

Gynäkologe

<https://doi.org/10.1007/s00129-018-4340-3>

© Springer Medizin Verlag GmbH, ein Teil von Springer Nature 2018

RedaktionK. Diedrich, Hamburg
R. Felberbaum, Kempten
T. Fehm, Düsseldorf

CrossMark

Jana Liebenthron¹ · Dunja Maria Baston-Büst^{1,2} · Alexandra Petra Bielfeld^{1,2} ·
Tanja Natascha Fehm³ · Vera Kristine Kreuzer^{1,2} · Jan-Steffen Krüssel^{1,2}¹ UniCareD, Universitäre Cryobank für assistierte Reproduktionsmedizin und Fertilitätsprotektion am UniKiD Düsseldorf, Universitäts-Frauenklinik, Düsseldorf, Deutschland² UniKiD, Universitäres interdisziplinäres Kinderwunschzentrum Düsseldorf, Universitäts-Frauenklinik, Düsseldorf, Deutschland³ Universitäts-Frauenklinik, Düsseldorf, Deutschland

S2k-Leitlinie: Fertilitäts-erhaltende Maßnahmen bei onkologischen Erkrankungen

Kryokonservierung von Keimzellen – Möglichkeiten und Techniken bei Mädchen und Frauen im fertilen Alter

Ovarialtoxische Wirkung verschiedener Chemotherapeutika

Ob eine chemotherapieinduzierte Amenorrhö bei onkologischen und nichtonkologischen Patientinnen schlussendlich hervorgerufen wird, hängt von verschiedenen Prädiktoren ab, wie

- dem Chemotherapier regime (Dosierung und Applikationsform) und der Substanz selbst,
- der Dauer der applizierten Therapie,
- dem Alter der Patientin zum Behandlungsbeginn und von
- chemotherapeutisch begleitenden Therapien (Radiotherapie im Bereich des kleinen Beckens oder chirurgische Eingriffe an den Ovarien, die ohnehin zu einer Reduktion des Oozytenpools führen; [1]).

In **Abb. 1** finden sich im Überblick chemotherapeutische Regime/Substanzen, angeordnet nach einem Ampelprinzip, welches damit vereinfacht die Risikogruppen für eine mögliche Schädigung der Gonaden, der Entwicklung einer permanenten Amenorrhö, darstellt. Die Kryokonservierung von gonadalen Zellen sollte somit, in welcher Form auch immer, vor allem Patientinnen mit einem hohen und intermediären Risiko für

eine therapieinduzierte vorzeitige permanente Amenorrhö angeboten werden (roter und gelber Kasten). Aber auch Patientinnen mit einem niedrigen Risiko für eine permanente Amenorrhö (hellgrüner und grüner Kasten) bedürfen entsprechender Optionen zum Fertilitätserhalt. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass ein Risiko für ein vorzeitiges Ovarialversagen (POI) von $\leq 20\%$ bedeutet, dass dennoch jede fünfte Frau, die eines dieser Chemotherapier regime erhält, Gefahr läuft, ein solches POI zu entwickeln [2] – insbesondere, wenn sie sich bereits im fortgeschrittenen fertilen Alter befindet oder eine reduzierte Ovarialreserve nachweisbar ist.

Die Leitlinie [1] legt sich dazu auf die folgenden konsensbasierten Empfehlungen und das konsensbasierte Statement mit jeweils einer sehr starken Konsensusstärke von +++ fest (Zustimmung von $>95\%$ der Teilnehmer):

- „Frauen, die Chemotherapeutika mit potenziell gonadotoxischer Dosis erhalten, sollen über das Risiko einer Ovarialinsuffizienz und fertilitätserhaltende Maßnahmen aufgeklärt werden (Konsensbasierte Empfehlung 2.E2)“.
- „Die negative Auswirkung der Gonadotoxizität von Chemotherapeutika

steigt mit dem Alter der Patientin an. Nicht alle Patientinnen einer Altersgruppe mit einem definierten Therapieschema entwickeln die gleiche Fertilitätsstörung (Konsensbasiertes Statement 2.S3)“.

Radiotoxizität und Ovarialinsuffizienz

Bei einer bevorstehenden Radiotherapie im Bereich der Ovarien ist eine Schädigung des gonadalen Gewebes im Vergleich zu der Applikation verschiedener Chemotherapeutika nicht weniger zu erwarten. Die in diesem Themenheft von *Der Gynäkologe* abgehandelte S2k-Leitlinie beschreibt bereits ab einer Strahlendosis von 3 Gray (Gy) eine erhebliche schädigende Wirkung auf die im Ovar vorhandenen Follikel und deren beherbergende Oozyten. Die effektive sterilisierende Dosis (ESD) nimmt dabei mit zunehmendem Alter ab (**Tab. 1**) – begründet durch den Verlust der Quantität und Qualität der noch im Ovarialkortex vorhandenen Oozyten.

Folgende konsensbasierte Statements mit schlussfolgernder konsensbasierter Empfehlung mit jeweils einer sehr starken Konsensusstärke von +++ finden sich

Risiko	Regime/Substanz
Hohes Risiko (> 80 %iges Risiko für eine permanente Amenorrhoe)	<ul style="list-style-type: none"> • CMF, CEF, CAF, TAC x 6 bei Frauen ≥ 40 Jahre • Konditionierung für Stammzelltransplantation (insbesondere Alkylantien-basierte myeloablative Konditionierung mit Busulfan, Cyclophosphamid, Melphalan) • BEACOPP x 6-8 bei Frauen > 35 Jahre
Intermediäres Risiko (40-60 %iges Risiko für eine permanente Amenorrhoe)	<ul style="list-style-type: none"> • CMF, CEF, CAF, TAC x 6 bei Frauen 30–39 Jahre • AC x 4 bei Frauen ≥ 40 Jahre • AC oder EC x 4 → Taxan • BEACOPP x 6-8 bei Frauen 25-35 Jahre • CHOP x 6 bei Frauen ≥ 35 Jahre • Knochen- und Weichteilsarkom-typische Therapie
Niedriges Risiko (< 20 %iges Risiko für eine permanente Amenorrhoe)	<ul style="list-style-type: none"> • CMF, CEF, CAF, TAC x 6 bei Frauen ≤ 30 Jahre • AC x 4 bei Frauen ≤ 40 Jahre • BEACOPP x 6-8 bei Frauen < 25 Jahre • ABVD x 2-4 • CHOP x 6 bei Frauen < 35 Jahre • CVP • AML-typische Therapie (Anthrazyklin/Cytarabin) • ALL-typische Therapie (multi-agent) • FOLFOX bei Frauen ≤ 40 Jahre
Sehr niedriges oder kein Risiko für eine permanente Amenorrhoe	<ul style="list-style-type: none"> • Methotrexat • Fluorouracil • Vincristin

Abb. 1 ▲ Ovarialtoxische Wirkung verschiedener Chemotherapeutika. (Mod. aus [1], DGGG S2k-Leitlinie zum Fertilitätserhalt [AWMF Nr. 015/08] von 07/2017). *ABVD* Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin, *AC* Doxorubicin, Cyclophosphamid, *ALL* akute lymphatische Leukämie, *AML* akute myeloplastische Leukämie, *AWMF* Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, *BEACOPP* Bleomycin, Etoposid, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazine, Prednison, *CAF* Cyclophosphamid, Adriamycin, Fluorouracil, *CEF* Cyclophosphamid, Epirubicin, 5-Fluorouracil, *CHOP* Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison, *DGGG* Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, *FOLFOX* Folsäure (Leucovorin), 5-Fluorouracil, Oxaliplatin

dazu in der Leitlinie [1] im Bereich Radiontoxizität und Ovarialinsuffizienz:

- „Frauen können abhängig von Strahlendosis, Alter bei Exposition und bestrahltem Volumen der Ovarien eine Ovarialinsuffizienz erleiden (Konsensbasiertes Statement 2.S4)“.
- „Patientinnen mit einer Strahlentherapie unter Einschluss der anatomischen Lage der Ovarien sollen über das Risiko der Ovarialschädigung aufgeklärt und auf die Möglichkeit fertilitätserhaltender Maßnahmen hingewiesen werden (Konsensbasierte Empfehlung 2.E3)“.

Endokrine Therapien und Fertilitätsminderung

Der Einsatz dieser Therapieoption führt zu einer Fertilitätsminderung durch den nicht minder zu bewertenden Faktor Zeit. Durch die zumeist sehr lange Dauer der Behandlung (5–10 Jahre bei z. B.

einem hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom) verschiebt sich nicht selten die Erfüllung des Kinderwunsches in eine Lebensphase, in welcher bereits eine reduzierte Ovarialreserve vorliegt [1].

Mit der quantitativen Abnahme geht ebenfalls eine altersabhängige Qualitätseinbuße der Oozyten einher. Diese zeigt sich vorwiegend in chromosomalen Auffälligkeiten [3, 4], hauptsächlich aufgrund von sog. Non-Disjunctions bei Spindeldefekten bzw. altersabhängigen degenerativen Erscheinungen des Spindelapparates [5, 6], die zu numerischen Chromosomenaberrationen, wie Mono- oder Trisomien im Embryo führen und damit ein geringeres Entwicklungspotenzial bei Prä- und Postimplantationsembryonen verursachen [5–7]. Während die klinische Schwangerschaftsrate bei Frauen bis zum 37. Lebensjahr bei nahezu 35 %, also über einem Drittel liegt, sinkt sie ab dem 38. Lebensjahr deutlich ab. Eine 40-jährige Frau hat noch eine

Wahrscheinlichkeit von ca. 25 % pro Transfer, eine 44-jährige Frau jedoch nur noch eine Wahrscheinlichkeit von 8,5 % [7]. Die altersabhängige Reduktion zeigt sich insbesondere auch bei den Geburtenraten, die bei einer 35-jährigen Frau bei 27 % liegen, bei einer 40-jährigen Frau bei 15 % und bei einer 44-jährigen Frau lediglich bei 3,2 % pro Embryotransfer. Im gleichen Maß wie die Eizellqualität abnimmt, steigt die Fehlgeburtenrate altersabhängig an. Insbesondere ab dem 40. Lebensjahr enden über 32 % der Schwangerschaften in einer Fehlgeburt, ab dem 44. Lebensjahr sogar mehr als die Hälfte [7].

Mit einer starken Konsensusstärke von ++ (Zustimmung von >75–95 % der Teilnehmer) wurde somit in [1] eine konsensbasierte Empfehlung zu Patientinnen aus dieser Behandlungsgruppe erlassen:

- „Patientinnen, die eine (...) zielgerichtete Therapie erhalten, sollten über das unklare Risiko einer Ovarialinsuffizienz und fertilitätserhaltende Maßnahmen aufgeklärt werden (Konsensbasierte Empfehlung 2.E7)“.

Diese Empfehlung wird insbesondere bei den Mammakarzinompatientinnen durch die aktuellen Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e. V. (AGO) gestützt [8] und durch die Deutsche Krebsgesellschaft, in deren Zertifizierungsanforderungen für Brustzentren die fertilitätsprotektive Beratung mittlerweile ein fester und dokumentierungspflichtiger Bestandteil ist [9].

Kryokonservierung von (un)fertilisierten Oozyten zum Fertilitätserhalt

Die Kryokonservierung von unfertilisierten und die Kryokonservierung von fertilisierten Oozyten (im Vorkernstadium) sind weltweit bestens etablierte und standardisierte Techniken der assistierten Reproduktionsmedizin, die somit auch sicher bei Patientinnen vor einer fertilitätsschädigenden- oder mindernden Therapie angewendet werden können [10, 11]. Allerdings ist hier zu berücksichtigen, dass die postpubertäre

re Patientin ein tatsächlich dafür noch passendes Zeitfenster bis zum Beginn ihrer gonadotoxischen Therapie haben muss – nämlich 14–16 Tage sowie als weitere Grundvoraussetzung ein gutes zu erwartendes Ansprechverhalten auf eine dafür notwendige Hormonstimulationstherapie. Diese kann mittlerweile dank moderner Protokolle zu jedem Zyklustag gestartet werden („random start stimulation“; [11–14]), im Durchschnitt können dabei bei 31- bis 35-jährigen Patientinnen ca. 13 Oozyten gewonnen werden. Mit zunehmendem Alter nimmt die Anzahl und auch der Erfolg, der aus dieser Methode hervorgehen kann, deutlich ab (s. Abschn. Endokrine Therapien und Fertilitätsminderung).

Was die Kryokonservierung selbst anbelangt, sind 2 verschiedene Einfrieremethoden verfügbar:

- das langsame Einfrierverfahren, Slow-Freezing (ein Kryokonservierungsverfahren mit Äquilibration) und
- die Vitrifikation (ein ultraschnelles Einfrierverfahren ohne Äquilibration).

Beide Methoden erfüllen trotz ihrer unterschiedlichen Protokolle und Anwendungsweisen dieselbe Funktion [15]: eine reversible Arretierung des Oozytenmetabolismus bei -196°C , die Erhaltung von Struktur und genetischer Integrität der Keimzelle, akzeptable Überlebensraten nach Kryokonservierung und Auftauen sowie reproduzierbare Ergebnisse.

Historisch gesehen ist das Slow-Freezing, bei dem die kontrollierte Herstellung und die Aufrechterhaltung eines Äquilibriums zwischen dem intrazellulären Wasser und dem nicht gefrorenen Wasser im niedrig konzentrierten Kryoprotektivum verfolgt wird, die am längsten durchgeführte Methode, die sich durch den Einsatz von Einfrierautomaten mit einer hohen reproduzierbaren Erfolgsrate auszeichnet. Während der langsamen, genau festgelegten Abkühlung, bei der es zum vorsichtigen Austausch von dem Wasser der Oozyte/des Gameten mit dem kommerziell eingesetzten Kryoprotektivum kommt (deshalb Äquilierungsverfahren), werden eine intrazelluläre Eiskristallbildung und somit

Gynäkologe <https://doi.org/10.1007/s00129-018-4340-3>
© Springer Medizin Verlag GmbH, ein Teil von Springer Nature 2018

J. Liebenthron · D. M. Baston-Büst · A. P. Bielfeld · T. N. Fehm · V. K. Kreuzer · J.-S. Krüssel

S2k-Leitlinie: Fertilitätserhaltende Maßnahmen bei onkologischen Erkrankungen. Kryokonservierung von Keimzellen – Möglichkeiten und Techniken bei Mädchen und Frauen im fertilen Alter

Zusammenfassung

Onkologische und nichtonkologische Erkrankungen können die gegenwärtige oder zukünftige Fertilität beeinträchtigen, entweder durch die Krankheit selbst oder durch notwendig chirurgische Eingriffe, hormonelle und/oder gonadotoxische Behandlungen. Sie erfordern damit einen adäquaten fertilitätsprotektiven Ansatz – sprich eine unbedingte Beratung und, wenn die Voraussetzungen gegeben sind, auch eine entsprechende fertilitätsprotektive Therapie. Die Kryokonservierung von Oozyten stellt zumeist die Methode der ersten Wahl bei postpubertären Frauen dar. Metaphase-II-Oozyten-Kryokonservierung mittels Vitrifikation ist dabei die bevorzugte und empfohlene Option. Aber auch der kumulative Nachweis der Wiederherstellung der endokrinen Ovarialfunktion und der daraus resultie-

renden spontanen bzw. nach orthotoper Transplantation von kryokonserviertem Ovarialgewebe und Einsatz unterstützender assistierter reproduktionsmedizinischer Techniken resultierenden Schwangerschaften und Geburten spricht für diese Methode als offene klinische Anwendung – insbesondere bei präpubertären Mädchen, die nicht minder von keimzellschädigenden Behandlungen betroffen sind als adollescente oder adulte Patientinnen im fertilen Alter und bei denen keine andere nachweislich wirksame Option zum Fertilitätserhalt derzeit verfügbar ist.

Schlüsselwörter

Slow-Freezing · Krebserkrankung · Chemotherapie · Bestrahlung · Keimzellschädigung · Beratung · Leitlinie

S2k guideline: fertility-protective measures in oncological diseases. Cryopreservation of germ cells—possibilities and techniques for girls and women of reproductive age

Abstract

Oncological and nononcological diseases can affect current or future fertility, either through the disease itself or through necessary surgery, hormonal and/or gonadotoxic treatments. They therefore require an adequate fertility-protective approach—i. e. counselling is essential and, if the prerequisites are met, an appropriate fertility-protective therapy. Cryopreservation of oocytes is usually the first-choice method for postpubertal women. Metaphase II oocyte cryopreservation by vitrification is the preferred and recommended option. However, cumulative evidence of restoration of ovarian endocrine function and resulting spontaneous pregnancies and births, or

after the use of assisted reproductive techniques, after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue also advocates this method as an open clinical application, especially in prepubertal girls who are no less affected by germ cell-damaging treatments than adolescent or adult patients of reproductive age and for whom no other possible option for fertility preservation is currently available.

Keywords

Slow freezing · Cancer · Chemotherapy · Radiotherapy · Germ cell damage · Counseling · Guideline

eine irreversible Zellstrukturschädigung kontrolliert verhindert [16].

Die jüngere Methode, die Vitrifikation, erzielt bei sorgfältiger Anwendung gleiche bis höhere Ergebnisse im Vergleich zum langsamen Einfrierverfahren. Das Ausbleiben einer intrazellulären Eiskristallbildung wird durch die Überfüh-

rung der Oozyte von einem flüssigen in einen amorphen, glasförmigen Zustand möglich. Um innerhalb der Oozyte und extrazellulär jedoch diese glasähnliche Solidifikation erreichen und toxische sowie osmotische Verletzungen minimieren zu können, müssen extrem hohe Abkühlraten, hochkonzentrierte kommer-

Tab. 1 Radiotoxizität und Ovarialinsuffizienz. (Mod. aus [1]: DGGG S2k-Leitlinie zum Fertilitätserhalt [AWMF Nr. 015/08] von 07/2017)

Effektive sterilisierende Dosis (ESD)	Ovarielle Strahlendosis (Gy)
Keine relevanten Effekte	0,6
Keine relevanten Effekte mit <40 Jahren	1,5
0 Jahre	20,3
10 Jahre	18,4
20 Jahre	16,5
30 Jahre	14,3
40 Jahre	6

DGGG Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, AWMF Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften

zielle Kryoprotektiva (Einsatz einer Mischung aus permeablen und nichtpermeablen Kryokonservierungsmitteln, die außerdem die spezifische Toxizität jeder einzelnen Komponente erniedrigen) und minimale Volumina (im Nanoliterbereich) verwendet werden [15]. Bei der Vitrifikation unterscheidet man zusätzlich 2 Anwendersysteme, die sich auf den Zellträger beziehen: ein offenes und ein geschlossenes System. Ein offenes System stellt dabei den direkten Kontakt der einzufrierenden Zelle mit flüssigem Stickstoff her, wodurch sehr hohe Abkühlraten erzielt werden können. Es besteht jedoch durch die „offene“ Lagerung ein theoretisches Risiko der Kontamination und Infektion. Ein geschlossenes System umgeht dieses Risiko komplett, allerdings werden hierbei etwas geringere Abkühlraten im Vergleich zum offenen System erreicht, was sich ggf. nachteilig auf die Überlebens- und auch Entwicklungsrate der vitrifizierten Gameten nach dem Auftauen auswirken könnte.

Kryokonservierung von unfertilisierten Oozyten

Das Einfrieren der besonders kryosensitiven unfertilisierten Oozyten stellte in der Vergangenheit die größte Herausforderung bei Kryokonservierungsverfahren von gonadalen Zellen dar. Dies ist auf ihre geringe Membranpermeabilität, ihre Größe (130 µm), ihren enorm hohen

Tab. 2 Erfolgsraten nach Vitrifikation unfertilisierter Oozyten. (Mod. aus [1]: DGGG S2k-Leitlinie zum Fertilitätserhalt [AWMF Nr. 015/08] von 07/2017)

Überlebensrate pro unbefruchteter Oozyte nach Kryokonservierung/Auftauen	80–90 %
Fertilisierungsrate pro unbefruchteter Oozyte nach Kryokonservierung/Auftauen	76–83 %
Klinische Schwangerschaftsrate	44,9 %
Fehlbildungsrate	1,3 %

DGGG Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, AWMF Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften

Wassergehalt (Gefahr der intrazellulären Eiskristallbildung bei falschem Handling) sowie das Vorhandensein des noch intakten Spindelapparates durch die unvollendete Meiose zurückzuführen. Nach den aktuellen Leitlinien (ASCO [American Society of Clinical Oncology], [17]; ESHRE/ASRM [European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine], [18]), nationalen wie internationalen Empfehlungen [19, 20] und der hier thematisch abgehandelten S2k-Leitlinie zum Fertilitätserhalt [1] gilt die Vitrifikationsmethode als die Standardmethode zur Kryokonservierung von unfertilisierten Oozyten. Zurückzuführen ist dies auf die Tatsache, dass sich unfertilisierte Oozyten nach Slow-Freezing nur sehr schlecht befruchten ließen bei generell schlechteren Überlebensraten nach Auftauen – und dass somit Fertilitätsprotektion durch die Kryokonservierung von unbefruchteten Oozyten eigentlich erst nach Einführung der Vitrifikation wirklich sinnvoll wurde. Die in der Leitlinie [1] veröffentlichten Erfolgszahlen nach Verwendung der Vitrifikation sind in **Tab. 2** dargestellt und auf damals publizierte Arbeiten [21, 22] zurückzuführen.

Zieht man aktuellere Zahlen aus der Arbeitsgruppe von Cobo et al. [23] hinzu, dann zeigen sich für die Vitrifikation (**Tab. 2**) noch einmal verbesserte Überlebensraten nach Kryokonservierung/Auftauen von 80–95 %, klinische Schwangerschaftsraten nach ICSI (intrazytoplasmatischer Spermieninjektion) pro Embryotransfer von im Durchschnitt 30 % (10–59 %) und eine kumulative Lebendgeburtenrate von im Durchschnitt 33 % (6–62 %). Die Erfolgsraten (insbesondere die Lebendgeburtenrate pro Eizelle) korrelieren, wie bereits eingangs beschrieben, streng mit dem Alter der

Patientinnen. Patientinnen ≤36 Jahre erzielen bessere Ergebnisse als ältere Patientinnen [23–25], zumal im fortgeschrittenen Alter auch die Anzahl der zu gewinnenden Oozyten aufgrund der altersbedingten Reduktion der Ovarialreserve sinkt.

» Die Erfolgsraten der Vitrifikationstechnik sind abhängig von der sicheren Handhabung des Anwenders

Unabhängig von den oben genannten Faktoren korrelieren zusätzlich die Erfolgsraten streng mit dem Anwender, d.h.: Die guten Erfolgsraten nach Vitrifikation können nur generiert werden bei einer geübten und sicheren Handhabung der Kryokonservierungstechnik [21, 26]. Eine unsachgemäße bzw. unsichere Durchführung im Einfrier- und/oder Auftauprozess sowie die Nichteinhaltung der strengen Zeitvorgaben während der einzelnen Inkubationsschritte in den hochkonzentrierten Kryoprotektiva führen zu irreversiblen Schäden der Keimzellen, was sich in den Überlebens-, Fertilisierungs-, Entwicklungs-, klinischen Schwangerschafts- und Lebendgeburtenraten deutlich widerspiegelt. Möglich ist jedoch, dass in Zukunft eine Automatisierung des Vitrifikationsvorganges die hohen Erfolgsraten stabilisiert, durch standardisierte und vom Geschick des Anwenders unabhängige Arbeitsabläufe in einem kontrollierten Umfeld.

Kryokonservierung von fertilisierten Oozyten im Pronukleusstadium

Im Gegensatz zur Kryokonservierung von unfertilisierten Oozyten stellt die Kryokonservierung von fertilisierten Oozyten mit 2 Vorkernen (Pronukleusstadium), d. h. einen Tag nach der Eizellgewinnung und im Befruchtungsvorgang mit einem Spermium, eine schon über lange Zeit sichere Methode dar und ist ein wesentlicher Bestandteil von assistierten reproduktionsmedizinischen Techniken. Die in der Leitlinie aufgeführte klinische Schwangerschaftsrate von 23,5 % kann nach aktuellen Zahlen des DIR (Deutsches IVF[In-vitro-Fertilisation]-Register; [7]) im Durchschnitt auf 27 % angehoben werden. Das Fehlen des Spindelapparats nach Beendigung der Meiose macht die Oozyte im Labor bemerkbar einfacher behandelbar [16]. Die Kryokonservierung kann sowohl im Slow-freezing-Verfahren, als auch mittels Vitrifikation vorgenommen werden – allerdings setzt sich auch hier zunehmend die Methode der Vitrifikation als Standardkryokonservierungsmethode durch.

» Um die Unabhängigkeit der Frau zu bewahren, wird oft ein Befruchtet-unbefruchtet-Splitting empfohlen

Wird eine Kryokonservierung von fertilisierten Oozyten geplant, sollte sich die Patientin in einer festen Partnerschaft befinden. Um dennoch die Unabhängigkeit der Frau zu bewahren, wird selbst bei einer festen Partnerschaft oft zu einem Splitting (50 % befruchtet, 50 % unbefruchtet kryokonserviert) geraten.

Die S2k-Leitlinie von DGGG (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe), DGRM und DGU zum Fertilitätserhalt [1] legte sich im Bereich Kryokonservierung von unfertilisierten und/oder fertilisierten Oozyten zum Fertilitätserhalt auf die folgenden konsensbasierten Statements und Empfehlung mit jeweilig sehr starken Konsensusstärken von +++ fest:

- „Die Kryokonservierung von befruchteten und unbefruchteten Eizellen sind etablierte, reproduktionsmedizinische Techniken, die vor einer gonadotoxischen Therapie angewendet werden können (Konsensbasiertes Statement 4.S19)“.
- „Die Kryokonservierung von unfertilisierten Oozyten weist keine erkennbar erhöhte Rate an Fehlbildungen oder Entwicklungsdefiziten der Kinder im Vergleich zur Kryokonservierung von fertilisierten Oozyten auf (Konsensbasiertes Statement 4.S21)“.
- „Selbst bei bestehender Partnerschaft soll zusätzlich das Einfrieren von unfertilisierten Oozyten angeboten werden (Konsensbasierte Empfehlung 4.E35)“.

Kryokonservierung von Ovarialgewebe

Die Kryokonservierung von Ovarialgewebe für eine spätere Transplantation bei Kinderwunsch und therapieinduziertem vorzeitigem Ovarialversagen ist eine fertilitätserhaltende Methode, die sehr kurzfristig, zumeist binnen 2–4 Tagen, vor einer gonadotoxischen Therapie durchgeführt werden kann. Sie basiert auf der Tatsache, dass durch die später eingesetzten Ovarialgewebetransplantate eine temporäre Wiederherstellung der eigentlichen endogenen Hormonproduktion, der primären Eierstockfunktion, erfolgen kann [2, 27, 28]. Dadurch können zum einen Wechseljahrproblematiken gemindert bzw. behoben werden, ein positiver Nebeneffekt, zum anderen, und das ist das Hauptkriterium, können dadurch spontane Schwangerschaften (sprich: ohne die Zuhilfenahme weiterer reproduktionsmedizinischer Verfahren) aus einem Pool von Oozyten in ihrer physiologischen Umgebung erzielt werden.

Die Entnahme erfolgt zyklusunabhängig, wodurch eine Verzögerung der onkologischen Therapie nicht zu erwarten ist [29]. Der Erfolg dieser Methode, sprich die Chance auf eine spätere Schwangerschaft und die Geburt eines gesunden Kindes aus den Transplantaten ist umso größer, je höher die Ovarialreserve

zum Entnahmezeitpunkt und vor Beginn der onkologischen Therapie ist [2]. Die Ovarialreserve ist einschätzbar anhand des Alters, des AMH (Anti-Müller-Hormon)-Wertes sowie der Bestimmung der Primordial- und Primärfollikeldichte mit ihren potenziellen Oozyten in den zu präparierenden Transplantaten mittels geeigneter Nachweisverfahren ([2, 30, 31]; s. Abschn. Qualitätssicherung bei der Kryokonservierung von Ovarialgewebe).

» Die zyklusunabhängige Entnahme lässt eine Verzögerung der onkologischen Therapie nicht erwarten

Dessen ungeachtet legten sich die Autoren der Edinburgh-Kriterien auf eine Altersobergrenze von 35 Jahren fest [32], in anderen internationalen Publikationen beträgt die Grenze 40 Jahre [33]. In einer Veröffentlichung aus 2016 von van der Ven et al. [28] lagen die Schwangerschaftsraten aus dem FertiPROTEKT-Netzwerk nach Transplantation von Ovarialgewebe bei Frauen, welche zum Zeitpunkt der Kryokonservierung unter 35 Jahren waren bei 33 %, im Vergleich zu 18 % bei Frauen, welche zum Zeitpunkt der Kryokonservierung über 35 Jahren waren. Bei Frauen, die zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme über 40 Jahre alt waren, konnte in keinem Fall nach Transplantation eine Schwangerschaft erzielt werden. Insgesamt wurden nach Aktualisierung der Daten aus [28] im FertiPROTEKT-Netzwerk (laut Register sind dies 123 universitäre Zentren, Kliniken und Praxen aus Deutschland, Österreich und der Schweiz zum Zeitpunkt der Veröffentlichung 07/2018 [34]) bis Januar 2018 bei 126 Frauen 163 Transplantationen durchgeführt [2]. Die aus den aktualisierten Zahlen hervorgegangenen Erfolgsraten sind vergleichbar mit den Erfolgen im internationalen Ausland. Insgesamt wurden bis jetzt weltweit über 145 Geburten nach orthotoper Transplantation von kryokonserviertem Ovarialgewebe erzielt [2]. Die Angherate der Transplantate liegt bei 85–90 %, die klinische Schwangerschaftsrate um 45 %

Tab. 3 Risiko einer ovariellen Metastasierung bei verschiedenen Tumorarten. (Mod. aus [1]: DGGG S2k-Leitlinie zum Fertilitätserhalt [AWMF Nr. 015/08] von 07/2017)

Hohes Risiko	Moderates Risiko	Geringes Risiko
Leukämie	Mammakarzinom Stadium IV, Infiltration lobulärer Subtypen	Mammakarzinom Stadium I–III, Infiltration duktaler Subtypen
Neuroblastom	Darmkarzinome	Squamöses Zellkarzinom der Zervix
Burkitt-Lymphom	Endometriumkarzinom	Hodgkin-Lymphom
Ovarialtumoren	Magenkarzinom	Osteosarkome
	Adenokarzinom der Zervix	Nongenitales Rhabdomyosarkom
	Non-Hodgkin-Lymphome	Wilms-Tumor
	Ewing-Sarkome	

DGGG Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, AWMF Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften

und die Geburtenrate beträgt derzeit ca. 35–40%, wobei von einer weiteren Steigerung durch anhaltende Optimierungen bei den Kryokonservierungs-/Auftau- und Operationstechniken auszugehen ist [2, 31].

Die Leitlinie [1] legt sich im Bereich Kryokonservierung von Ovarialgewebe zum Fertilitätserhalt auf die folgenden konsensbasierten Statements mit jeweils einer starken Konsensusstärke von ++ fest:

- „Die Kryokonservierung von Ovarialgewebe ist eine etablierte Methode, um die Fertilität nach der Behandlung der Krebserkrankung wiederherzustellen (Konsensbasiertes Statement 4.S22)“.
- „Die Kryokonservierung von ovariellen Gewebe kann unabhängig vom Zyklus erfolgen und führt zu keiner relevanten Verzögerung der onkologischen Therapie (Konsensbasiertes Statement 4.S23)“.

Ergänzend soll hier noch ein gemeinsamer Beschluss von führenden Experten auf dem Gebiet Entnahme, Kryokonservierung und Transplantation von Ovarialgewebe erwähnt werden [2]: „Die Kryokonservierung von Ovarialgewebe soll vor Beginn einer gonadotoxischen Therapie nur bei Mädchen und bei Frauen bis zu einem Alter von 40 Jahren erfolgen“. Im Einzelfall soll allerdings auch bei präpubertären Mädchen unter Berücksichtigung der gonadotoxischen Therapie und der Risiken des operativen Eingriffes eine Kryokonservierung von Ovarialgewebe in Erwägung gezogen werden [2, 35], da die Literatur mittlerweile belegt, dass

auch die kleinen, noch nicht rekrutierten, Primordialfollikel durch gonadotoxische Substanzen erhebliche DNA-Schäden erfahren, die sie früher oder später in die Atresie treiben [36]. Dass Kinder ein ganzes anderes Ovarialkortexpotenzial aufweisen als adolozente oder adulte Patientinnen im fertilen Alter, verzerrt jedoch zumeist die Wahrnehmung zum Ausmaß der Schädigung im Nachhinein nicht unerheblich. Somit erfahren die Kinder zwar nach gonadotoxischer Therapie zum größten Teil den Eintritt in die Pubertät, aber dass die Anzahl der dann noch existenten, nicht geschädigten Follikel letztlich auch wirklich ausreicht, bis zu dem Zeitpunkt der fertilen Phase, wenn ein Kinderwunsch aktuell wird, ist kritisch zu hinterfragen bzw. wird in der Praxis nicht selten widerlegt.

Entnahme und Transport

Von einem Ovar wird laparoskopisch antimesenterial Gewebe entnommen. Das Resektat wird am Stück unmittelbar in ein geeignetes Transportmedium überführt und kühl (bei etwa 4 Grad) aufbewahrt. Vor der Gewebeentnahme sollte mittels einer Kochsalzlösung eine Untersuchung der Tubendurchgängigkeit erfolgen, um, falls sich ein einseitiger Tubenverschluss zeigt, auf dieser Seite das Ovarialgewebe entnehmen zu können. Hintergrund dabei ist, dass auf der Seite mit der noch offenen Tube das potenziell noch funktionierende Ovarialgewebe erhalten bleiben soll sowie, wenn ein vorzeitiges Ovarialversagen eintritt, sich dort auch später ein optimaler Ort für eine Transplantation anbieten kann [2]. Dennoch ist

möglichst darauf zu achten, dass ovarielles Gewebe nicht auf der Seite eines Corpus luteum, eines präovulatorischen Follikels oder bei bestehenden Ovarialzysten entnommen wird. Möglicherweise ist die Follikeldichte des zu kryokonservierenden Ovarialgewebes in diesem Bereich eingeschränkt, die Kortexqualität ist es in jedem Fall, wie Untersuchungen gezeigt haben [2]. Die zu entnehmende Menge ist abhängig von der zu erwartenden Gonadotoxizität der bevorstehenden onkologischen Therapie, d. h. je gonadotoxischer die Therapie, desto mehr Ovarialvolumen sollte entnommen werden. Bei einem hohen gonadotoxischem Risiko oder bei präpubertären Mädchen (aufgrund der geringen Größe der Ovarien) kann die Entnahme eines ganzen Ovars in Erwägung gezogen werden. Ergänzend dazu lautet ein gemeinsamer Expertenbeschluss [2, 2]: „Es sollten mindestens 1/2 bis 2/3 eines Ovars (bevorzugt ohne Ovarialpathologien) entnommen werden. Eine beidseitige Entnahme sollte nur in Ausnahmefällen durchgeführt werden“ – nämlich dann, wenn z. B. beidseitige Ovarialzysten vorliegen und nicht genügend Material für eine Kryokonservierung gewonnen werden kann. Der Hintergrund hierbei ist die Vermeidung durch Vernarbungen oder ggf. im Nachgang doch notwendige Koagulationen am verbliebenen Eierstock, wodurch ein weiterer Verlust der im Körper verbliebenen Ovarialreserve hervorgerufen werden kann. „Biopsien sind nicht zu empfehlen“.

Darüber hinaus ist eine histologische Untersuchung einer Referenzprobe des entnommenen Ovarialgewebes zum Ausschluss von malignen Zellen (mindestens 2 × 2 mm großes Gewebestück vom entnommenen Ovarialgewebe) unabdingbar und sollte vom entnehmenden Zentrum durchgeführt und dokumentiert werden [2]. Die Risikogruppeneinteilung hinsichtlich einer zu erwartenden ovariellen Metastasierung wurde in der S2k-Leitlinie [1] wie folgt vorgenommen (Tab. 3):

Das gekühlte Ovarialgewebe sollte unmittelbar bei weiterhin ca. 4 °C zum Aufbereitungsort transportiert werden [31]. Einrichtungen, welche die Möglichkeit nicht besitzen, eine Kryokon-

servierung des Ovarialgewebes selbst durchzuführen, können das Resektat in einem geeigneten Transportbehälter zu einem für die Verarbeitung und Kryokonservierung spezialisierten Zentrum mit angeschlossener Kryobank des Netzwerks FertiPROTEKT, wie Bonn, Düsseldorf oder Erlangen, verschicken [31]. Der Transport in dafür vorgesehenen Containern soll eine Vermeidung der Kühlkettenunterbrechung gewährleisten. Wie lange der Transport des Gewebes (ob über Nacht oder innerhalb eines Tages) maximal sein kann, ohne dass mit einem erheblichen Verlust der gonadalen Keimzellen in den Ovarialfollikeln zu rechnen ist, ist derzeit noch nicht ausreichend belegt. Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Hypothermie des Ovarresektates in verschiedenen Transportzeiträumen bis zu 24 h andauern kann, ohne dass die Follikelreserve nachhaltig geschädigt wird bzw. ohne dass es zu Einbußen in den Erfolgsraten nach Transplantation kam. Als Transportmedium sollte Custodiol® (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Deutschland) oder ein vergleichbares Medium unter den oben beschriebenen gekühlten Bedingungen verwendet werden [2, 31].

Folgende konsensbasierte Empfehlung mit einer sehr starken Konsensusstärke von +++ gibt die Leitlinie dazu [1]:

- „Der Transport des entnommenen Gewebes soll gekühlt (4–8 °C) in ein für die Kryokonservierung spezialisiertes Zentrum erfolgen. Das Gewebe soll zeitnah, bis maximal 24 h nach Entnahme, verarbeitet werden (Konsensbasierte Empfehlung 4.E36)“.

Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung selbst finden derzeit sowohl die Vitrifikation als auch das langsame Einfrierverfahren, das Slow-Freezing, Anwendung. Anders als bei den Oozyten wird jedoch aufgrund der besseren Datenlage und den vorliegenden Erfolgszahlen aktuell das Slow-Freezing-Verfahren empfohlen [1, 2]. Das langsame Einfrieren mit sehr geringen Kühlraten über einen längeren

Zeitraum von etwa 3 Stunden bedarf dabei bestmöglich der Anwendung von computergesteuerten Einfriergeräten mit einer automatischen Seedingvorrichtung (schonende Auslösung einer kontrollierten Kristallisation an einem fest definierten Punkt im Einfrier Röhrchen), sodass für alle Einfrierproben die gleichen Umgebungsbedingungen und hohe Reproduzierbarkeitsraten gegeben sind. Das eingesetzte und zum jetzigen Zeitpunkt auch noch nicht kommerziell erhältliche Kryomedium ist ein wichtiger Punkt. Daher sollte es sehr sorgfältig ausgewählt bzw. zusammengesetzt werden. Es empfiehlt sich ein für humane Keimzellen zugelassenes und zertifiziertes Trägermedium in geeigneter Kombination mit einem ebenfalls zertifizierten Kryoprotektivum (Ethylenglykol, Propandiol oder DMSO [Dimethylsulfoxid]) sowie Zusatz von humanem Serum-Albumin, da sich unter Verwendung dieser Kryoprotektiva ähnlich gute Überlebensraten der Keimzellen sowie intakte Gewebemorphologien und Zellstrukturen nach Kryokonservierung und anschließendem Auftauen nachweisen ließen [37–39]. International betrachtet ist DMSO das am häufigsten eingesetzte und am besten etablierte Kryoprotektivum für die Kryokonservierung von Ovarialgewebe [2].

Qualitätssicherung

Sowohl vor der Kryokonservierung als auch in Vorbereitung auf eine Transplantation bei einem vorzeitigen Ovarialversagen nach stattgehabter gonadotoxischer Therapie und Kinderwunsch ist es notwendig, dass das frisch präparierte/bzw. nach Kryokonservierung aufgetaute Ovarialgewebe stets zur Qualitätssicherung untersucht wird. Die Untersuchung stellt sicher, dass die Entnahme des Gewebes, dessen Transport von der entnehmenden Institution zur kooperierenden Kryobank, die Aufbereitung und auch die Kryokonservierung bzw. das spätere Auftauen zu keiner relevanten Schädigung (Verlust von Stroma-, Follikel- und Oozyten) geführt haben. Genauso wird durch Hinzunahme des AMH-Wertes im Serum, ermittelt zum Zeitpunkt der Ovarialgewebentnahme

bzw. vor Beginn der zytotoxischen Therapie, sowie dem Alter ein mögliches direktes Ovarialkortexpotenzial (Anzahl vitaler Follikel, die potenzielle Eizellen beherbergen) einer jeden Patientin individuell bestimmt (Untersuchung der Fertilitätsreserve in den Transplantaten). Dies kann u. a. auch zur späteren Festlegung der Anzahl der zu transplantierenden Ovarialkortexstückchen bei einem vorzeitigem therapieinduziertem Ovarialversagen, erfolgreicher Genesung und Kinderwunsch hilfreich sein [2, 31, 40].

Methodisch werden dazu aus bei der Präparation anfallenden Randstückchen genormte 2-mm-Ovarialkortexbiopsiestanzen enzymatisch verdaut und einer speziellen Fluoreszenz- oder anderen Zellfärbung unterzogen, wodurch vitale Stromazellen, Follikel und Oozyten detektiert und die Keimzellen in ihrer Anzahl schlussendlich bestimmt und korreliert werden können [2, 31, 40].

Beratung und Behandlung: Status quo

Verbesserte Behandlungsmöglichkeiten führen zu verbesserten Überlebensraten (75–85 %) – sowohl in der pädiatrischen, adoleszenten als auch adulten Onkologie. Obwohl zum Erkrankungszeitpunkt primär die Genesung der onkologischen Erkrankung im Vordergrund steht, äußern 76–90 % der Langzeitüberlebenden einen Kinderwunsch bzw. stellen Kinder als eine bedeutende Komponente der Lebensqualität dar.

» Aktuell werden weniger als 8 % der Betroffenen fertilitätserhaltend beraten oder auch therapiert

Betrachtet man die geschätzt altersspezifischen Fallzahlen des GEKIDS zu deutschlandweiten onkologischen Erkrankungen in der weiblichen Altersgruppe 0–44 Jahre, dann belaufen sich diese pro Jahr auf etwa 16.000 onkologische Neuerkrankungen. Extrapoliert man die stattgehabten und durch den FertiPROTEKT e. V. (www.fertiprotekt.com) dokumentierten Beratungen in Fer-

tiPROTEKT-Zentren auf diese 16.000 Neuerkrankungen, dann werden aktuell nicht einmal 8% der betroffenen Patientinnen im präpubertären und fertilen Alter fertilitätserhaltend beraten oder auch therapiert, obwohl eine Indikation dafür vorliegt.

Fazit für die Praxis

- Das Ziel sollte eine vermehrte Aufmerksamkeit hinsichtlich des Fertilitätserhalts bei der Verwendung onkologischer Therapien sein, mit dem Ziel, nach Erhebung des individuellen Risikoprofils eine geeignete, leitliniengetreue Therapie zum Erhalt der Fruchtbarkeit anzubieten.
- Das Zeitfenster bis zum Start der onkologischen Therapie spielt in der Wahl des Therapieregimes eine ebenso wichtige Rolle wie das Alter, der allgemeine Gesundheitszustand und natürlich der Wahrscheinlichkeit für eine spätere Einschränkung des gonadalen Gewebes.
- Eine Schädigung der Ovarien wird beschrieben in direktem Zusammenhang mit dem Alter der Patientin, der Art der Therapie, Dosierung und Therapiedauer, wobei es eine Einteilung für ein geringes, mittleres oder hohes Risiko gibt.
- Es existieren mehrere Möglichkeiten, die Fertilität zu schützen. Diese können einzeln oder auch in der Kombination angeboten und vorgenommen werden und variieren zeitlich zwischen der Initiierung einer Therapie bis hin zu einer Behandlungszeit von ca. 2 Wochen.

Korrespondenzadresse

Dr. Jana Liebenthron, Ph.D.

UniCareD, Universitäre Cryobank für assistierte Reproduktionsmedizin und Fertilitätsprotektion am UnikID Düsseldorf, Universitäts-Frauenklinik
Moorenstraße 5, Gebäude 14.75,
40225 Düsseldorf, Deutschland
Jana.Liebenthron@unicared.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. J. Liebenthron, D.M. Baston-Büst, A.P. Bielfeld, T.N. Fehm, V.K. Kreuzer und J.-S. Krüssel geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine von den Autoren durchgeführten Studien an Menschen oder Tieren.

Literatur

1. Fertilitätserhaltung bei onkologischen Therapien. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin (DGRM) und Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU). Level S2k, AWMF Register Nr. 015/082, November 2017. <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/015-082.html>.
2. Beckmann MW, Lotz L, Toth B, Baston-Büst DM, Fehm T, Frambach T, Germeyer A, Goeckenjan M, Häberlin F, Henes M, Hirschhain J, Korell M, Krüssel JS, Müller A, Reinsberg J, Schwab R, Seitz S, Sütterlin M, van der Ven H, van der Ven K, Winkler-Crepaz K, Wimberger P, von Wolff M, Liebenthron J, Dittrich R (2018) Konzeptpapier zur Technik der Kryokonservierung, Entnahme und der Transplantation von Ovarialgewebe zum Fertilitätserhalt. *Geburtshilfe Frauenheilkd* (im Druck)
3. Eichenlaub-Ritter U (2012) Oocyte ageing and its cellular basis. *Int J Dev Biol* 56:841–852
4. Kurahashi H, Tsutsumi M, Nishiyama S, Kogo H, Inagaki H, Ohye T (2012) Molecular basis of maternal age-related increase in oocyte aneuploidy. *Congenit Anom (Kyoto)* 52:8–15
5. McCoy RC, Demko ZP, Ryan A, Banjevic M, Hill M, Sigurjonsson S et al (2015) Evidence of selection against complex mitotic-origin aneuploidy during preimplantation development. *Plos Genet*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005601>
6. TeVelde E, Pearson P, Broekmans F (1999) Female reproductive aging
7. Blumenauer V, Czeromin U, Fehr D, Fiedler K, Gnath C, Krüssel J-S, Kupka MS, Ott A, Tandler-Schneider A (2017) D-I-R Annual 2016—the German IVF-Registry. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 14(6). Modifizierter Nachdruck aus *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2017; 14(6):S275–305 (Sonderheft 1/2017)
8. Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs. Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO), Kommission Mamma. Version 2018.1. https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2018-03/Gesamt_deutsch/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2018.pdf. Zugegriffen: 24.09.2018
9. SOP: Vorgehen bei Kontakt mit einer Patientin/einem Patienten vor einer fertilitätsreduzierenden Therapie und nicht abgeschlossener Familienplanung. Zertifizierungsanforderungen der Deutschen Krebsgesellschaft: https://www.krebsgesellschaft.de/zertdokumente.html?file=files/dkg/deutsche-krebsgesellschaft/content/pdf/Zertifizierung/Checklisten%20und%20Algorithmen/SOP%20Fertilit%C3%A4tserhalt_161101.docx. Zugegriffen: 24.09.2018
10. Lambertini M, Del Mastro L, Pescio MC, Andersen CY, Azim HA Jr, Peccatori FA, Costa M, Revelli A, Salvagno F, Gennari A, Ubaldi FM, La Sala GB, De Stefano C, Wallace WH, Partridge AH, Anserini P (2016) Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting. *BMC Med* 14(1):1
11. von Wolff M, Dittrich R, Liebenthron J, Nawroth F, Schüring A, Bruckner T, Germeyer A (2015) Fertility-preservation counselling and treatment for medical reasons: data from a multinational network of over 5000 women. *Reprod Biomed Online* 31(5):605–612
12. Polat M, Bozdag G, Yarali H (2014) Best protocol for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive technologies: fact or opinion? *Semin Reprod Med* 32(4):262–271
13. von Wolff M et al (2009) Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase. *Fertil Steril* 92(4):1360–1365
14. Cakmak H, Katz A, Cedars MI, Rosen MP (2013) Effective method for emergency fertility preservation: random-start controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 100(6):1673–1680
15. Nawroth F (2015) Reproduktionsmedizin. Vitrifikation. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 75(09):883–886
16. Nawroth F (2015) *Social Freezing*. Springer, Berlin, Heidelberg
17. Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS, Wallace WH, Wang ET, Loren AW (2018) Fertility preservation in patients with cancer: aSCO clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 36(19):1994–2001
18. Martinez F, International Society for Fertility Preservation Working Group (2017) Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives. *Fertil Steril* 108(3):407–415.e11
19. von Wolff M, Germeyer A, Liebenthron J, Korell M, Nawroth F (2018) Practical recommendations for fertility preservation in women by the FertiPROTEKT network. Part II: fertility preservation techniques. *Arch Gynecol Obstet* 297(1):257–267
20. Lambertini M, Del Mastro L, Pescio MC, Andersen CY, Azim HA Jr, Peccatori FA, Costa M, Revelli A, Salvagno F, Gennari A, Ubaldi FM, La Sala GB, De Stefano C, Wallace WH, Partridge AH, Anserini P (2016) Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting. *Bmc Med* 14:1
21. Setti LPE, Porcu E, Patrizio P, Vigiilano V, de Luca R, d'Aloja P, Spoletini R, Scaravelli G (2014) Human oocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry data, 2007–2011. *Fertil Steril* 102(1):90–95.e2
22. Glujovsky D, Riestra B, Sueldo C, Fiszbajn G, Repping S, Nodar F, Papier S, Ciapponi A (2014) Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. *Cochrane Database Syst Rev*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010047.pub2>
23. Cobo A, García-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A, Remohí J (2016) Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril* 105(3):755–764.e8. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.027>
24. Coello A, Pellicer A, Cobo A (2018) Vitrification of human oocytes. *Minerva Ginecol* 70(4):415–423
25. Cil AP, Bang H, Oktay K (2013) Age-specific probability of live birth with oocyte cryopreservation: an

- individual patient data meta-analysis. *Fertil Steril* 100(2):492–499.e3
26. Solé M, Santaló J, Boada M, Clua E, Rodríguez I, Martínez F, Coroleu B, Barri PN, Veiga A (2013) How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Hum Reprod* 28(8):2087–2092
 27. Beckmann MW, Dittrich R, Lotz L, van der Ven K, van der Ven HH, Liebenthron J, Korell M, Frambach T, Sütterlin M, Schwab R, Seitz S, Müller A, von Wolff M, Häberlin F, Henes M, Winkler-Crepaz K, Krüssel JS, Germeyer A, Toth B (2018) Fertility protection: complications of surgery and results of removal and transplantation of ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 36(2):188–196
 28. van der Ven H, Liebenthron J, Beckmann M, Toth B, Korell M, Krüssel J, Frambach T, Kupka M, Hohl MK, Winkler-Crepaz K, Seitz S, Dogan A, Griesinger G, Häberlin F, Henes M, Schwab R, Sütterlin M, von Wolff M, Dittrich R, FertiPROTEKT network (2016) Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates. *Hum Reprod* 31(9):2031–2041
 29. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine (2014) Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion. *Fertil Steril* 101(5):1237–1243
 30. Bastings L, Liebenthron J, Westphal JR, Beerendonk CC, van der Ven H, Meinecke B, Montag M, Braat DD, Peek R (2014) Efficacy of ovarian tissue cryopreservation in a major European center. *J Assist Reprod Genet* 31(8):1003–1012
 31. Liebenthron J, Montag M, Reinsberg J, Köster M, Isachenko V, van der Ven K, van der Ven H, Krüssel JS, von Wolff M (2018) Overnight ovarian tissue transportation for centralized cryobanking – a feasible option. *Reprod Biomed Online* (Zur Publikation angenommen)
 32. Wallace WH, Smith AG, Kelsey TW et al (2014) Fertility preservation for girls and young women with cancer: population-based validation of criteria for ovarian tissue cryopreservation. *Lancet Oncol* 15:1129–1136
 33. Schüring A, Fehm T, Behringer K et al (2018) Practical recommendations for fertility preservation in women by the FertiPROTEKT network. Part I: Indications for fertility preservation. *Arch Gynecol Obstet* 297:241–255
 34. <https://fertiprotekt.com/ansprechpartner/>. Zugegriffen: 24.09.2018
 35. Sängler N, Jarisch A, Ochsendorf F, Klingebiel T, Liebenthron J, Kliesch S, von Wolff M (2018) Fertility Preservation in Prepubertal and Pubertal Children and Adolescents. *Klin Padiatr*. <https://doi.org/10.1055/s-0044-100396>. [Epub ahead of print]
 36. Tuppi M, Kehrloesser S, Coutandin DW, Rossi V, Luh LM, Strubel A, Hötte K, Hoffmeister M, Schäfer B, De Oliveira T, Greten F, Stelzer EHK, Knapp S, De Felici M, Behrends C, Klinger FG, Dötsch V (2018) Oocyte DNA damage quality control requires consecutive interplay of CHK2 and CK1 to activate p63. *Nat Struct Mol Biol* 25(3):261–269
 37. Dittrich R, Lotz L, Keck G, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, van der Ven H, Montag M (2012) Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. *Fertil Steril* 97:387–390
 38. Rosendahl M, Timmermans Wielenga V, Nedergaard L, Kristensen SG, Ernst E, Rasmussen PE, Anderson M, Schmidt KT, Andersen CY (2011) Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation: no evidence of malignant cell contamination in ovarian tissue from patients with breast cancer. *Fertil Steril* 95:2158–2161
 39. Bastings L, Westphal JR, Beerendonk CC, Bekkers RL, Zusterzeel PL, Hendriks JC, Braat DD, Peek R (2016) Clinically applied procedures for human ovarian tissue cryopreservation result in different levels of efficacy and efficiency. *J Assist Reprod Genet* 33(12):1605–1614
 40. Liebenthron J, Reinsberg J, Fimmers R, Sängler N, van der Ven K, van der Ven H, Stute P, von Wolff M (2018) Determination of ovarian primordial/primary follicle density in 1002 ovarian tissue biopsies and AMH concentrations in 824 serum-samples for a better reflection of the ovarian reserve. *Reproduction* 33(suppl 1):i386. https://doi.org/10.1093/humrep/33.Supplement_1.1