

שימור פוריות על ידי הקפאת רקמת אשך בילדים לפני גיל ההתבגרות העוברים טיפול גונדוטוקסי - תוצאות ראשוניות

תקציר:

הקדמה: שימור פוריות בקרב מטופלים העוברים טיפול רפואי שעלול להופכם לבלתי פוריים, הוא כיום חלק מחייב מהטיפול. עם זאת, בעוד שבזכרים בוגרים ניתן להקפיא זרע לצורך שימור פוריות, הרי שבילדים טרם גיל ההתבגרות עדיין לא נוצרים תאי זרע הניתנים להקפאה ושימור רקמת אשך, וניסיון זה נמצא עדיין בשלבי מחקר. במכרסמים הצלחנו להדגים יכולת הבשלה של תאי הנבט לתאים דמויי תאי זרע המסוגלים לעבור תגובת אקרזום.

מטרות: לגדל, להרבות ולשמר תאי נבט מרקמת אשך של ילדים בתנאי מעבדה, על מנת לאפשר פוריות עתידית לילדים לפני גיל ההתבגרות המיועדים לטיפול גונדוטוקסי תוקפני (אגרסיבי).

שיטות: ילדים המיועדים לעבור כימותרפיה במינון גבוה, אשר עלולה לפגוע בפוריותם, הופנו למרכז הרפואי אוניברסיטאי סורוקה. נלקחה דגימה מרקמת אשך אחד. רוב דגימת האשך הועברה להקפאה לצורך שימור, וחלק מהרקמה הועבר לצורך ניסיון גידול והבשלת תאי הנבט (ספרמטוגוניות) בתנאי מעבדה.

תוצאה: לראשונה, הצלחנו לגדל תאי רקמת אשך למשך תקופה של יותר מחודשיים. בתרבות נצפו תאים בודדים או בצברים בגדלים שונים. חלק מהתאים נצבעו ו/או ביטאו סמנים ייחודיים לשלב הטרנסמיזיט, ובנוסף לכך תאים אחרים ביטאו סמנים ייחודיים לשלב המיזיט.

מסקנות: תוצאות חיוביות ומעודדות של גידול התאים בתרבות וסימנים לחלוקות מיזיטיות הודגמו לראשונה בתנאי מעבדה. יש צורך בהמשך המחקר על מנת להגיע להבשלת זרע מלאה בתנאי מעבדה, תוך בחינת תקינות תאים אלו מבחינת גנטית ואפיגנטית לפני הזרקתם לביציות לצורך הפריה ויצירת עוברים.

אבי הרלב^{1*}
מראם אבופול-עזוב^{2*}
איריס הר ורדי¹
אליהו לויטס¹
איתן לונפלד^{3,1}
מחמוד חליח^{3,2}

¹היחידה לפוריות והפריה חוץ גופית, החטיבה למיילדות וגינקולוגיה, מרכז רפואי אוניברסיטאי סורוקה, הפקולטה למדעי הבריאות, אוניברסיטת בן גוריון בנגב, באר שבע
²המחלקה למיקרוביולוגיה, אימונולוגיה וגנטיקה על שם שרגא סגל, ³המרכז לחקר מתקדם וחינוך ברבייה, הפקולטה למדעי הבריאות, אוניברסיטת בן גוריון בנגב, באר שבע

*השתתפו במחקר באופן שווה.

מילות מפתח:

:KEY WORDS

תאי נבט של תאי זרע; הקפאת רקמת אשך; טיפול גונדוטוקסי; כימותרפיה תוקפנית; תירבות; גידול והתמיינות תאי נבט של תאי זרע.
Spermatogonial stem cells; Cryopreservation of testicular tissue; Gonadotoxic therapy; Aggressive chemotherapy; Culture growth and differentiation of spermatogonial stem cells; Fertility preservation in pre pubertal boys

הקדמה

כימותרפיה במינון גבוה, השתלת לשד עצם (Bone marrow) וטיפול בקרינה הניתנים בשל מחלה ממארת או בשל מחלה אחרת, עלולים לגרום לעקרות בלתי הפיכה של המטופל עקב פגיעה בגונדות [1]. מאידך, השיפור בטיפול הניתן לילדים הלוקים בסרטן, העלה באופן משמעותי את שיעור השורדים את המחלה ומבריאים. ההערכה היא שבארה"ב כיום, אחד מתוך 640 בוגרים צעירים הוא ילד ששרד לאחר טיפול במחלה ממארת [2]. לפי דיווח ב-Childhood Cancer Survivor Study [3], הטיפול הציטוטוקסי מפחית ב-44% את שיעור הפוריות לעתיד של זכרים צעירים. בעוד שזכרים בוגרים יכולים להקפיא זרע, הרי שבילדים טרם גיל ההתבגרות הנזקקים לכימותרפיה בשל מחלה ממארת, או מסיבה אחרת, כגון מחלה המטולוגית המצריכה השתלת לשד עצם, עדיין אין ייצור של תאי זרע בוגרים הניתנים להקפאה, ושימור הפוריות שלהם מהווה אתגר משמעותי [4].

באופן תקין, אשכיו של ילד טרם גיל ההתבגרות מכילים תאי נבט, כולל Spermatogonial stem cells (SSC) שבתנאים המתאימים, עם התבגרותו של הנער, ייצרו תאי זרע בוגרים. טיפול גונדוטוקסי טרם ההתבגרות המינית עלול לפגוע ביכולת תאי הנבט ליצור

זרע בעתיד. לפיכך, הקפאת רקמת אשך המכילה את תאי הנבט, הוצעה כאפשרות לשימור פוריות באותם ילדים ובלבד שתימצא השיטה להבשלת תאי הנבט לתאי זרע בוגרים בתנאי מעבדה [5] או שיטה יעילה אחרת, כגון השתלה או הזרקה אוטולוגית של תאים אלו לאחר ההחלמה ממחלת הרקע [6]. לעת עתה, כל היישומים הקליניים של הקפאת רקמת האשך הם ניסיוניים [4]. השתלת רקמת אשך אוטולוגית נחקרה על מודלים רבים של בעלי חיים, עם תוצאות טובות של יצור זרע על ידי רקמת האשך המושתלת, בין אם הושתלה באשך ובין אם הושתלה במקומות אחרים כגון תחת העור [7, 8]. עם זאת, החשש המרכזי בהשתלת רקמה מחולים אונקולוגיים הוא השתלת תאים בעלי פוטנציאל ממאירות. לפיכך, בעוד ששיטה זו עשויה להתאים בחולים שבהם הטיפול הגונדוטוקסי ניתן בשל מחלה שאינה ממארת, הרי שבחולים המקבלים טיפול גונדוטוקסי בשל ממאירות, בטיחות ההשתלה עדיין מעוררת חשש ומחייבת מחקר נוסף [9].

הדרך הבטוחה יותר, לפחות בנוגע לילדים המטופלים בשל מחלה ממארת, היא למצוא שיטה להבשלת תאי הנבט בתנאי מעבדה. להשגת מטרה זו, יש להתגבר על מספר מכשולים: הראשון הוא בחירה נכונה של שיטת הקפאת הרקמה, השני נובע ממינוס תאי הנבט ברקמת האשך של הילד ביחס לתאים הסומטיים

פיסת רקמה אחת בגודל 2–1 מ"מ³ הועברה למעבדת המחקר. פיסת הרקמה עברה טיפול באנזימים (קוליגנאזה, היאלורונדאזה ודיאנאזה) למשך 25 דקות באמבט מים מטלטל. התאים נשטפו, הורחפו במצע RPMI ונספרו. התאים (2.5×10^5) גודלו במצע תלת-מימד בנפח של 0.5 מ"ל שהכיל גורמי (פקטורי) גדילה שונים ובכללם:

- Human recombinant epidermal growth factor (20ng/ml)
- Human recombinant glial cell-derived neurotrophic growth factor (10ng/ml)
- Human recombinant leukemia inhibitory factor (10ng/ml)
- Human recombinant basic fibroblast growth factor (10ng/ml)

התאים הודגרו באינקובטור 5% CO₂ ובטמפרטורה של 37 מ"צ למשך תקופה של עד יותר מחודשיים. התאים/צברי תאים שגדלו/התפתחו, הוצאו ונבדקו להופעת ביטוי סמנים של תאי נבט בשלבי התמיינות שונים (CD-9) לתאים פרימיטיביים BOULE לתאים מיוטים) באמצעות נוגדנים סגוליים, כולל Polyclonal rabbit anti-human boll^{sc-9148} anti-human CD-9 (sc-67371). בהתאמה, על ידי צביעה אימונופלווארסצנטית או פריימרים ייחודיים:

- H-CD9-Fw: CCTACAACAAGCTGAAAACCA; H-CD9-Rv: GGATAGCACAGCAAGATCA
- H-BOLL-Fw: CCATTATCAGCAACCTGCAT; H-BOLL-RV: GTGCAATTTCCACTGGTTGAT

להערכת רמת ביטוי של רנ"א ייחודי לאותם סמנים באנליזת quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

תוצאות

תוצאות צביעה אימונופלווארסצנטית ו/או בדיקת רמת הביטוי של רנ"א לתאים מרקמת אשך לפני זריעה, העלו קיום תאים שנצבעו לסמנים ו/או ביטאו רנ"א של תאים סב-מיוטיים (VASA), (GFRα-1). לראשונה, הצלחנו לגדל תאי רקמת אשך למשך תקופה של עד יותר מחודשיים. בתרבית נצפו תאים בודדים או בצברים בגדלים שונים.

התאים ו/או הצברים שגדלו בתרבית הגידול נאספו ונבדקו לאפיון שלבי התפתחות תהליך הספרמטוגנזה על ידי צביעה אימונופלווארסצנטית עם נוגדנים ייחודיים ו/או פריימרים ייחודיים, לבדיקת רמת ביטוי רנ"א ייחודי, לשלבי הספרמטוגנזה. המימצאים העלו, שחלק מהתאים נצבעו ו/או ביטאו סמנים ייחודיים לשלב הסב-מיוטי (CD-9), ובנוסף לכך תאים אחרים ביטאו סמנים ייחודיים לשלב המיוטי (Boule).

מסקנות

היום מומלץ במדינות שונות בעולם לדון עם כל מטופל/הורי מטופל של ילדים טרם גיל ההתבגרות, העומד לפני טיפול גונדוטוקסי תוקפני (אגרסיבי) על אפשרות הקפאת רקמת אשך לצורך שימור פוריות.

תוצאות חיוביות של גידול תאי נבט של תאי זרע בתרבית וסימנים לחלוקות מיוטיות הודגמו בילדים טרם גיל ההתבגרות, למרות שעברו כימותרפיה. נדרש המשך המחקר, על מנת להגיע להבשלת זרע מלאה בתנאי מעבדה, תוך בחינת תקינות תאים אלו מבחינה גנטית ואפיגנטית, טרם הזרקתם לביצית לצורך הפריה ויצירת עוברים.

הסובבים אותם [10]. מסיבה זו, נדרש להגדיל את מספר תאי הנבט על ידי זריעה בתרבית מתאימה [11, 12]. יתרה מכך, בשל היעדר סמנים ייחודיים לתאי ב-SSC, קיים קושי משמעותי בזיהוי תאים אלו והפרדתם. האתגר המורכב מכולם הוא יצירת הסביבה המתאימה וזיהוי הגורמים הייחודיים הגורמים חלוקה והתמיינות של תאי הנבט בשלבים השונים של תהליך יצירת הזרע הבוגר (ספרמטוגנזה) [12]. מגבלה נוספת היא הצורך לבחון את תא הזרע שנוצר מבחינת תקינות החומר הגנטי והאפיגנטי, בהוכחת יכולת ההפריה של התא וביצירת ולדות בריאים [7, 10].

בעבודות קודמות שנערכו בבעלי חיים, דיווחו Abu Elhija וחב' [12] על ההתקדמות הניכרת ביצירת מצע התרבית המתאים לגידול תאי הנבט מרקמת אשך של עכברים שאינם בוגרים מינית, באמצעות תרבית תלת ממדית (Soft agar culture system). בעבודה בעכברים, הוכח כי מצע תרבית זה מהווה סביבה מתאימה שבה נצפו מושבות של תאי נבט שנוצרו בתרבית. יתרה מזאת, בתאים אלו נצפו התמיינות והבשלה עד יצירת תאי זרע תקינים מורפולוגית המכילים שלפוחית אקרזום, שהגיבה לשפעול תגובת האקרזום בתאים אלו [12]. במאמר זה אנו מדווחים על תוצאות ראשוניות של חלוקה בתרבית תאי נבט אנושיים, שנלקחו מילדים שטופלו בכימותרפיה ועמדו לפני טיפול בכימותרפיה תוקפנית (אגרסיבית).

שיטות מחקר

שלושה ילדים בגילים 6, 7, 12 שנים, שטופלו בכימותרפיה בשל מחלה ממארת (מדולבלסטומה, ליקמיה ולימפומה, בהתאמה), הופנו למרכז הרפואי האוניברסיטאי סורוקה. הילדים והוריהם קיבלו הסבר מפורט באשר לשלב שבו נמצא המחקר בעניין שימור פוריות מרקמת אשך, וכן בנוגע לסיכונים אפשריים של הפעולה. הוסבר להם שלא ניתן להתחייב בשלב זה על ייצור תאי זרע בשלים לאחר קבלת הכימותרפיה. ההורים חתמו על טופס הסכמה מדעת וילדים מעל גיל עשר שנים התקבלה גם הסכמה בעל פה של הילד לביופסיה שבוצעה מאשך אחד בלבד. ועדת הלסינקי של משרד הבריאות אישרה את ביצוע המחקר. הביופסיות בוצעו על ידי כירורגים ילדים מיומנים בביצוע ביופסיות אלו במסגרת הרדמה כללית. כל הילדים שוחררו באותו יום ולמחרת ללא כל סיבוכים ועברו בהמשך השתלות לשד עצם.

גודל הדגימות שנלקחו בביופסיה היה 10–7X9–2X1 מ"מ. הרקמה הועברה להקפאה לצורך שימור פוריות ביחידה להפריה חוץ גופית על פי פרוטוקול שנבדק והומלץ על ידי Whyens וחב' [13]. הביופסיה הוכנסה מיידית בחדר הניתוח למבחנות פלקון שהכילו Hanks Balanced Saline Solution (HBSS) 4" מ"צ. פיסות מהביופסיה הוקפאו תוך 10 דקות. הביופסיה נחתכה לפיסות של 2–4 מ"מ, חתיכות הרקמה הוכנסו למבחנות הקפאה (Nunc) שהכילו 1 מ"ל תמיסת הקפאה שהרכבה כך: dimethylsulfoxide (DMSO) 0.7 מול/ל' עם 0.1 מול/ל', וסוכרז ו-Human serum albumin (HSA) 10 מ"מ/מ"ל.

הסתייענו במכשיר הקפאה מדורג של חברת Planner. תכנית ההקפאה הייתה כדלקמן: השהייה למשך 9 דקות ב-0 מ"צ, קצב קירור של חצי מעלה לדקה עד למינוס 8 מעלות. בטמפרטורה זו הוחזקו האמפולות למשך חמש דקות עד ביצוע תהליך זריעת הקיפאון (Seeding). לאחר 15 דקות נוספות של שהייה בטמפרטורה זו, קצב הקירור עד למינוס 40 מעלות נשמר על חצי מעלה לדקה. לאחר מכן הושהו הדוגמאות למשך עשר דקות בטמפרטורה זו. בהמשך, נקבע קצב קירור של 7 מעלות לדקה עד למינוס 80 מעלות. בשלב הבא הועברו המבחנות לחנקן נוזלי.

במחקר זה, הצגנו תוצאות ראשוניות של חלוקת התאים ויצירת מושבות בתנאי מעבדה, וכן סימנים ראשוניים לחלוקות של התאים בילדים שנחשפו לכימותרפיה טרם לקיחת הביופסיה – תוצאות שלא הוצגו עד כה בבני אדם. הנחת היסוד בבסיס האפשרות להבשלת תאי זרע בתנאי מעבדה היא, כי הטיפול הגונדוטוקסי אינו פוגע בכל הספרמטוגוניות (חלק מתאי הספרמטוגוניה שורדים), אך קיימת פגיעה בתאים הסובבים אותם. לפיכך מתן סביבה מתאימה במעבדה עשוי לגרום להתרבות תאי הספרמטוגוניה ואולי אף להבשלתם.

על פי הסמנים שאנו יודעים לבחון כיום, נראה שברקמת האשך אכן נותרו תאי ספרמטוגוניה. יש צורך במחקרים נוספים על מנת לפתח שיטות לגידול תאי נבט של תאי זרע לתאי זרע בשלים, בחינה גנטית ואפיגנטית של תאי זרע אלו לפני הזרקתם לביצית לצורך הפריה ויצירת עוברים.

תודות: למחלקות ההמטואונקולוגיות ילדים בסורוקה, שניידר ורמב"ם על הפניית הילדים; למחלקה לכירורגית ילדים במרכז הרפואי סורוקה על ביצוע הניתוחים לניטול דגימות רקמת האשך לשימור פוריות ולמחקר.

מחבר מכותב: מחמוד חליח

המחלקה למיקרוביולוגיה, אימונולוגיה וגנטיקה, על שם שרגא סגל, המרכז לחקר מתקדם וחינוך ברבייה, הפקולטה למדעי הבריאות, אוניברסיטת בן גוריון בנגב
טלפון: 08-6479959, דוא"ל: Huleihel@bgu.ac.il

סיכום ודיון

שימור פוריות בחולים לפני ניתוח, קרינה או כימותרפיה העלול לפגוע בפוריות המטופל, הפך חלק הכרחי מהטיפול המחייב לכל הפחות דיון עם המטופל והצעה להיפגש עם מומחה העוסק בתחום שימור הפוריות [14, 15]. בעוד שבזכרים בוגרים אפשרות שימור הפוריות פשוטה יחסית, על ידי הקפאת זרע, הרי שבילדים טרם הבגרות שימור הפוריות הוא אתגר הנמצא עדיין בתחום המחקר. תוצאות ראשוניות של מחקר בבעלי חיים מדגימות אפשרות להתמיינות תאי הנבט בתנאי מעבדה, עד כדי ייצור זרע בוגר בעתיד. לנוכח תוצאות אלו, ולמרות שהשיטה עדיין ניסיונית, יש מקום לשקול להקפיא רקמת אשך לפני הטיפול בכל ילד טרם גיל הבגרות המיועד לעבור טיפול שעלול לפגוע בצורה משמעותית ביכולת האשך לייצר זרע [16].

למרות תוצאות מעודדות בהשתלה אוטולוגית של הרקמה בבעלי חיים, שהוכחו אפשרות לייצור והבשלת תאי זרע, החשש מהחזרת תאי גידול גבוה ואין עדיין שיטה שתבטיח את בטיחות ההשתלה. המצב דומה לשימור פוריות בילדות שבה נכרתת רקמת שחלה לצורך הבשלה בעתיד [15]. שיטה זו ניתנת לביצוע כאשר הטיפול הגונדוטוקסי אינו ניתן לביצוע בשל מחלה ממאירה, אלא בשל מחלות המטולוגיות, ואף לתסמונת קליינפלטר המאובחנות בגיל הילדות. שיטת הגידול של תאי הנבט בתנאי מעבדה שאנו מפתחים, מנטרלת את החשש לבטיחות המטופל.

ביבליוגרפיה

- Osterberg EC, Ramasamy R, Masson P & Brannigan RE, Current practices in fertility preservation in male cancer patients. *Urol Ann*, 2014.
- Hewitt M, Rowland JH & Yancik R, Cancer survivors in the United States: age, health, and disability. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2003;58:82-91.
- Green DM, Kawashima T, Stovall M & al, Fertility of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol*, 2010;28:332-9.
- Ginsberg JP, Li Y, Carlson CA & al, Testicular tissue cryopreservation in prepubertal male children: An analysis of parental decision-making. *Pediatr Blood Cancer*, 2014.
- Brook PF, Radford JA, Shalet SM & al, Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril*, 2001;75:269-74.
- Katz DJ, Kolon TF, Feldman DR & al, Fertility preservation strategies for male patients with cancer. *Nat Rev Urol*, 2013;10:463-72.
- Valli H, Phillips BT, Shetty G & al, Germline stem cells: toward the regeneration of spermatogenesis. *Fertil Steril*, 2014;101:3-13.
- Gossens E, Van aen D & Tournaye H, Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic. *Hum Reprod*, 2013;28:897-907.
- Goossens E & Tournaye H, Male fertility preservation, where are we in 2014? *Ann Endocrinol (Paris)*, 2014;75:115-7.
- Struijk R, Mulder CL, Van Der Veen F & al, Restoring fertility in sterile childhood cancer survivors by autotransplanting spermatogonial stem cells: are we there yet? *Biomed Res Int*, 2013;2013:903142.
- Stukenborg JB, Schlatt S, Simoni S & al, New horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Mol Hum Reprod* 2009;15:521-9.
- Abu Elhija M, Lunenfeld E & al, Differentiation of murine male germ cells to spermatozoa in a soft agar culture system. *Asian J Androl*, 2012;14:285-93.
- Wyns C, Curaba M, Petit S & al, Management of fertility preservation in prepubertal patients: 5 years' experience at the Catholic University of Louvain. *Hum Reprod* 2011;26:737-47.
- Lee SJ, Schover LR, Partridge AH & al, American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24:2917-31.
- Rodriguez-Wallberg KA & Oktay K, Fertility preservation during cancer treatment: clinical guidelines. *Cancer Manag Res*, 2014.
- Fernbach A, Lockart B, Armus CL & al, Evidence-Based Recommendations for Fertility Preservation Options for Inclusion in Treatment Protocols for Pediatric and Adolescent Patients Diagnosed With Cancer. *J Pediatr Oncol Nurs*, 2014.