(3): 436–445. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30818-6.
4. Anderson RA, Wallace WH, Telfer EE. Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: clinical and research perspectives. *Hum Reprod Open* 2017; 2017(1): hox001. doi: 10.1093/hropen/hox001.

5. Andersen CY, Bollerup AC, Kristensen SG. Defining quality assurance and quality control in ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a call to action. *Hum Reprod* 2018; 33(7): 1201–1204. doi: 10.1093/humrep/dey105.
6. Diaz-Garcia C, Domingo J, Garcia-Velasco JA et al. Oocyte vitrification versus ovarian cortex transplantation in fertility preservation for adult women undergoing gonadotoxic treatments: a prospective cohort study. *Fertil Steril* 2018; 109(3): 478.e2–485.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.11.018.
7. Gellert SE, Pors SE, Kristensen SG et al. Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. *J Assist Reprod Genet* 2018; 35(4): 561–570. doi: 10.1007/s10815-018-1144-2.
8. Marin L, Bedoschi G, Kawahara T et al. History and current state of ovarian tissue auto-transplantation with cryopreserved tissue: a successful translational research journey from 1999 to 2020. *Reprod Sci* 2020; 27(4): 955–962. doi: 10.1007/s43032-019-00066-9.
9. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D et al. Live-birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364(9443): 1405–1410. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17222-X.
10. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril* 2019; 112(6): 1022–1033. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.09.013.
11. Haering C, Coyne K, Daunov K et al. Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation in patients with hemoglobin disorders: a comprehensive review. *J Clin Med* 2024; 13(13): 3631. doi: 10.3390/jcm13133631.
12. Dolmans MM, von Wolff M, Poirot C et al. Transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a series of 285 women: a review of five leading European centers. *Fertil Steril* 2021; 115(5): 1102–1115. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.03.008.
13. Meirow D, Hardan I, Dor J et al. Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. *Hum Reprod* 2008; 23(5): 1007–1013. doi: 10.1093/humrep/den055.
14. Soares M, Saussoy P, Maskens M et al. Elimination of malignant cells from cryopreserved ovarian tissue is possible in leukaemia patients. *Br J Haematol* 2017; 178(2): 231–239. doi: 10.1111/bjh.14657.
15. Kim SS. Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(6): 489–493. doi: 10.1007/s10815-012-9757-3.
16. Marco A, Gargallo M, Ciriza J et al. Current fertility preservation steps in young women suffering from cancer and future perspectives. *Int J Mol Sci* 2024; 25(8): 4360. doi: 10.3390/ijms25084360.
17. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *N Engl J Med* 2017; 377(17): 1657–1665. doi: 10.1056/NEJMr1614676.
18. Martínek J, Vacek Z. *Histologický atlas*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing 2009.
19. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier 2017.
20. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest* 2010; 120(4): 963–972. doi: 10.1172/JCI41350.
21. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986; 1(2): 81–87. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136365.
22. Sadler TW. *Langman's medical embryology*. 14th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer 2019.
23. Zhang T, He M, Zhang J et al. Mechanisms of primordial follicle activation and new pregnancy opportunity for premature ovarian failure patients. *Front Physiol* 2023; 14: 1113684. doi: 10.3389/fphys.2023.1113684.
24. Williams CJ, Erickson GF. Morphology and physiology of the ovary. In: *Endotext*. 2005 [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>.
25. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. *Fertil Steril* 2003; 80(1): 116–122. doi: 10.1016/s0015-0282(03)00544-2.
26. Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1996; 1(3): 162–172. doi: 10.1530/ror.0.0010162.
27. Knight PG, Glicker C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006; 132(2): 191–206. doi: 10.1530/rep.1.01074.
28. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001; 122(6): 829–838. doi: 10.1530/rep.0.1220829.
29. Richards JS, Jahnsen T, Hedin L et al. Ovarian follicular development: from physiology to genes. *Recent Prog Horm Res* 1987; 43: 231–276. doi: 10.1016/b978-0-12-571143-2.50012-5.
30. Jensen AK, Kristensen SG, Macklon KT et al. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. *Hum Reprod* 2015; 30(12): 2838–2845. doi: 10.1093/humrep/dev230.
31. Anderson RA, Wallace WH, Telfer EE. Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: clinical and research perspectives. *Hum Reprod Open* 2017; 2017(1): hox001. doi: 10.1093/hropen/hox001.
32. Amorim CA, Shikanov A. The artificial ovary: current status and future perspectives. *Future Oncol* 2016; 12(20): 2323–2332. doi: 10.2217/fon-2016-0202.
33. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247(3 Pt 1): C125–C142. doi: 10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125.
34. Newton H, Aubard Y, Rutherford A et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996; 11(7): 1487–1491. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019423.
35. Perelli F, Fusi G, Lonati L et al. Laparoscopic ovarian tissue collection for fertility preservation in children with malignancies: a multicentric experience. *Front Surg* 2024; 11: 1352698. doi: 10.3389/fsurg.2024.1352698.
36. Beckmann MW, Dittrich R, Lotz L et al. Fertility protection: complications of surgery and results of removal and transplantation of ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2018; 36(2): 188–196. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.10.109.

Publikační etika: Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

Publication ethics: The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE uniform requirements for biomedical papers.

Konflikt zájmů: Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie/práce nemají žádný konflikt zájmů.

Conflict of interests: The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning the drugs, products or services used in the study.

Dedikace: Podpořeno MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892).

Dedication: Supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (FNOI, 00098892).

37. Duncan FE, Zelinski M, Gunn AH et al. Ovarian tissue transport to expand access to fertility preservation: from animals to clinical practice. *Reproduction* 2016; 152(6): R201–R210. doi: 10.1530/REP-15-0598.
38. Hončová V. Kryokonzervace ovariální tkáně jako metoda pro zachování fertility u žen. *Ceska Gynekol* 2023; 88(1): 44–51. doi: 10.48095/cccg202344.
39. Bastings L, Liebenthron J, Westphal JR et al. Efficacy of ovarian tissue cryopreservation in a major European center. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31(8): 1003–1012. doi: 10.1007/s10815-014-0239-7.
40. Dittrich R, Hackl J, Lotz L et al. Pregnancies and live births after 20 transplantations of cryo-

preserved ovarian tissue in a single center. *Fertil Steril* 2015; 103(2): 462–468. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.045.

41. HARVEY MAIN. Planer Kryo 370. 2025 [online]. Available from: <https://www.harveymain.com/products/Planer/Kryo370.php>.

42. Donnez J, Jadoul P, Squifflet J et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010; 24(1): 87–100. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2009.09.003.

43. Rosendahl M, Greve T, Andersen CY. The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: a review of the literature. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30(1): 11–24. doi: 10.1007/s10815-012-9912-x.

ORCID autorů

V. Hončová 0000-0001-7066-7853

J. Vodička 0000-0003-0446-4454

Z. Slobodová 0000-0001-7755-048X

R. Pilka 0000-0001-8797-1894

Doručeno/Submitted: 26. 7. 2025

Přijato/Accepted: 30. 7. 2025

Mgr. Veronika Hončová

Porodnicko-gynekologická klinika

LF UP a FN Olomouc

Zdravotníků 248/7

779 00 Olomouc

veronika.honcova@fnol.cz