

# Eine Kryobank für humanes Ovarialgewebe: Konzept und Perspektiven

V. Isachenko<sup>1</sup>, E. Isachenko<sup>1</sup>, R. Kreienberg<sup>1</sup>, J.M. Weiss<sup>1</sup>

**Das Konzept des Kryobankings von Eierstockgewebe basiert auf zwei Postulaten: Zum einen kann eingefrorenes Eierstockgewebe nach dem Auftauen nicht nur zur potenziellen Realisierung eines späteren Kinderwunsches verwendet werden, sondern auch zur Wiederherstellung der ovariellen Funktion (nur therapeutische, kinderwunschunabhängige Behandlung). Zum anderen lassen sich zusätzlich zum Ovarialgewebe unreife Zellen (Germinalvesikel-Zellen) sowie adulte Stammzellen der Ovaroberfläche gewinnen und kryokonservieren. Das wichtige Ziel einer Kryobank von humanem Ovarialgewebe – die Erhaltung der Fertilität nach einer onkologischen Behandlung – wird im Folgenden ausführlich diskutiert.**

Ovarialgewebe stellt das neueste Objekt einer humanen Kryobank dar. Aufgrund der steigenden Effektivität onkologischer Therapien (1) fragen Patientinnen in zunehmendem Umfang auch nach dieser Möglichkeit zur Restitution ihrer Fertilität nach der chemo- oder radiotherapeutischen Behandlung. Diese Option stellt aktuell einen bedeutenden Forschungsschwerpunkt dar. Das Ovarialgewebe kann nach dem Auftauen retransplantiert werden und Ausgangspunkt einer regelrechten Follikelreifung mit Ovulation maturer Oozyten mit oder ohne Gonadotropinstimulation sein (2). Sowohl bei Tieren als auch beim Menschen sind Geburten nach Replantation publiziert worden (3–6).

## Das Konzept einer Ovarialgewebekbank

Kryokonserviertes Ovarialgewebe kann für folgende Ziele genutzt werden:

- Sollte infolge einer onkologischen Therapie ein Premature Ovarian Failure (POF) entstehen, kann die Re-Transplantation von Ovarialkortex die

ovarielle Funktion erneuern (3, 7, 8). Dies ist unabhängig von einem noch vorhandenen Kinderwunsch.

- Wenn potenziell noch Kinderwunsch besteht, ist diese Überlegung auf alle Fälle sinnvoll, da das Ovar für die Reproduktion erforderlich ist.

- Vor einer onkologischen Therapie kryokonserviertes humanes Ovarialgewebe kann außerdem Ursprung unreifer Eizellen (GV-Oozyten) (9) sowie adulter Stammzellen der Ovaroberfläche sein. Daraus ergibt sich die mögliche Verknüpfung verschiedener Konzepte zur Erhaltung der Fertilität sowie denkbarer therapeutischer Optionen durch die Stammzellen.

## Ovarialgewebe als Quelle für GV-Oozyten und Stammzellen

Die Entnahme einer Ovarialgewebeprobe erfolgt entweder in der Klinik/Praxis, die auch die Kryobank betreibt, oder aber beide sind räumlich unterschiedlich weit getrennt. Im Fall eines erforderlichen Transports von Ovarialgewebe wird dieser normalerweise auf Eis (0°C) oder bei +5–6°C empfohlen. Unter diesen Transportbedingungen degenerieren GV-Oozyten spätestens nach einer

Stunde. Wenn das Ovarialgewebe in dieser Zeit bei 32–37°C aufbewahrt wird, bleiben GV-Oozyten bis zu 2 Stunden entwicklungsfähig. Wir glauben daher, dass es – wenn die Transportwege eine gewisse Zeit nicht überschreiten – sinnvoll ist, die Temperatur höher zu halten. Das ermöglicht die Punktion kleiner antraler Follikel und Gewinnung von GV-Oozyten, wenn das Gewebe im Labor eintrifft.

Nach 28- bis 36-stündiger In-vitro-Maturation können die Eizellen, die die Metaphase II erreichen, mit der aseptischen Technik kryokonserviert (vitrifiziert) werden (10). Aus einem 3 cm<sup>3</sup> großen Gewebestück lassen sich bis zu 20 GV-Oozyten guter Qualität gewinnen (eigene unpublizierte Daten). Abbildung 1 stellt eine solche GV-Oozyte vor und nach Vitrifikation sowie nach In-vitro-Maturation zum MII-Stadium dar. Diese unreife Zelle wurde abpunktiert, nachdem der Ovarialkortex bei +32°C etwa 2 Stunden nach der Operation im Labor eintraf.

Nach dem Auftauen können Oozyten für reproduktive Techniken im Rahmen einer Kinderwunschbehandlung verwendet werden, sind aber grundsätzlich auch eine mögliche Quelle für ovarielle Stammzellen (11, 12). Diese Zellen lassen sich relativ einfach von der Ovarialoberfläche abkratzen. Es konnte gezeigt werden, dass sich vom Cortex eines 3 cm<sup>3</sup> großen Gewebestückes bis zu 50x10<sup>6</sup> Stammzellen gewinnen lassen, die eine hohe Kryostabilität besitzen und nach aseptischer Vitrifikation (10) Stammzellcluster und Vesikel bilden. Das Vorhandensein „großer Oozyten“ und Neuronen in der Kultur beweist, dass von der Ovarialoberfläche sowohl Germinalzellen als auch adulte

<sup>1</sup> Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universität Ulm

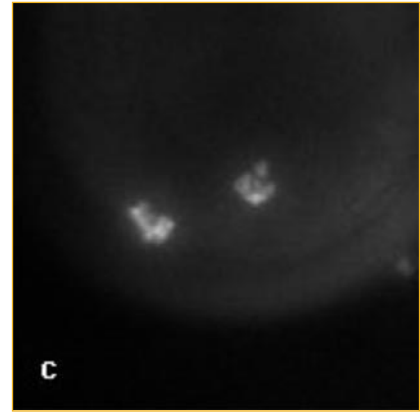
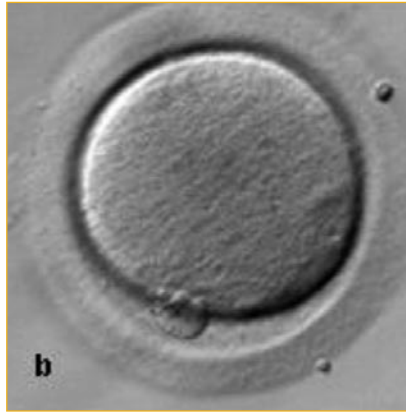
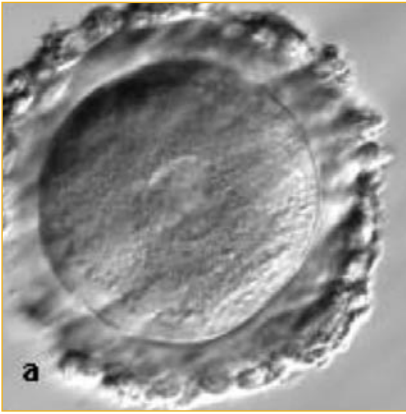


Abb. 1: Aus einer Ovarialgewebeprobe punktierte Germinalvesikel-Oozyte: (a) vor Vitrifikation (10), (b) 30 h nach Beginn der In-vitro-Maturierung, (c) dieselbe Oozyte nach Färbung mit Hoechst 33342.

Stammzellen gewonnen wurden. Die Gewinnung dieser Stammzellen würde die Kosten einer Kryobank für Ovarialgewebe nur unwesentlich steigern.

### Drei Wege von kryokonserviertem Ovarialgewebe zur Schwangerschaft

Momentan lassen sich drei Vorgehensweisen unterscheiden, wenn man die Erhaltung der reproduktiven Funktion mit Hilfe von kryokonserviertem humanem Ovarialgewebe als Ziel definiert (s. Abb. 2):

■ Beim ersten Weg (Säule I) werden aus dem aufgetauten Ovarikortex unreife Follikel gewonnen, deren Eizellen in vitro maturiert und fertilisiert werden. Die in vitro entwickelten Embryonen werden transferiert.

■ Die zweite Möglichkeit (Säule II) stellt das Verfahren dar, wonach das Ovargewebe retransplantiert wird und nach hormoneller Stimulation eine klassische In-vitro-Fertilisations-(IVF)Behandlung durchgeführt wird. Auch hier werden die in vitro entstandenen Embryonen transferiert.

■ Bei der dritten Vorgehensweise (Säule III) wird das Ovargewebe retransplantiert und eine Schwangerschaft kann in vivo auf natürlichem Weg entstehen.

Bis dato sind der 2. sowie 3. dargestellte Weg realisiert (Abb. 2, Säule

II und III). Der Idealvorstellung entspricht dabei die orthotope Retransplantation mit resultierender Spontan gravidität (Säule III) auf natürlichem Weg ohne oder auch nach ovarieller Stimulation (3). Wenn diese Option nicht zur Schwangerschaft führt, wäre der 2. Weg (Säule II) eine weitere Alternative.

### Konventionelles langsames Einfrieren oder Vitrifikation?

Für die Kryokonservierung von Ovarialgewebe sind sowohl die konventionelle langsame Methode als auch die Vitrifikation denkbar (13–16). Obwohl auch die Vitrifikation von Ovarialgewebe erfolgreich möglich ist,

### Retransfer von eingefrorenem Ovarialgewebe: Drei Wege zur Schwangerschaft

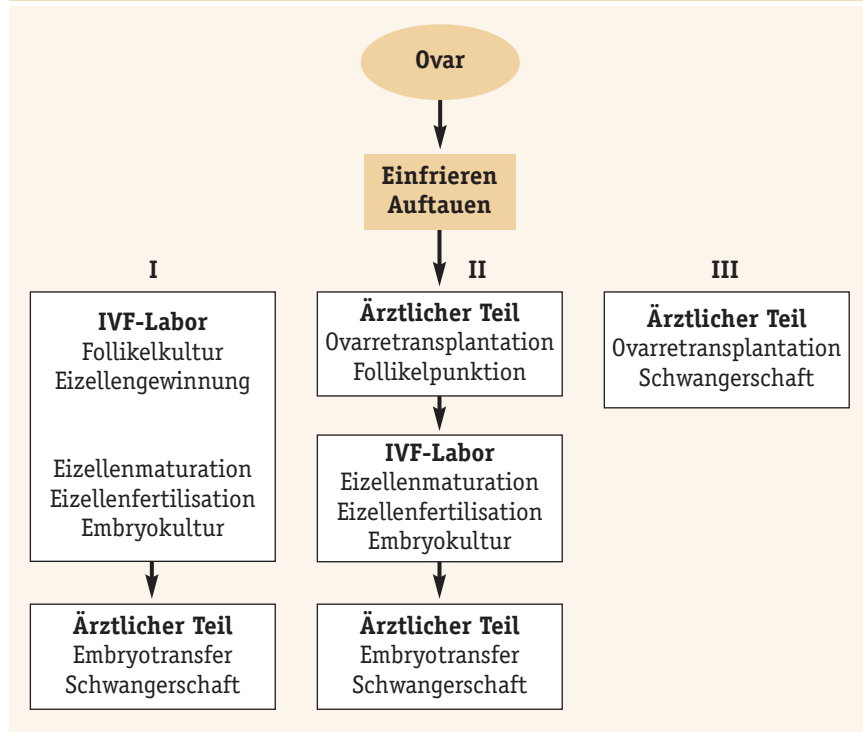


Abb. 2: Schematische Darstellung der möglichen Wege zu einer Schwangerschaft nach Kryokonservierung/Auftauen von Ovarialgewebe.

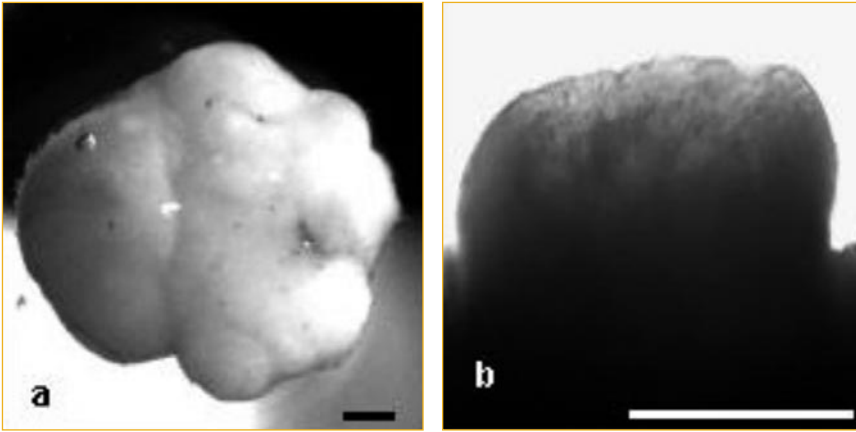


Abb. 3: Ovarialgewebeprobe (a) und Follikel aus dieser Probe (b) nach Kryokonservierung (14–17), Erwärmung und zweiwöchiger In-vitro-Kultur (17). Balken = 160 µm.

wird momentan aufgrund der höheren Effektivität in der Routine die langsame programmierte Kryokonservierung empfohlen. Der künftige Stellenwert der Vitrifikation lässt sich

aufgrund der aktuellen Datenlage noch nicht endgültig einschätzen und ist Gegenstand weiterer Studien. Es wurde bereits gezeigt, dass sich nach extrem schnellem Auftauen von ein-

gefrorenem Gewebe in kochendem Wasser die Überlebensrate der Gewebezellen signifikant verbessern lässt (14–17).

Vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen erfolgt bei onkologischen Patientinnen routinemäßig eine histologische Untersuchung, um das Risiko einer Re-Transplantation von Tumorzellen zu minimieren. Nach dem Auftauen wird daher ein kleiner Teil des Ovarialgewebes für die Histologie verwendet, ein anderer in vitro kultiviert, um das Vorhandensein von Follikeln zu evaluieren. Deren Aussehen und Qualität erlauben eine Prognose der Funktionsfähigkeit des Ovarialgewebes nach der Re-Transplantation. Die histologische Beurteilung beweist die Entwicklungskapazität der

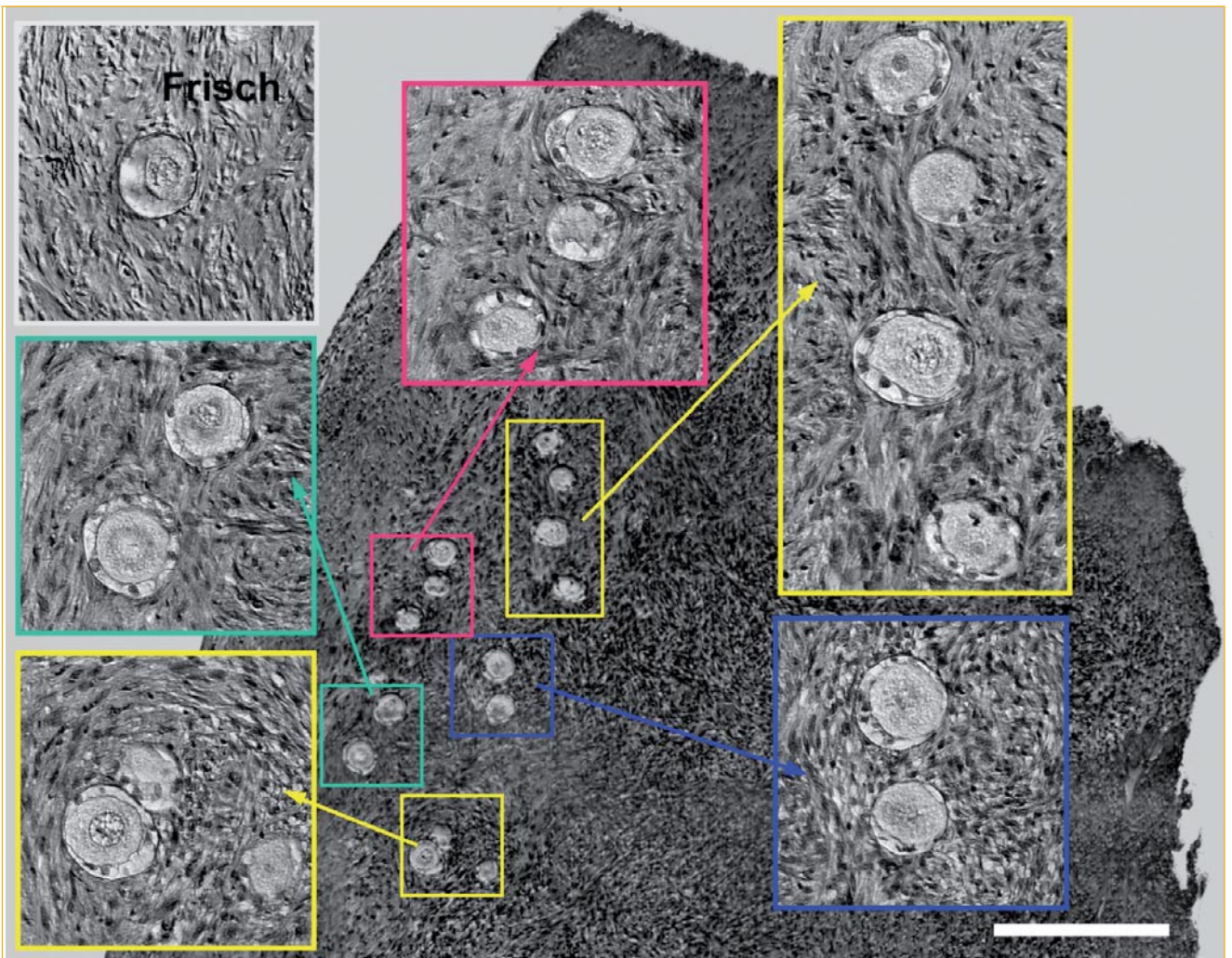


Abb. 4: Histologisches Präparat einer Ovarialgewebeprobe nach Kryokonservierung (14–17), Erwärmung und zweiwöchiger In-vitro-Kultivierung (17). Balken = 100 µm für Mikroschnitte und 300 µm für größere Bildausschnitte.

Gewebeproben nach langsamem Einfrieren, schnellem Auftauen und In-vitro-Kultivierung in größeren Medienvolumina unter permanentem und gleichmäßigem Schütteln (17). Wir glauben, dass diese Methode eine hohe Überlebensrate des Gewebes nach dem Auftauen garantiert (s. Abb. 3 und 4). Als Beispiel dafür stellt Abbildung 4 Ovarialgewebe einer 27 Jahre alten Patientin mit einem Borderline-Tumor des Ovars dar. Die Entwicklung von Primär- zu Sekundärfollikeln bestätigt die Konzeptionschancen nach Re-Transplantation.

## Literatur

1. Grovas A, Fremgen A, Rauck A et al.: National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. *Cancer* 80 (1997) 2321-2332.
2. Oktay K, Karlikaya G: Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *New Engl J Med* 342 (2000) 1919.
3. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D et al.: Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364 (2004) 1405-1410.
4. Gosden RG, Baird DT, Wade JC et al.: Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod* 9 (1994) 597-603.
5. Meirov D, Levron J, Eldar-Geva T et al.:

Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 353 (2005) 318-321.

6. Meirov D, Levron J, Eldar-Geva T et al.: Monitoring the ovaries after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue: endocrine studies, in vitro fertilization cycles, and live birth. *Fertil Steril* 87 (2007) 418.e7-418.e15.
7. Oktay K, Buyuk E, Veeck L et al.: Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 363 (2004) 837-840.
8. Schmidt KL, Andersen CY, Loft A et al.: Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. *Hum Reprod* 20 (2005) 3539-3546.
9. Isachenko E, Rahimi G, Isachenko V et al.: In-vitro maturation of germinal vesicle oocytes and cryopreservation in metaphase I/II: a possible addition option to preserve fertility during ovarian tissue cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 8 (2004) 553-557.
10. Isachenko V, Katkov I, S. Yakovenko et al.: Vitrification of human laser treated blastocysts within cut standard straws (CSS): novel aseptic packaging and reduced concentrations of cryoprotectants. *Cryobiology* 54 (2007) 305-309.
11. Johnson J, Canning J, Kaneko T et al.: Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428 (2004) 145-150.
12. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M et al.: Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2 (2004) 20-50.
13. Nawroth F, Rahimi G, Liebermann J et al.: Aktuelle Möglichkeiten der konventionellen langsamen Kryokonservierung sowie
- der Vitrifikation von humanem Ovarialgewebe. *Geburtsh Frauenheilk* 63 (2003) 847-852.
14. Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J et al.: Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of rapid and conventional freezing. *Cryobiology* 55 (2007) 261-268.
15. Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J et al.: Cryopreservation of human ovarian tissue: effect of spontaneous and initiated ice formation. *Reprod Biomed Online* 16 (2008) 336-345.
16. Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J et al.: Improved technique of human ovarian tissue freezing: quick cooling from -36°C. *CryoLetters* (2008) in press.
17. Isachenko V, Montag M, Isachenko E et al.: Effective method for in-vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 13 (2006) 228-234.



### Für die Autoren

**Dr. rer. nat.  
Vladimir Isachenko**  
Klinik für Gynäkologie und  
Geburtshilfe  
Universität Ulm  
Prittwitzstraße 43  
89075 Ulm  
v.isachenko@yahoo.com