

Reprodukční funkce u onkologických pacientek

Reproductive Functions in Women after Cancer Therapy

Záhumenský J.¹, Feldmár P.², Kučera E.¹, Zmrhal J.¹, Gojiš O.¹, Kosová T.², Bendová M.¹, Stejskal D.²

¹ Gynekologicko-porodnická klinika, 3. LF UK a FN Královské Vinohrady Praha

² Centrum lékařské genetiky a reprodukční medicíny, Gennet Praha

Souhrn

Zlepšením včasné diagnostiky a možností léčby se zvyšuje procento přeživších mladých onkologických pacientů v reprodukčním věku. Tyto pacienti si celoživotně nesou důsledky léčby, zejména na reprodukční funkci, jedná se o neplodnost, předčasnou menopauzu a sexuální dysfunkce. Těmto pacientkám máme možnost nabídnout zachování plodnosti i pomocí metod asistované reprodukce. Metodou s nejvyšší úspěšností je stimulace ovarií, s následným ICSI a zmražením embryí. Metoda je však vhodná jenom pro pacientky se stálým partnerem, u kterých nehrozí riziko z prodlevy kvůli nutné stimulaci ovulace. U pacientek bez partnera je možné zmrazit stimulované oocyty. Jako velice slibná a málo zatěžující metoda se jeví odběr a zmražení nezralých oocytů s následní *in vitro* maturací. Zmražené ovariální tkáně s následnou transplantací nutno zatím považovat za metodu experimentální. Autoři uvádí i své zkušenosti s *in vitro* maturací oocytů u 28 žen s pregnancy rate – 14,3 %. Indikací k IVM byla v 27 případech neplodnost s vysokým rizikem ovariálního hyperstimulačního syndromu, v jednom případě se jednalo o pacientku před chemoterapií pro karcinom prsu.

Klíčová slova

fertilita – *in vitro* maturace – asistovaná reprodukce – malignity – chemoterapie – radioterapie

Summary

Improvement in early diagnostics and treatment options led to an increase in the number of young oncological patients in reproductive age. These young oncological patients have life-long consequences of treatment, such as infertility, early menopause and sexual dysfunctions. There is the possibility of maintaining fertility by assisted reproduction methods. So far, ovarian stimulation followed by ICSI and cryopreservation of embryos seem to be the most successful method. Unfortunately, this method is suitable only for patients with a stable partner where there is no risk of delay because of necessary stimulation of ovulation. For patients without a partner, it is possible to freeze stimulated oocytes. Cryopreservation of immature oocytes followed by *in vitro* maturation seems to be a very promising method. Freezing ovarian tissues followed by transplantation is at this point only an experimental procedure. The authors present their experience with *in vitro* maturation of oocytes of 28 women with pregnancy rate 14.3%. Twenty-seven cases of infertility with a high risk of ovarian hyperstimulation syndrome and one case of breast cancer patient before chemotherapy were chosen for IVM.

Key words

fertility – fertilization *in vitro* – assisted reproduction techniques – cancer – chemotherapy – radiotherapy

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

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

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



doc. MUDr. Jozef Záhumenský, Ph.D.
Gynekologicko-porodnická klinika
3. LF UK a FN Královské Vinohrady
Šrobárova 50
100 00 Praha 10
e-mail: jozef.zahumensky@fnkv.cz

Obdrženo/Submitted: 5. 12. 2011

Přijato/Accepted: 9. 1. 2012

Úvod

V roce 2008 bylo v České republice nově diagnostikováno 38 242 zhoubných nádorů u žen, z toho 11,2 % (cca 4 280) u žen ve věku 15–44 let (zdroj ÚZIS). Většina z těchto nádorů vyžaduje cytostatickou, radiační nebo operační léčbu, která se dotýká reprodukčních orgánů.

Rozvojem preventivních programů roste časný záchyt nádorů, který spolu s rozvojem nových moderních chemoterapeutik zlepšuje přežívání pacientů. Ztráta plodnosti zapříčiněná terapií je pro tyto přeživší zásadním negativním faktorem ovlivňujícím kvalitu jejich dalšího života [1]. U žen může být ztráta plodnosti po onkologické léčbě důvodem závažné chronické psychosociální deprivace a postižená na ni nahlíží jako na ztrátu ženskosti [2,3].

Funkce ovarii

Postupný pokles počtu oocytů je normální proces, který probíhá během celého života ženy, od fetálního vývoje až po menopauzu. Ve 20. týdnu gravidity má plod ženského pohlaví 6–7 milionů oocytů, v období porodu jejich počet klesá na milion a žena ve věku 37 let má kolem 25 000 oocytů. Atrie folikulů je normální proces, který se progresivně zrychluje až do menopauzy [4]. Tento akcelerovaný pokles počtu oocytů kolem 40. roku života je spojen s nižším počtem úspěšných otěhotnění, vyšším rizikem aneuploidity a zvýšeným počtem sponzánních potratů [5].

Funkce ovarii po onkologické léčbě závisí na způsobu léčby, na celkové dávce medikamentů a na věku pacientky. Starší ženy mají vyšší riziko kompletního selhání vaječníků a vzniku permanentní neplodnosti oproti mladším ženám právě z důvodu nižší ovarialní rezervy [6].

Vliv onkologické léčby na sexuální zdraví

Současná onkologická léčba zlepšuje dlouhodobé přežívání postižených dětí a mladistvých, ale vede k různým reprodukčním problémům, jako je abnormální pubertální vývoj, infertilita, předčasné selhání gonád a sexuální dysfunkce [7]. Většina bývalých onkologických pacientů může vést plnohod-

notný produktivní život, jehož součástí je i sexualita a reprodukce. Léčba poruch sexuálního života však může narážet na překážky způsobené samotným základním onemocněním nebo komorbiditou. Spolupráce s odborníkem na reprodukční endokrinologii před a po léčbě rakoviny může výrazně přispět k zachování reprodukčních schopností těchto osob [8].

Gonadální toxicita

Ovarium na rozdíl od testis obsahuje konečný počet neobnovitelných zárodečných buněk, které jsou citlivé na toxický účinek chemoterapeutik a radioterapie [9]. Trvání reprodukčních schopností ženy je ohraničeno počtem folikulů; onkologická léčba může způsobovat atrezii folikulů a jejich destrukci, což vede k předčasnému ovarialnímu selhání, neplodnosti a menopauze [10].

Chemoterapeutika účinkují narušením normálního buněčného cyklu, čímž indukují buněčnou apoptózu. Alkylací látky (cyklofosfamid, ifosfamid, busulfan nebo dacarbazin), jejichž účinek není specificky vázán na některou fázi buněčného cyklu, jsou spolu s pánevní radioterapií nejrizikovější právě z důvodu ireverzibilního zásahu do struktury DNA [11,12]. Cyklofosfamid prokazatelně ničí i primordiální folikuly a riziko vzniku amenorey po jeho nasazení je 27–60 % [13]. Cisplatina a její analoga zvyšují riziko předčasného ovarialního selhání s relativním rizikem (RR) 1,77 [14]. Metotrexát a fluorouracil jsou specifické pro určitou fázi cyklu a mají nižší toxicitu, jejich hlavním účinkem je ovlivnění maturace oocytů. Teenagerky léčené na onkologické onemocnění mají 4× vyšší riziko vzniku předčasného ovarialního selhání, pokud je léčba podávána ženám ve věku 21–25 let, tak je riziko až 27× vyšší [15]. Kompletní amenorea bývá zjištěná po dávce 5 g cyklofosfamidu u žen nad 40 let, po dávce 9 g u žen ve věku 30–40 let a po dávce 20 g u žen ve věku 20–30 let [16]. Cytostatická léčba se nejčastěji podává v kombinaci, čímž se zvyšuje gonadální toxicita. Po léčbě MOPP (mechlorethamin, prednison, procarbazin a vincristin)/ABV (bleomycin, doxorubicin, vinblastin) se amenorea vyskytuje u 20 % žen pod 25 let

a u 89 % žen nad 25 let [17]. Předčasné ovarialní selhání způsobuje nejenom neplodnost, ale nese s sebou i další závažné komplikace spojené s nedostatkem estrogenů, jako jsou osteoporóza, kardiovaskulární nemoci, urologické problémy a sexuální dysfunkce.

Největší riziko předčasného ovarialního selhání s sebou nese celotělové ozáření a intenzivní chemoterapie před transplantací kostní dřeně. Vysokodávkovaná chemoterapie (často se jedná o vysoce cytotoxickou kombinaci cyklofosfamidu s busulfanem) a radioterapie vedou k následnému selhání ovarii téměř ve všech případech [18]. Po autologní nebo alogenní transplantaci hematogenních kmenových buněk otěhotní jenom 0–6 % žen [19].

Na dělohu má toxický vliv i radioterapie, která může vést ke zvýšenému riziku opakovaných těhotenských ztrát [20]. Ozáření hlavy vyššími dávkami ionizujícího záření způsobuje porušení osy hypothalamus–hypofýza–gonády a může způsobit poruchy pubertálního vývoje nebo sekundární gonadální insuficienci [21,22].

Fertilita

Pro onkologické pacienty je možnost mít děti i důležitým stimulem pro absolvování léčby a motivací k „boji“ se svým onemocněním [23]. Pohovor o reprodukčních rizicích a možnostech zachování fertility by měl být součástí poradenství ještě před začátkem terapie. Po ukončení léčby je doporučováno zhodnotit kvalitu reprodukčních funkcí. U žen případná antikoncepce může maskovat příznaky ovarialního selhání, ale i ženy s pravidelným, přirozeným menstruačním cyklem mají po léčbě zvýšené riziko předčasné menopauzy, neplodnosti a dlouhodobých důsledků estrogení deplece [24,25]. Nástup příznaků ovarialního selhání, jako jsou nepravidelnosti menstruačního cyklu a vazomotorické příznaky, znamená minimální šanci na oplodnění navzdory nejlepší léčbě.

Měření ovarialní rezervy pomocí bazálních hladin FSH, inhibinu B, anti-Müllerianského hormonu a počtu antrálních folikulů je užitečným ukazatelem ovarialních funkcí i u žen s pravidelnou menstruací [26,27]. Tento monito-

ring může být přínosem zejména u žen, které neabsolvovaly postupy na zachování fertility ještě před začátkem terapie. Ženy po onkologické léčbě by měly být referovány do centra asistované reprodukce dříve než ostatní páry (dříve než po 12 měsících nechráněné koitální aktivity), protože mají kratší časový prostor pro zachování plodnosti.

Data ze studií sledujících těhotenství po onkologické léčbě jsou povzbudivá, těhotenství nezvyšuje riziko návratu onkologického onemocnění ani u hormon dependentních nádorů, jako je například rakovina prsu [28]. Některé studie potvrdily zvýšené riziko porodu novorozenců s nízkou porodní hmotností u žen po onkologické léčbě, zejména s anamnézou ozáření pánevní oblasti [29]. Předpokládaným důvodem nepříznivého těhotenského výsledku je přímé poškození myometria a uterinních cév [30]. Ženy, které otěhotní s odstupem minimálně 5 let po léčbě, nemají zvýšené riziko vrozených vývojových vad u dětí [31] a jejich děti nemají zvýšené riziko vzniku rakoviny oproti ostatní populaci [32]. Prenatální péče a poradenství u těchto žen by měly být multidisciplinární, zejména kvůli mnohým komplikacím a důsledkům předešlé onkologické terapie. I když většina žen po onkologické léčbě je schopna donosit zdravý plod bez důsledků, existuje i malá skupina, u které těhotenství představuje vysoké až neúnosné riziko. V těchto případech je potřebné důkladné předkoncepční poradenství.

Kontracepce

Neplánovaná gravidita v průběhu onkologické léčby nebo těsně po ní může mít velice nepříznivé následky – může výrazně ovlivnit možnosti léčby a samotné těhotenství je vysoce rizikové. Po ukončení léčby je vhodné počkat s plánováním gravidity minimálně 2 roky.

Rozhodování o pokračování nebo ukončení neplánované gravidity u onkologické pacientky bývá velice složité, proto se doporučuje projednání spolehlivé ochrany před otěhotněním už na začátku terapie. Samozřejmě je nutné vzít do úvahy všechny kontraindikace možných antikoncepčních metod.

Menopauzální příznaky

Předčasné selhání ovarií vede k vazomotorickým příznakům, poruchám spánku, únavě a sexuální dysfunkcím. Tyto příznaky výrazně snižují kvalitu života žen. Nízkodávkovaná hormonální terapie nebo antikoncepční přípravky uvedené příznaky nejenom řeší, ale působí preventivně i proti úbytku kostní hmoty. Pacientkám, u kterých je estrogenní léčba kontraindikována, je možno nabídnout alternativní léčbu, úpravu životosprávy nebo selektivní inhibitory serotoninových receptorů [33]. Při léčbě sexuálních dysfunkcí a poševní suchosti mohou pomoci lubrikační látky a lokální estrogény, které lze podat pacientkám, u nichž je celková léčba estrogény kontraindikována [34].

Sexuální dysfunkce

Více než 20 % osob po onkologické léčbě udává jistý stupeň sexuálních dysfunkcí, nejčastěji se jedná o osoby léčené na kolorektální, gynekologické a prsní malignity. Samotným onemocněním i jeho léčbou jsou ovlivněny všechny fáze sexuální reaktivity, u žen je nejčastějším příznakem pokles libida a suchost pochvy. Změna tělesného vzhledu během léčby taky negativně ovlivňuje sexuální funkce. Sexuální rehabilitace po onkologické léčbě výrazně zlepšuje kvalitu života [35].

Možnosti zachování fertility u onkologických pacientek

Dostupnost metod asistované reprodukce u onkologických pacientů podporuje 82 % populace, zatímco u HIV pozitivních je to jenom 38 % [36]. Možnosti zachování fertility u žen zahrnují tyto kryoprezervační techniky:

- kryoprezervace embryí,
- kryoprezervace oocytů,
- kryoprezervace nezralých oocytů a následné IVM,
- kryoprezervace ovariální tkáně.

Kryoprezervace embryí

Jedná se o účinnou a efektivní metodu, ale jenom v případě, kdy je možné u pacientky získat stimulované zralé oocyty a pacientka má stálého partnera. U adolescentních pacientek, u žen, u nichž je potřebné rychle začít léčbu a kdy je kon-

traindikováno podání gonadotropinu, tuto metodu není možné použít.

Zmrazení ovariální tkáně

Pro pacientky vyžadující okamžitou chemoterapii je zmrazení ovariální tkáně další reálnou alternativou kromě zmrazení nezralých oocytů. Principem metody je následná reimplantace tkáně do pánevní nebo do břišní stěny či předloktí [37,38]. Mikroskopická ultrastruktura folikulů po vitifikaci a zmrazení ovariální tkáně se neliší od čerstvé tkáně [39]. Jistou nevýhodou je i potenciální riziko přenosu metastáz ovariálních tkání, metodu nutno zatím považovat spíše za experimentální a popisované gravidity jsou jenom ve formě kazuistik.

Kryoprezervace zralých oocytů

Zmrazení oocytů je alternativní možností pro pacientky, které splňují podmínky pro zmrazení embryí, ale nemají stálého partnera. Uskladnění zralých oocytů má své limity v relativně malé úspěšnosti, oocyty jsou na zmrazování citlivé, často dochází k poškození cytoskeletu a aneuploiditě. Ultrarychlé zmrazení a vitifikace představují jistou výhodu oproti konvenčním metodám [40]. Nevýhodou je nutnost hyperstimulace ovarií dle protokolů, která má své nežádoucí efekty (ovariální hyperstimulační syndrom) a která posouvá možnost cytostatické léčby minimálně o 14 dní. U estrogen dependentních nádorů není stimulační léčba vhodná.

Kryoprezervace nezralých oocytů

Zmrazení nestimulovaných nezralých oocytů představuje jistou výhodu oproti stimulovaným oocytům, protože u nich chybí meiotické vřetýnko a genetický materiál je chráněn jadernou membránou. Zmrazené nezralé oocyty projdou následně *in vitro* maturací, dokončí se první meiotické dělení a dokončí se maturace cytoplazmy až do fáze fertilizace a včasného embryonálního vývoje [41]. Kryoprezervaci nezralých oocytů a IVM (*in vitro* maturation) možno použít i u některých adolescentních pacientek, nutno však aplikovat nízké dávky gonadotropinů. Získání oocytů může být u těchto sexuálně nezralých osob ob-

tížné, proto je nutná velice přísná selekce [42].

Největší výhodou je redukce množství použitých gonadotropinů, čímž odpadá riziko ovariálního hyperstimulačního syndromu. *In vitro* maturation (IVM) je termín, který se používá ke zrání oocyty ve stadiu germinálních vezikulů. Bylo zjištěno, že i při stimulaci pro provedení *in vitro* fertilizace a intracytoplazmatické sperm injekci (IVF/ICSI) přibližně 20 % oocytů zůstává ve stadiu germinálních vezikulů a nejsou schopny reagovat na podání hCG. Když se tyto oocyty obnaží od cumulus oophorus, můžou dozrát do metafáze II a být oplodněny, embrya však vykazují vysoké počty aneuploidii, patrně pro nižší kvalitu získaných oocytů [43]. Problém odlišení kvalitních a nekvalitních oocytů je příčinou nižší úspěšnosti metody. Za typické IVM se považuje odběr oocytů v cyklu, kdy vedoucí folikuly nepřesáhnou velikost 12 mm [44]. Nejmenší rozměr folikulu, ze kterého se dá získat oocyt schopný maturace, je 6 mm, tyto oocyty mají však nízkou schopnost fertilizace a embryonálního vývoje [45].

Nízké dávky FSH od 3. do 5. dne cyklu s následným podáním hCG zvyšují počet získaných oocytů schopných fertilizace oproti nestimulovaným IVM cyklům [46]. Tato možnost s následným zmrazením oocytů je nyní ve světě nejvíce používanou metodou při zachování fertility u onkologických patientek [47]. Je však obtížné vytvořit jednotný postup, který by pokryl všechny pacientky. Nejlepší strategií je vypracování individuálního plánu, který by závisel na anamnéze pacientky, ovariální rezervě, hormonálním profilu a indikaci k onkologické léčbě. Šetrné použití FSH a hCG u IVM redukuje nežádoucí účinky suprafyziologických dávek FSH, které se používá u klasických IVF/ICSI technik. Nevýhodou je nižší úspěšnost ve srovnání s klasickým IVF, i když některé práce ukazují srovnatelné výsledky oproti klasické hyperstimulaci [48]. Další perspektivní možností je kombinace IVM s následným odběrem přirozeně dozrálého vajíčka u ovulujících žen [49].

Nemalou výhodou IVM je i nižší cena a nižší potřeba návštěv pacientky na pracovišti. Není potřebné opako-

vané UZV sledování růstu folikulů (folikulometrie).

Naše zkušenosti s IVM

V našem zařízení (Gennet) jsme k dnešnímu dni provedli 28 odběrů k IVM. Ve 27 případech byla indikací neplodnost u syndromu polycystických ovaríí a s vysokým rizikem ovariálního hyperstimulačního syndromu, v jednom případě se jednalo o pacientku s diagnostikovaným karcinomem prsu před plánovanou chemoterapií. Používáme jednotný protokol publikovaný Fadinim et al [46]. Podáváme FSH 3.–5. den cyklu (150 IU), 7.–9. den provedeme UZV vyšetření, při rozměrech folikulů nad 8 mm s dominantním folikulem velikosti 10–12 mm podáme 10 000 j hCG. Po 38 hod provedeme odběr oocytů pomocí 17G jehly a vakuové aspirace, získané oocyty propláchneme heparinovým roztokem a kultivujeme v IVM médiu; za 24–48 hod dosahují oocyty stadia MII. Následně je možné provést oplodnění metodou ICSI (intracytoplazmatická sperm injekce) nebo zmrazení pomocí vitrifikace. U nás zavádíme maximálně dvě embrya, zatím máme 4 těhotné pacientky (pregnancy rate 14,3 %). Metodou vitrifikace a zmrazení nyní disponujeme na našem pracovišti a jsme plně připraveni rozšířit indikační spektrum o onkologické pacientky.

Literatura

1. Bencova V, Bella V, Svec J. The dynamics of psychosocial burden development in breast cancer survivors: clinical success with psychosocial consequences. *Klin Onkol* 2011; 24(3): 203–208.
2. Rosen A, Rodriguez-Wallberg KA, Rosenzweig L. Psychosocial distress in young cancer survivors. *Semin Oncol Nurs* 2009; 25(4): 268–277.
3. Coufal O, Sporcova I, Vrtelova P. What patients need to know before their breast cancer surgery. *Klin Onkol* 2011; 24(5): 343–347.
4. Lobo RA. Potential options for preservation of fertility in women. *N Engl J Med* 2005; 353(1): 64–73.
5. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA et al. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996; 11(10): 2217–2222.
6. Maltaris T, Beckmann MW, Dittich R. Review. Fertility preservation for young female cancer patients. *In Vivo* 2009; 23(1): 123–130.
7. Gracia CR, Ginsberg JP. Fertility risk in pediatric and adolescent cancers. *Cancer Treat Res* 2007; 138: 57–72.
8. West ER, Zelinski MB, Kondapalli LA et al. Preserving female fertility following cancer treatment: current options and future possibilities. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53(2): 289–295.
9. Johnson J, Canning J, Kaneko T et al. Germine stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428(6979): 145–150.

10. Sklar CA, Mertens AC, Mitby P et al. Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(13): 890–896.
11. Meirou D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 2001; 7(6): 535–543.
12. Meirou D, Epstein M, Lewis H et al. Administration of cyclophosphamide at different stages of follicular maturation in mice: effects on reproductive performance and fetal malformations. *Hum Reprod* 2001; 16(4): 632–637.
13. Wetzel JF. Cyclophosphamide-induced gonadal toxicity: a treatment dilemma in patients with lupus nephritis? *Neth J Med* 2004; 62(10): 347–352.
14. Hancke K, Isachenko V, Isachenko E et al. Prevention of ovarian damage and infertility in young female cancer patients awaiting chemotherapy-clinical approach and unsolved issues. *Support Care Cancer* 2011; 19(12): 1909–1919.
15. Larsen EC, Müller J, Schmiegelow K et al. Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(11): 5307–5314.
16. Shalet SM. Effects of cancer chemotherapy on gonadal function of patients. *Cancer Treat Rev* 1980; 7(3): 141–152.
17. Schilsky RL, Sherins RJ, Hubbard SM et al. Long-term follow up of ovarian function in women treated with MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease. *Am J Med* 1981; 71(4): 552–556.
18. Donnez J, Dolmans MM. Preservation of fertility in females with haematological malignancy. *Br J Haematol* 2011; 154(2): 175–184.
19. Lutchman Singh K, Davies M, Chatterjee R. Fertility in female cancer survivors: pathophysiology, preservation and the role of ovarian reserve testing. *Hum Reprod Update* 2005; 11(1): 69–89.
20. Critchley HO, Wallace WH. Impact of cancer treatment on uterine function. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 34: 64–68.
21. Bath LE, Anderson RA, Critchley HO et al. Hypothalamic-pituitary-ovarian dysfunction after prepubertal chemotherapy and cranial irradiation for acute leukaemia. *Hum Reprod* 2001; 16(9): 1838–1844.
22. Goodwin T, Delasobera BE, Fisher PG. Reproductive health issues in survivors of childhood and adult brain tumors. *Cancer Treat Res* 2009; 150: 215–222.
23. Letourneau JM, Ebbel EE, Katz PP et al. Pretreatment fertility counseling and fertility preservation improve quality of life in reproductive age women with cancer. *Cancer* 2012; 118(6): 1710–1717.
24. Byrne J. Infertility and premature menopause in childhood cancer survivors. *Med Pediatr Oncol* 1999; 33(1): 24–28.
25. Letourneau JM, Ebbel EE, Katz PP et al. Acute ovarian failure underestimates age-specific reproductive impairment for young women undergoing chemotherapy for cancer. *Cancer* 2012; 118(7): 1933–1939.
26. Bath LE, Wallace WH, Shaw MP et al. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Müllerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod* 2003; 18(11): 2368–2374.
27. Larsen EC, Müller J, Reznitz C et al. Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and basal FSH <10 IU/l. *Hum Reprod* 2003; 18(2): 417–422.
28. Blakely LJ, Buzdar AU, Lozada JA et al. Effects of pregnancy after treatment for breast carcinoma on survival and risk of recurrence. *Cancer* 2004; 100(3): 465–469.
29. Hawkins MM, Smith RA. Pregnancy outcomes in childhood cancer survivors: probable effects of abdominal irradiation. *Int J Cancer* 1989; 43(3): 399–402.

30. Critchley HO. Factors of importance for implantation and problems after treatment for childhood cancer. *Med Pediatr Oncol* 1999; 33(1): 9–14.
31. Green DM, Zevon MA, Lowrie G et al. Congenital anomalies in children of patients who received chemotherapy for cancer in childhood and adolescence. *N Engl J Med* 1991; 325(3): 141–146.
32. Nagarajan R, Robison LL. Pregnancy outcomes in survivors of childhood cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 34: 72–76.
33. Schover LR. Premature ovarian failure and its consequences: vasomotor symptoms, sexuality, and fertility. *J Clin Oncol* 2008; 26(5): 753–758.
34. Dew JE, Wren BG, Eden JA. A cohort study of topical vaginal estrogen therapy in women previously treated for breast cancer. *Climacteric* 2003; 6(1): 45–52.
35. Barbera L, Fitch M, Adams L et al. Improving care for women after gynecological cancer: the development of a sexuality clinic. *Menopause* 2011; 18(12): 1327–1333.
36. Mok-Lin E, Missmer S, Berry K et al. Public perceptions of providing IVF services to cancer and HIV patients. *Fertil Steril* 2011; 96(3): 722–727.
37. Ernst E, Bergholdt S, Jørgensen JS et al. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 2010; 25(5): 1280–1281.
38. Sánchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V et al. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril* 2010; 93(1): 268.e11–e13.
39. Sheikh M, Hultenby K, Niklasson B et al. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Hum Reprod* 2011; 26(3): 594–603.
40. Cobo A, Domingo J, Pérez S et al. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2008; 10(5): 268–273.
41. Revel A, Revel-Vilk S, Aizenman E et al. At what age can human oocytes be obtained? *Fertil Steril* 2009; 92(2): 458–463.
42. Oktem O, Oktay K. Fertility preservation for breast cancer patients. *Semin Reprod Med* 2009; 27(6): 486–492.
43. Nogueira D, Staessen C, Van de Velde H et al. Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Fertil Steril* 2000; 74(2): 295–298.
44. Smits JE, Thompson JG, Gilchrist RB. The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation. *Semin Reprod Med* 2011; 29(1): 24–37.
45. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001; 121(1): 51–75.
46. Fadini R, Dal Canto MB, Mignini Renzini M et al. Effect of different gonadotrophin priming on IVM of oocytes from women with normal ovaries: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2009; 19(3): 343–351.
47. Oktay KH. Options for preservation of fertility in women. *N Engl J Med* 2005; 353(13): 1418–1420.
48. Mikkelsen AL. Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome. *Reprod Biomed Online* 2005; 10(5): 593–599.
49. Tang-Pedersen M, Westergaard LG, Erb K et al. Combination of IVF and IVM in naturally cycling women. *Reprod Biomed Online* 2012; 24(1): 47–53.