

# Möglichkeiten der Kryokonservierung zur Erhaltung der weiblichen Fertilität

Frank Nawroth<sup>1</sup>  
Markus S. Kupka<sup>2</sup>  
Eugenia Isachenko<sup>1</sup>  
Gohar Rahimi<sup>1</sup>  
Peter Mallmann<sup>1</sup>

## Zusammenfassung

Optimierte diagnostische und therapeutische Konzepte haben das Langzeitüberleben nach onkologischen Erkrankungen verbessert, Operationen, Chemo- und Strahlentherapien können andererseits potenzielle Auswirkungen auf die spätere Fertilität von pubertären Patientinnen und Frauen im reproduktiven Alter aufweisen. Neben der etablierten Kryokonservierung unfertilisierter oder fertilisierter Zellen liegt das Hauptaugenmerk seit einiger Zeit auf der Kryokonservierung von Ovarialgewebe sowie seiner späteren optimalen Nutzung. Alternativen sind die In-vitro-Maturation des Gewebes oder die Reifung in Auto- oder Xenotransplantaten. Die Autotransplantation hat in ersten klinischen Anwendungen zu einer passageren Hormonsynthese geführt. Verbesserungen der Einfrierprotokolle sowie eine Minimierung der Ischämie lassen weitere Fortschritte erwarten. Solange noch keine größtmögliche Sicherheit hinsichtlich der Tumorreimplantation gewährleistet ist, sollte die Autotransplantation Studien vorbehalten sein. In dieser Hinsicht stellt die Xenotransplantation in Versuchstiere eine Al-

ternative dar, deren klinische Bedeutung momentan aber noch begrenzt ist. Durch die Vitrifikation, also das direkte Eintauchen der Proben in flüssigen Stickstoff als Alternative zur konventionellen langsamen Kryokonservierung könnte auch der zeitliche und apparative Laboraufwand erheblich eingeschränkt werden. Die kritische Beratung über die beschriebenen fertilitätserhaltenden Möglichkeiten stellen beim oft kleinen Zeitfenster sowie der erforderlichen Logistik eine interdisziplinäre Aufgabe und Herausforderung dar.

**Schlüsselwörter:** Fertilität, Kryokonservierung, Prävention, Vitrifikation

## Summary

### Possibilities of Cryopreservation to Preserve Female Fertility

Optimal diagnostic and therapeutic concepts have improved the long-term survival rate after oncological diseases. On the other hand, surgery, chemotherapy and radiotherapy can have a potential effect on the later fertility of

adolescent young women and women in a reproductive age. Alongside the established cryoconservation of unfertilized or fertilized cells, the cryoconservation of ovarian tissue and the later optimal use has been the main area of attention. Alternatives are in the in-vitro maturation of tissue or the maturation of auto- or xenotransplants. The first clinical application of autotransplantation led only to a temporary hormone synthesis as well. Improvements in the freezing protocols as well as the mimimalization of ischemia will hopefully lead to further progress. As long as there is no absolute safety guaranteed in regard to reimplantation of tumour cells, autotransplantation should be restricted to studies. Xenotransplantation, until now only performed in laboratory animals could be an alternative, but its clinical importance is still limited. The critical discussions about the described possibilities to preserve fertility, its planning and realization, is a demanding logistical and interdisciplinary challenge.

**Key words:** fertility, cryopreservation, prevention, vitrification

Effektivere Diagnostik und Therapie vieler onkologischer Erkrankungen im präpubertären und reproduktiven Alter der Frau haben in den letzten Jahrzehnten zu einem verbesserten Langzeitüberleben geführt. Das 5-Jahres-Überleben von Kindern mit malignen Tumoren stieg von 27 Prozent im Jahre 1960 auf 70 Prozent im Jahre 1999 (9). Man schätzt, dass im Jahre 2010 etwa jeder 250. Erwachsene eine maligne Erkrankung im Kindesalter überlebt haben wird (2).

Daraus ergibt sich die Dringlichkeit der Prävention der durch geplante Operationen und/oder Chemo- und Strahlentherapien eventuell irreversibel eingeschränkten späteren Fertilität.

Trotz der individuell unterschiedlichen Langzeitwirkung von Zytostatika auf das Germinalgewebe wurde berichtet, dass zum Beispiel Cyclophosphamid bei der Therapie der Lupusnephritis in 100 Prozent der Patientinnen, die

älter sind als 30 Jahre, bei mehr als 50 Prozent der Patientinnen zwischen 20 und 30 Jahren sowie in 13 Prozent der Patientinnen, die jünger sind als 20 Jahre zu einem Climacterium praecox führte (3). Auch Patientinnen, die nach einer Chemotherapie normogonadotrop waren, zeigten unter Gonadotropinstimulationen eine signifikant schlechtere ovarielle Reaktion (8). Die medikamentöse temporäre Niederregulation der Ovarien durch Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga (GnRHa) im Sinne einer Chemoprotektion vermag die Sensitivität des Gewebes zwar zu minimieren, verhindert das Climacterium praecox aber nicht in allen Fällen.

<sup>1</sup>Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe (Direktor: Prof. Dr. med. Peter Mallmann), Klinikum der Universität zu Köln

<sup>2</sup>Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe (Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friesen), Klinikum der Universität München-Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Untersuchungen zur Strahlensensitivität humaner Oozyten wiesen nach, dass die Dosis zur Zerstörung der Hälfte aller Oozyten bei < 2 Gy liegt (39). Auch die operative Transposition der Ovarien zur Verlagerung aus dem Bestrahlungsfeld kann durch Streustrahlungen negative Einflüsse nicht ausschließen.

Verschiedene präventive Konzepte unter Einbeziehung der Kryokonservierung eröffnen heute Möglichkeiten des Fertilitätserhaltes sowohl bei präpubertären als auch bei Patientinnen im reproduktiven Alter.

## Methoden der Kryokonservierung

Bei der konventionellen langsamen Kryokonservierung ist der wichtigste biophysikalische Faktor der Zellschädigung während des Einfrierens die intra-

zelluläre Kristallisation. Um diese zu verhindern, muss zuvor das intrazelluläre Wasser entzogen werden. Die Dehydrierung lässt sich durch Kryoprotektiva in der Einfrierlösung sowie die Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit beeinflussen. Wenn die Abkühlung langsam genug abläuft, verlässt das Wasser die Zelle schnell genug, um eine Konzentration der intrazellulären Lösungen zu erreichen und damit ein „supercooling“ zu verhindern. Die Zellen dehydrieren, und die intrazelluläre Eisbildung wird verhindert. Erfolgt die Abkühlung zu langsam, schrumpfen die Zellen stark und sind den erhöhten intrazellulären Konzentrationen vor dem Erreichen der eutektischen Temperatur lange ausgesetzt. Beide Phänomene können eine Zellschädigung verursachen.

Das so genannte „slow-cooling“, auch als „equilibrium-freezing“ bezeichnet, beinhaltet die Äquilibration der Zellen in relativ niedrigen Kryoprotektiva-Konzentrationen (~1,5 M) sowie die Dehydrierung während des Einfrierens (0,3 bis 2° C/min). Diese Methode wurde 1972 zur Kryokonservierung von Mäuseembryonen erstmals erfolgreich angewendet (40). Erst 1977 allerdings berichtete Whittingham (42) über die erste Geburt nach Kryokonservierung von Mäuseoozyten in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Die Vitrifikation stellt eine Alternative zum konventionellen Einfrieren dar, beruht auf dem direkten Kontakt zwischen Kryoprotektiva und flüssigem Stickstoff (-196 °C) und erfordert keine Äquilibration. Das direkte Eintauchen der Proben in den flüssigen Stickstoff und die Verwendung kleiner Volumina führen zu hohen Einfriergeschwindigkeiten (15 000 bis 30 000 °C/min), welche eine Kristallisation verhindern und anstelle dessen einen glasförmigen (vitriösen) Zustand verursachen (21). Der Vorteil der Methodik gegenüber dem programmierten langsamen Einfrieren besteht — neben der erheblichen Zeit — vor allem in der Kostenersparnis, da keine programmierbaren Einfriergeräte erforderlich sind. Um den Zellen/Geweben in kürzester Zeit so viel Wasser als möglich zu entziehen (keine vollständige Äquilibration), sind allerdings erheblich höhere Konzentration der Kryopro-

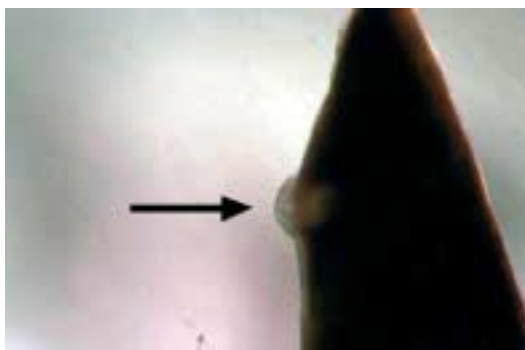


Abbildung 1: Natives humanes Ovarialgewebe mit erkennbarem Follikel (siehe Pfeil)

tektiva (bis zu 7 bis 8 M) notwendig. Daraus ergibt sich ein größeres Risiko toxischer Schädigungen der zu vitrifizierenden Proben. Aus diesen Besonderheiten resultieren einerseits eine praktische Grenze der erreichbaren Einfriergeschwindigkeit und andererseits eine biologische Grenze der von den Zellen/Geweben tolerierten Konzentration der Kryoprotektiva. Trotz der beschriebenen Probleme ist die Vitrifikation insbesondere für Zellen bereits heute eine effektive Alternative zur deutlich aufwendigeren langsamen Kryokonservierung (18, 20), führte aber auch bei Ovarialgewebe zu ersten Erfolg versprechenden Ergebnissen (11, 12).

### Präventive Möglichkeiten mit der Kryokonservierung

Die etablierteste Methode zur Verwirklichung des späteren Kinderwunsches stellt die kontrollierte ovarielle Stimulation und anschließende meist transvaginal durchgeführte Follikelpunktion zur Eizellgewinnung dar. Die Oozyten können unmittelbar danach unfertilisiert oder bei vorhandenem Partner am darauffolgenden Tag im so genannten Vorkernstadium fertilisiert kryokonserviert werden. Der Nachteil der ovariellen Stimulation liegt darin, dass sie bei präpubertären Patientinnen nicht möglich ist, je nach gewähltem Stimulationsprotokoll mindestens etwa 14 Tage Zeit erfordert (damit eventuell Verzögerung geplanter onkologischer Therapien) und potenzielle Einflüsse auf vorliegende hormonabhängige Tumoren unklar sind. Die Lagerzeit spielt nach heutigem Kenntnisstand wahrscheinlich eine un-

tergeordnete Rolle (34, 41). Seit dem ersten Bericht einer deutschen Arbeitsgruppe über eine Geburt nach Kryokonservierung unfertilisierter Oozyten 1987 (38) war diese Therapie wegen der niedrigen Überlebensraten der Zellen bis vor kurzem umstritten (28). Angesichts verbesserter Überlebensraten sowohl der langsamen Kryokonservierung mit 54,1 bis 74,4 Prozent (4,29) als auch der Vitrifikation mit 68,6 bis 96,0 Prozent

(6,43) stellt die Lagerung unbefruchteter Zellen heute eine realistische und effektive Alternative dar. Es ist umstritten, ob die Oozyten nach dem Auftauen durch eine konventionelle In-vitro-Fertilisation (IVF) oder besser durch eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) befruchtet werden sollten. Da bekannt ist, dass die Kryokonservierung zu einem „hardening“ der Zona pellucida mit nachfolgend sinkender Fertilisierungsrate sowie zu Defekten der Zona mit resultierender Polyspermie führen kann, wäre die ICSI-Methode eine Option zur Umgehung dieser Probleme (7). Obwohl über bessere Fertilisierungsraten nach ICSI im Vergleich zur IVF publiziert wurde (14), herrscht zu diesem Thema noch kein Konsens.

Eine weitere Option ist die Kryokonservierung fertilisierter Oozyten im Vorkernstadium, welches diese etwa 16 bis 20 Stunden nach der Insemination erreichen. Die Überlebensraten nach konventioneller Kryokonservierung liegen zwischen etwa 70 bis 80 Prozent (1,10).

Über die Vitrifikation humaner Vorkernzellen existieren weniger Erfahrungen. Erste Untersuchungen berichteten über vergleichbare Überlebensraten von 66,6 Prozent (35).

Aufgrund des signifikanten Follikelverlustes während des Einfrierens und Auftausens wird während der meist laparoskopisch möglichen Gewinnung von humanem Ovarialgewebe (Ovarektomie oder multiple Ovarialbiopsie) (23) von manchen Autoren die unilaterale Ovarektomie favorisiert (16). Die optimale Verwendung von kryokonserviertem oder vitrifiziertem Ovarialgewebe ist momentan noch unklar. Die insbesondere zur konventionellen

Kryokonservierung vorliegenden Untersuchungen rechtfertigen nach kritischer Aufklärung der Patientinnen aber bereits heute die prophylaktischen Kryokonservierung von Ovarialgewebe vor einer Operation, Chemo- und Strahlentherapie (24). Für die Nutzung des Gewebes im Zusammenhang mit einer Kryokonservierung gibt es drei Möglichkeiten:

- die In-vitro-Maturation (IVM),
- die Autotransplantation,
- die Xenotransplantation.

## Mögliche Verwendung von Ovarialgewebe

Die In-vitro-Kultivierung von humanem Ovarialgewebe bis zur Reifung Graafscher Follikel und Gewinnung reifer Eizellen erfordert mindestens sechs Monate und ist mit den vorhandenen Kultursystemen noch nicht möglich.

Häufig finden sich jedoch bereits im biopsierten Ovarialgewebe immature Oozyten (*Abbildung 1*), die sich in vitro bis zur Metaphase II reifen, nachfolgend zum Beispiel durch ICSI fertilisieren und kryokonservieren lassen (33). Prämatüre Oozyten können insbesondere bei Patientinnen mit einem polyzystischen Ovarsyndrom auch durch eine transvaginale Punktion der kleinen Follikel ohne vorherige ovarielle Stimulation gewonnen werden (37).

Wünschenswert wäre eine mögliche orthotope Autotransplantation nach der Lagerung des Gewebes, um eine Spontankonzeption zu ermöglichen. Die heterotope Autotransplantation des Gewebes (zum Beispiel subkutan) nach dem Auftauen würde bei vorhandenem Kinderwunsch eine In-vitro-Fertilisation erfordern. In publizierten Studien kam es sowohl nach orthotoper (26, 30) als auch nach heterotoper Autotransplantation (subkutan am Arm) (5, 27) spontan beziehungsweise nach Stimulation zwar zum Hormonanstieg, jedoch nach einem bestimmten zeitlichen Intervall wieder zum Estradiolabfall und Gonadotropinanstieg. Der ischämisch bedingte Follikelverlust nach der Transplantation stellt dabei möglicherweise eines der Hauptprobleme dar (25).

Gerade bei hämatogenen und systemischen Neoplasien vermutet man ein

erhöhtes Risiko der Retransplantation von Tumorzellen auf den Rezipienten. Hinweise dafür zeigten sich bei Lymphomen im Mausmodell (36), konnten für Lymphome beim Menschen bisher aber nicht betätigt werden (15, 22). Trotzdem lässt sich ein gewisses Risiko der Tumorzellübertragung nicht ausschließen, so dass es erforderlich ist, Screeningmethoden für die Detektion solcher Tumorreste im Ovarialgewebe vor der Autotransplantation zu entwickeln. Mithilfe verschiedener molekulargenetischer Techniken gibt es hierfür erste interessante Ansätze (19, 31).

Ziel der Xenotransplantation in immundefiziente Versuchstiere wäre die Reifung Graafscher Follikel, anschließende Follikelpunktion und In-vitro-Fertilisation. Die Methode könnte das mögliche Retransplantationsrisiko eventuell im Ovarialgewebe vorhandener Tumorzellen umgehen und wäre eine Opti-



Abbildung 2: Humanes Ovarialgewebe (siehe Pfeil) nach zwölfwöchiger subkutaner Transplantation in eine ovariectomierte SCID- (severe combined immunodeficiency-)Maus

on zum Beispiel für Patientinnen mit Kontraindikationen für eine Hormontherapie wie bei einem hormonabhängigen Tumor. Unklar ist momentan die hinsichtlich Revaskularisation optimale Transplantationsstelle. Möglicherweise besitzt dabei die intramuskuläre Transplantation Vorteile gegenüber der in Studien bisher meist angewendeten subkutanen Lokalisation (13).

Bisher konnte man zeigen, dass sich in konventionell eingefrorenem und anschließend subkutan bei immundefizienten Mäusen transplantiertem humanem

Ovarialgewebe antrale Follikel entwickeln (3 bis 5 mm), aus denen sich Oozyten aspirieren lassen (32) beziehungsweise Corpora lutea bilden (17).

Nach subkutaner Xenotransplantation von vitrifiziertem humanem Ovarialgewebe in SCID-Mäuse (*Abbildung 2*) über drei bis vier Monate fanden sich bisher histologisch keine Unterschiede zu konventionell eingefrorenem/transplantiertem Gewebe (eigene unpublizierte Ergebnisse).

## Fazit

Neben der Chemoprotektion mit GnRHa vor geplanten Zytostatikatherapien sowie der Transposition der Ovarien vor einer Strahlentherapie bestehen heute durch die Kryokonservierung von Zellen und/oder Ovarialgewebe weitere Möglichkeiten zur Erhaltung

der weiblichen Fertilität bei onkologischen Patientinnen. Einerseits ist bei präpubertären Patientinnen die Sensitivität der Germinalzellen geringer, andererseits bestehen aber auch eingeschränkte präventive Optionen, da eine ovarielle Stimulation und Oozytengewinnung noch nicht möglich ist. Abhängig vom Alter, der Grunderkrankung sowie dem zeitlichen Intervall bis zu einer geplanten Operation beziehungsweise adjuvanten Therapie sollten mit der Patientin die verschiedenen Wege kritisch besprochen werden. Am etabliertesten

ist die ovarielle Stimulation und Follikelpunktion, welche allerdings eine gewisse zeitliche Verzögerung bis zur Therapie der onkologischen Erkrankung bedeutet. Mittlerweile sind auch die Überlebensraten unfertilisiert kryokonservierter Oozyten denen von Vorkernzellen vergleichbar, sodass das Vorhandensein eines Partners keine Grundbedingung mehr darstellt.

Neue Perspektiven eröffnet schon heute die Kryokonservierung von Ovarialgewebe, auch wenn noch Unklarheit über seine spätere optimale Verwendung besteht. Die Gewinnung prämaturer Zellen bei der Dissektion des Gewebes ermöglicht einerseits die In-vitro-Maturation dieser Zellen und ihre unbefruchtete/befruchtete Kryokonservierung sowie andererseits die Kryokonservierung des Ovarialgewebes selber.

Die Autotransplantation hat in ersten klinischen Anwendungen lediglich zu einer passageren Hormonsynthese geführt. Verbesserungen der Einfrierprotokolle sowie eine Minimierung der Ischämie lassen jedoch weitere Fortschritte erwarten. Solange noch keine größtmögliche Sicherheit hinsichtlich der Tumorimplantation gewährleistet ist, sollte die Autotransplantation Studien vorbehalten sein. Eine Alternative wäre die Xenotransplantation in Versuchstiere, deren klinische Bedeutung momentan aber noch begrenzt ist. Durch die Vitrifikation als Alternative zur konventionellen Kryokonservierung könnte auch der zeitliche und apparative Laboraufwand erheblich eingeschränkt werden.

Die kritische Beratung über die beschriebenen fertilitätserhaltenden Mög-

lichkeiten sowie ihre zeitnahe Planung und Realisierung stellen bei der Vielzahl von Patientinnen in unterschiedlichen Fachgebieten, dem oft kleinen Zeitfenster sowie der erforderlichen Logistik eine interdisziplinäre Aufgabe und Herausforderung dar.

Manuskript eingereicht: 21. 7. 2003, angenommen: 25. 9. 2003

Zitierweise dieses Beitrags:  
Dtsch Arztebl 2004; 101: A 268–272 [Heft 5]

Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf das Literaturverzeichnis, das beim Verfasser erhältlich oder im Internet unter [www.aerzteblatt.de/lit0504](http://www.aerzteblatt.de/lit0504) abrufbar ist.

Anschrift für die Verfasser:  
**Priv.-Doz. Dr. med. Frank Nawroth**  
Universitäts-Frauenklinik Köln  
Kerpener Straße 34, 50931 Köln  
E-Mail: [Frank.Nawroth@medizin.uni-koeln.de](mailto:Frank.Nawroth@medizin.uni-koeln.de)

## Kongressbericht

Christian Ell  
Hans-Jürgen Brambs  
Wolfgang Fischbach  
Wolfgang Fleig  
Michael Gebel  
Volker Groß  
Peter Layer  
Manfred Stolte  
Hubert Zirngibl

# Minimalinvasive Technik und innovative Medikamente auf dem Vormarsch in der Gastroenterologie

Gastro-Update 2003

Die laparoskopische Resektion des Kolonkarzinoms zeigt im Vergleich zur offenen Dickdarmresektion bessere Akut- und Langzeitergebnisse. Diese und 1 500 weitere Originalarbeiten aus dem Jahr 2002 aus allen Bereichen der gesamten Gastroenterologie einschließlich Bildgebung, Pathologie und Onkologie wurden im März 2003 auf dem 11. Gastro-Update in Wiesbaden mehr als 1000 Gastroenterologen vorgestellt und gemeinsam diskutiert.

● **Refluxkrankheit:** Berichte über eine familiäre Häufung der gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD) sind bekannt. Diese Untersuchungen ließen unberücksichtigt, ob die beobachtete Assoziation auf Gemeinsamkeiten in Ernährungsgewohnheiten und Lebensstil oder auf einer genetischen Prädisposition beruht. Eine große epidemiologische Erhebung in Schweden, basierend auf dem nationalen Zwillingsregister, hat nunmehr klare Belege

für die ätiopathogenetische Bedeutung erbracht.

Mehrere Untersuchungen fokussierten auf die extraösophagealen Manifestationen der Refluxkrankheit. Sie belegen eindeutig, dass diese weitaus häufiger sind als früher angenommen wurde. Sie umfassen dabei ein breites Spektrum: Sinusitis, Pharyngitis, Laryngitis, Pharynx- und Larynxkarzinom, chronische Bronchitis, Asthma, chronische Heiserkeit und Husten, Schlaf- Ap-