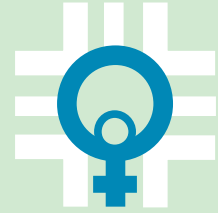


Geburtshilfe und Frauenheilkunde



Executive Board

M. Kaufmann, Frankfurt a. M. –
verantwortlicher Herausgeber
W. Rath, Aachen
D. Wallwiener, Tübingen

R. Kreienberg, Ulm – Präsident DGGG
W. Neunteufel, Dornbirn – Präsident OEGGG

Herausgeber

J. Baltzer, Krefeld – Aktuell referiert
M. W. Beckmann, Erlangen – Refresher,
Translationale Forschung
G. Debus, Dachau
R. Gätje, Frankfurt
W. Holzgreve, Basel
P. Husslein, Wien
W. Jonat, Kiel
O. Ortman, Regensburg – Übersichts-
arbeiten
B. Schauf, Bamberg – Aktuell diskutiert
K. Vetter, Berlin

Beirat

P. Dall, Lüneburg
K. Diedrich, Lübeck
J. Dietl, Würzburg
J. W. Dudenhausen, Berlin
K. Friese, München
U. Gembruch, Bonn
B. Gerber, Rostock
G. Gitsch, Freiburg
E.-M. Grischke, Tübingen
K. Hecher, Hamburg
M. Höckel, Leipzig
F. Jänicke, Hamburg
L. Kiesel, Münster
H. Kölbl, Mainz
M. Neises, Hannover
U. Peschers, München
A. Rieber, München
R. Schmutzler, Köln
A. Schneider, Berlin
H. Schneider, Bern
Ch. Sohn, Heidelberg
Th. Strowitzki, Heidelberg

Rechtsfragen

K. Ulsenheimer, München

Junges Forum

G. Debus, Dachau
C. Latruch, Regensburg
K. Riehm, Köln

Begründet von

Carl Kaufmann
und Ludwig Seitz

Weitergeführt von

Josef Zander †
Kurt Holzmann
Meinert Breckwoldt

Vereinigt mit:

**Zentralblatt für Gynäkologie
(J. A. Barth in Georg Thieme Verlag KG)**

Wissenschaftliches Organ der Deutschen
Gesellschaft für Gynäkologie und Geburts-
hilfe · DGGG und der Österreichischen
Gesellschaft für Gynäkologie und Geburts-
hilfe · OEGGG

Sonderdruck

70. Jahrgang 2010

© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York

Nachdruck nur mit
Genehmigung des Verlages

**Indexed in Science Citation Index
Impact Factor: 0,502**

Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
D-70469 Stuttgart
Postfach 30 11 20
D-70451 Stuttgart

www.thieme.de/fz/gebfra

Genexpression und Morphologie der Follikel nach konventionellem Einfrieren und Vitrifikation von humanem Ovarialgewebe

Gene-expression and Morphology of Follicles After Conventional Freezing and Vitrification of Human Ovarian Tissue

Autoren

V. Isachenko¹, E. Isachenko¹, F. Nawroth², I. Wiegratz³, M. Kaufmann³, I. Lapidus⁴, K. Hancke¹, R. Kreienberg¹

Institute

¹ Universitätsfrauenklinik Ulm, Ulm
² Amedes Gruppe, Fertility Center Hamburg, Hamburg
³ Universitätsfrauenklinik Frankfurt am Main, Frankfurt
⁴ Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin

Schlüsselwörter

- Ovarialgewebe
- Kryokonservierung
- Vitrifikation
- Follikel
- Genexpression

Key words

- ovarian tissue
- freezing
- vitrification
- follicle
- gene expression

Zusammenfassung

Fragestellung: Bei der Kryokonservierung, dem wichtigsten Verfahren für die Lagerung von Ovarialgewebe, können 2 Methoden unterschieden werden: das konventionelle („langsame“) Einfrieren und die Vitrifikation (direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff). In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Effektivität der Vitrifikation im Vergleich zum konventionellen Einfrieren von menschlichen Eizellen und Embryonen höher ist. Allerdings sind die Erfahrungen mit beiden Methoden für humanes Ovarialgewebe begrenzt. Das Ziel dieser Studie war daher der Vergleich des konventionellen Einfrierens mit der Vitrifikation bei menschlichem Ovarialgewebe.

Material und Methodik: Ovarialgewebefragmente von 5 Patientinnen wurden innerhalb von 20 Minuten bei 32 bis 34 °C in das Labor transportiert. Die Fragmente wurde in kleinere Stücke aufgeteilt (1 × 1 bis 1,5 × 0,7 bis 1 mm) und zufällig in die 3 folgenden Gruppen verteilt: Gruppe 1: Kontrollgruppe (natives Gewebe), Gruppe 2: Vitrifikation/Erwärmung, Gruppe 3: konventionelles Einfrieren/Auftauen. Alle Fragmente wurden in vitro für 12 Tage kultiviert. Die Lebensfähigkeit des Gewebes wurde durch die Entwicklung der Follikel und die GAPDH-Genexpression nach der Kultivierung bewertet.

Ergebnisse: Für die Gruppen 1, 2 und 3 waren 93, 74 und 78% der Follikel morphologisch normal. Die molekularbiologische Analyse zeigte jedoch, dass die Intensität der GAPDH-Genexpression im Gewebe nach konventionellem Einfrieren im Gegensatz zur Vitrifikation stark erhöht war.

Schlussfolgerung: Somit ist anzunehmen, dass für die Kryokonservierung von humanem Ovarialgewebe das konventionelle Einfrieren besser geeignet ist als die Vitrifikation.

Abstract

Purpose: Cryopreservation, the most important stage of the cryobanking of ovarian tissue, can be carried out using one of two methods: conventional (“slow”) freezing, and vitrification (direct and immediate immersion into liquid nitrogen). For human oocytes and embryos vitrification is more effective compared to conventional freezing. However, these comparative data are limited for human ovarian tissue. The aim of this study was to compare conventional freezing of ovarian tissue with vitrification.

Material and Methods: Ovarian tissue from 5 patients was transported to the laboratory within 20 min at 32 to 34 °C, divided into smaller pieces (1 × 1 to 1,5 × 0,7 to 1 mm) and randomly distributed into three groups: Group 1: control (fresh tissue), group 2: pieces after vitrification/warming, Group 3: pieces after conventional freezing/thawing. All pieces were cultured in vitro for 12 days. The viability of the tissue was evaluated by the development of the follicles and GAPDH gene expression after in vitro culture. Results: 93, 74 and 78% of the follicles of groups 1, 2 or 3 were morphologically normal. Molecular analysis showed that the intensity of GAPDH gene expression in the tissue after conventional freezing was greatly increased compared to after vitrification.

Conclusion: It was concluded that for the cryopreservation of human ovarian tissue conventional freezing is more suitable than vitrification.

eingereicht 5. 2. 2010
revidiert 5. 2. 2010
akzeptiert 29. 3. 2010

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1250075>
 Geburtsh Frauenheilk 2010; 70: 561–567 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · ISSN 0016-5751

Korrespondenzadresse

Vladimir Isachenko
 Universitätsfrauenklinik Ulm
 Prittwitzstraße 43
 89075 Ulm
 v.isachenko@yahoo.com

Einleitung

Im Jahr 2008 wurde allein in den USA insgesamt bei etwa 692 000 Frauen ein Malignom diagnostiziert [1]. Aufgrund der zunehmenden Wirksamkeit der onkologischen Behandlungen [1,2] und der guten Langzeitprognose haben junge Frauen nach abgeschlossener Therapie häufig noch Kinderwunsch. Da eine Chemotherapie – je nach gewähltem Therapieschema – allerdings gonadotoxisch sein kann, ist evtl. mit einem hohen Verlust der ovariellen Reserve zu rechnen. Daraus resultiert häufig die Frage, ob es ovarerhaltende Maßnahmen gibt. Dazu gehört die Kryokonservierung von Ovarialgewebe vor der onkologischen Therapie, weshalb die Kryokonservierung von menschlichem Ovarialgewebe aktuell zu den wichtigsten Forschungsprojekten in der Reproduktionsmedizin gehört.

Es gibt bereits Publikationen über die Wiederherstellung der Ovarialfunktion nach Re-Transplantation von ovariellem Kortex bei Patienten mit vorzeitiger Ovarialinsuffizienz (POF) nach einer stattgehabten Krebsbehandlung [3–12]. Diese Studien weisen darauf hin, dass nach dem Auftauen das kryokonservierte Ovarialgewebe sowohl für therapeutische (Behandlung der menopausalen Symptome) als auch reproduktive Zwecke benutzt werden kann [13].

Die Geburt nach Re-Transplantation von kryokonserviertem Ovarialgewebe wurde Realität [14–16].

Die Kryokonservierung von Ovarialgewebe kann aktuell mit 1 von 2 Methoden realisiert werden: durch konventionelles, das sog. „langsame“ Einfrieren oder durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff, die sog. Vitrifikation. Bisherige Publikationen über die Kryokonservierung von Ovarialgewebe beim Säugetier hinsichtlich des Vergleichs von Vitrifikation und konventionellem Einfrieren sind begrenzt und zeigten differente Ergebnisse. Es hat sich zum Beispiel gezeigt, dass für das humane Ovarialgewebe das konventionelle Einfrieren im Vergleich mit der Vitrifikation bessere Voraussetzungen für die Kryokonservierung dieser Art von Zellen bietet [17].

Vergleichende Untersuchungen zur Vitrifikation und dem konventionellen Einfrieren bei humanem Ovarialgewebe wurden durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass das Einfrieren besser als die Vitrifikation ist [18].

Andere Autoren berichten, dass es keine Unterschiede zwischen konventionellem Einfrieren und Vitrifikation in der Qualität der Follikel und der hormonellen Aktivität gibt [19].

Die Lebensfähigkeit des Gewebes nach Kryokonservierung kann auch auf molekularbiologischer Ebene bewertet werden. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Housekeeping-Gen und spielt eine entscheidende Rolle bei der Glykolyse und in mehreren anderen metabolischen und nicht-metabolischen Prozessen [20]. Analysen der GAPDH-Genexpressionsintensität (anhand von Schwankungen in der intakten RNA-Menge) können als ein Qualitätskriterium nach experimenteller Behandlung von Gewebe (in unserem Fall der Kryokonservierung) genutzt werden [21].

Das primäre Ziel dieser Studie war, die Vitrifikation mit dem konventionellen Einfrieren von humanem Ovarialgewebe im Bereich der Entwicklung der Follikel zu vergleichen. Das 2. Ziel war, die GAPDH-Genexpression im Rahmen beider Methoden zu vergleichen.

Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA) verwendet.

Sammlung, Präparation und Verteilung von Ovarialgewebe in den Gruppen

Im Rahmen eines von der Ethikkommission genehmigten Studienprotokolls stimmten 5 Patientinnen im Alter von 19 bis 31 Jahren ($24,2 \pm 3,7$) der Durchführung der Testversuche zu. Nach diesem Protokoll werden 10% des Ovarialgewebes für die patientenorientierte Forschung verwendet.

Das native Ovarialgewebe wurde innerhalb von 20 Minuten bei 32 bis 34 °C in einer speziellen Lösung (OvarStore™, Gynemed GmbH, Lensahn, Deutschland) in das Labor transportiert. Der Kortex der Ovarialgewebefragmente wurde mit Pinzette und Skalpell Nr. 22 in einem speziell für diesen Zweck entwickelten Medium (OvarStore™, Gynemed) vom Stroma getrennt und in kleine Stücke ($1 \times 1 \times 0,7$ mm) geschnitten. Ein kleiner Teil dieses Ovarialgewebes wurde bei jeder Patientin für die routinemäßige Histologie und Follikelzählung verwendet und sofort in Bouin'scher Lösung fixiert. Die weiteren Fragmente des Ovarialgewebes wurden zufällig auf die experimentellen Gruppen verteilt: nicht behandelte, native Kontrolle (sofort nach dem Transport ins Labor, n = 15) – Gruppe 1, in „Vitrifikation“ – Gruppe 2 (n = 15) und in „Einfrieren“ – Gruppe 3 (n = 15).

Vitrifikation

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden 18 Vitrifikationsprotokolle veröffentlicht. Von diesen haben wir das Protokoll nach Keros et al. [22] ausgewählt.

Die Vitrifikationslösung wurde auf der Basis von Salt-Hanks'-Lösung (HBSS) (Invitrogen Corporation, Scotland, UK) mit 10 mg/ml Serumalbumin (HSA, Vitrolife Inc., Englewood, Colorado, USA) hergestellt. Sie beinhaltet DMSO, Propylenglykol (PG) und Ethylenglykol (EG). Die Ovarialgewebestücke (OS) wurden nach 5-minütigem Waschen in der Basislösung für 10 min in 0,35 M DMSO + 0,38 M PG + 0,38 M EG bei Raumtemperatur gegeben, anschließend in 0,7 M DMSO + 0,75 M PG + 0,75 M EG ebenfalls für 10 min bei Raumtemperatur und danach in 1,4 M DMSO + 1,5 M PG + 5 M EG + 10% (g/v) Polyvinylpyrrolidon für 5 min bei +4 °C gebracht. Nach der Saturation mit Kryoprotektoren wurden die OS mit minimalem Volumen der Vitrifikationslösung auf die Flächen von 0,5 ml Kryo-Straws (IMV-Technologies, L'Aigle, Frankreich) transferiert und direkt in flüssigen Stickstoff eingetaucht [22]. Für das Auftauen und Entfernen der Kryoprotektiva war die Menge der verwendeten Lösungen in allen Protokollen 1 ml für jeden Schritt. Die Erwärmung und die Entfernung von Kryoprotektiva wurde in 4 Schritten durchgeführt. Zuerst wurden Kryo-Straws aus dem flüssigen Stickstoff entfernt und direkt in die 1., 37 °C warme Lösung von 0,5 M Saccharose eingetaucht. Dann wurden die OS in zwei 5-min-Schritten in die 2. (0,25 M Saccharose) und 3. Lösung (0,125 M Saccharose) transferiert.

Konventionelles Einfrieren

Das Protokoll für das konventionelle Einfrieren basiert, abgesehen von einigen Änderungen, auf dem Protokoll von Gosden et al. [8]. Standard-1-ml-Kryo-Straws (MTG GmbH, Bruckberg, Deutschland) wurden mit 1 ml Einfrierlösung OvarStore™ (Gynemed) mit L-15-Medium (Leibovitz) mit L-Glutamin + 6% DMSO + 6% EG + 0,15 M Saccharose + 10% Serumersatz (DSS, Irvine Sci., St. Ana, CA, USA) versetzt und die OS in die Kryo-Straws ver-

bracht. Danach wurden die Kryo-Straws im Einfriergerät CTE 2104 (Cryo-Technik-Erlangen, Höchststadt, Deutschland) abgekühlt. Das Einfrierprogramm war wie folgt: (1) die Starttemperatur war 22°C, (2) Abkühlung von 22°C bis 4°C mit einer Geschwindigkeit von -5°C/min, (3) Abkühlung von 4°C bis -1°C mit einer Geschwindigkeit von -1°C/min, (4) Autoseeding trat bei -7°C ein, (5) Abkühlung von -7°C bis -34°C mit Geschwindigkeit von -0,3°C/min und schließlich Eintauchen der Kryo-Straws in flüssigen Stickstoff.

Für das Auftauen wurden die Kryo-Straws zuerst für 10 s bei Raumtemperatur stehengelassen und danach in ein kochendes Wasserbad (100°C) für 20 s eingetaucht. Die Zeit der Exposition der Kryo-Straws im kochenden Wasser wurde visuell durch das Vorhandensein von Eis kontrolliert: sobald das Eis nur ~1 mm Spitze hatte, wurde der Straw aus dem kochenden Wasser entfernt. Die endgültige Temperatur der Einfrierlösung war nach dem Entfernen des Kryo-Straws aus dem 100°C-Wasserbad zwischen 4 und 10°C. Nach dem Auftauen wurden die OS innerhalb von 5–7 Sekunden in einen 100-ml-Probencontainer (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit 10 ml Lösung für die Entfernung der Kryoprotektiva (0,5 M Saccharose + 10% DSS + L-15-Medium) (Gynemed) übertragen. Die Entfernung der Kryoprotektiva erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Saturation von Ethylenglykol (Abb. 1 aus Isachenko et al. [23]). Der Container wurde auf dem Schüttler ständig in Bewegung gehalten (200 osc/min für 15 min bei Raumtemperatur). Die mehrstufige Rehydrierung der OS wurde mithilfe der gleichen Methodik [23] für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Drop-Rehydrierung benutzten wir 50 ml Kulturlösung (L-15-Medium + 10% DSS) (Gynemed GmbH) in 50-ml-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Diese Methode erfordert die langsame Zugabe (Drop) einer Kulturlösung zur Saccharoselösung mit den OS. Die endgültige Saccharosekonzentration betrug 0,06 M. Schließlich wurden die OS 3-mal in Kulturmedium 10 min lang gewaschen. Nach Erwärmung und Waschen wurden die OS in die In-vitro-Kultur überführt.

In-vitro-Kultur

Das Gewebe der Kontrollgruppe 1 wurde sofort nach der Ankunft der Transportbox und das Gewebe der experimentellen Gruppen nach Kryokonservierung (Gruppen 2 und 3) in 200-ml-Kulturflaschen (Cellstar™, Greiner Bio-One GmbH) mit 30 ml AIM-V™-Medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) überführt. Die In-vitro-Kultur erfolgte während 16 Tagen bei 37°C in 5% CO₂ mit einer Drehung-Schüttle (mit 75 Schwingungen/Minute). Wir haben die Überlebensrate des Gewebes mittels der Entwicklung der Follikel und die GAPDH-Genexpression beurteilt.

Histologische Untersuchung

Für die histologische Untersuchung wurden die in Bouin-Lösung exponierten OS in Paraffin eingebettet, seriell geschnitten in 5 µm, gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin und unter dem Mikroskop (×400) analysiert. Die Zahl der lebensfähigen und beschädigten Follikel wurde ermittelt.

Um die doppelte Auszählung der gleichen Follikel zu vermeiden, wurden nur diejenigen mit auf dem Schnitt sichtbarem Eizellkern gezählt.

Die Follikelnormalität wurde unter Berücksichtigung der folgenden beschriebenen Parameter bewertet. Zwei Typen von Follikeln wurden ausgewertet: (1) primordiale Follikel, die wie Vesikeloozyten mit einer Schicht von flachen Kumuluszellen aussehen und (2) primäre Follikel, die wie primordiale Follikel aussehen,

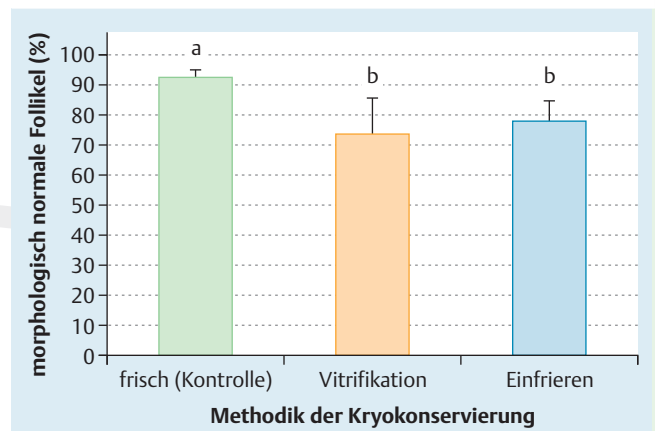


Abb. 1 Qualität der Follikel nach Vitrifikation und konventionellem Einfrieren des Ovarialgewebes. Verschiedene hochgestellte Buchstaben (Superscripts) zeigen statistisch signifikante Differenz ($p < 0,05$).

aber zusätzlich 1–2 Lagen von Granulosazellen aufweisen. Die Qualität der Follikel wurde von 1 bis 3 bewertet. Follikel des 1. Grades sind kugelförmig, mit regelmäßig verteilten Granulosazellen, mit homogenem Zytoplasma und leicht granuliertem Kern mit kondensiertem Chromatin in Form von dichter, sphärischer Struktur in dessen Zentrum. Follikel des 2. Grades haben die gleichen Besonderheiten, außer dass die Granulosazellen unregelmäßig verteilt sind; diese Zellen können flach sein, sodass das kondensierte Chromatin im Zytoplasma nicht erkennbar ist. Follikel des 3. Grades haben eine teilweise oder vollständig unterbrochene Lage von Granulosazellen oder Zytoplasma und pyknotische Kerne. Follikel des 1. und 2. Grades wurden als normal und diejenigen von Grad 3 als anormal bezeichnet.

GAPDH-Genexpression

Die RNA-Vorbereitung, reverse Transkription, PCR und Real-Time-PCR wurden mit den folgenden Methoden durchgeführt: Die Proben wurden mechanisch zerstört und homogenisiert, die Gesamt-RNA wurde mit GeneElute Gesamt-RNA-Purifikation-Kit extrahiert. Die genomische DNA wurde mit DNase-I Treatment (Sigma) nach dem Herstellerprotokoll entfernt. Mit einem Mikrogramm jeder RNA wurde eine reverse Transkription mit Benutzung zufälliger Hexamere und Superscript II reversen Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. PCR-Reaktionen enthielten 1 × PCR RedTaq Ready Master Mix, 500 nm jedes GAPDH-Primer (Forward: '5'-ggatcgtggaaggactcatgac-3'; Reverse: 5'-atgccagtggagctcccgttcagc-3') und Vorlage in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Das thermische Profil für die Verstärkung war 95°C für 5 min, gefolgt von 35 Zyklen von 95°C für 15 s, 58°C für 20 s, und 72°C für 40 s. Die PCR-Produkte wurden mit Gelelektrophorese (7,5% Acrylamide oder 3% Agarose) visualisiert. Die Resultate wurden mit RT-PCR-Ansatz unter Verwendung von SYBR Grün-Assay in einem 96-Well-Platten-Format mit einer Bio-Rad iCycler validiert. Die Reaktionen enthielten 1 × SYBR Mastermix (Qiagen, Venlo, Holland), 300 nM eines jeden Primers und 10 nM Kalibrierung Dye Vorlage in einem Gesamtvolumen von 15 µl. Das thermische Profil für die Amplifikation war 95°C für 8 min, gefolgt von 50 Zyklen von 95°C für 15 s, 58°C für 20 s, und 72°C für 30 s. Am Ende der Amplifikationsphase wurden Schmelzanalysen durchgeführt und eine Kurve wurde auf die Produkte gebildet.

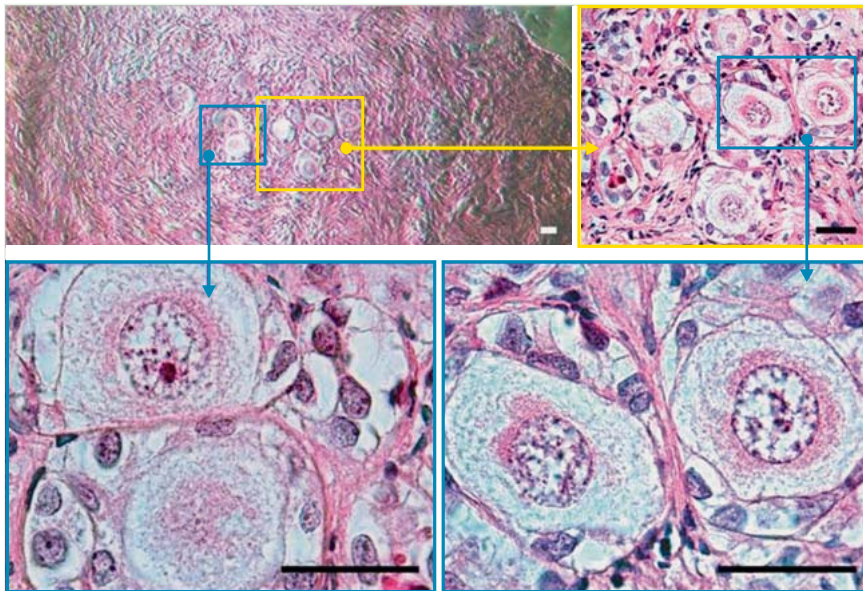


Abb. 2 Mikroskopische Fotos von Ovarialgewebestücken (OS) von Patientin B. nach Vitrifikation [22] und In-vitro-Kultur [23]. Bar = 20 μ m.

Statistische Analyse

Die Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Entwicklung der Follikel wurden mittels Varianzanalysen (ANOVA) festgestellt. Das Niveau der statistischen Signifikanz lag bei $p < 0,05$.

Ergebnisse

Die Auftaugeschwindigkeit von eingefrorenem und vitrifiziertem Ovarialgewebe im Temperaturintervall von -150 bis -4 °C betrug ~ 150 °C/min.

Histologische Untersuchung

Nur Primär- und primordiale Follikel wurden als lebensfähig bzw. gesund beurteilt. Alle präantralen und die antralen Follikel waren nach Kryokonservierung und In-vitro-Kultur degeneriert. Wir haben diese Follikel nicht gezählt. Die mittlere Dichte von primordiale Follikeln pro 1 mm^3 für die Gruppe 1 (frische in vitro

kultivierte OS) war $10,1\% \pm 2,0$, für Gruppe 2: $13,1 \pm 4,3$ und für die Gruppe 3: $12,7 \pm 3,6$ ($p > 0,1$).

Es wurde festgestellt, dass 93, 74 und 78% Follikel der Gruppen 1, 2 und 3 morphologisch unauffällig waren ($p_{1-2, 3} < 0,05$; $p_{2-3} > 0,1$) (Abb. 1, 2 und 3). Die restlichen Follikel befanden sich in progressiven Stadien der Degeneration.

GAPDH-Genexpression

Nach der Kryokonservierung und In-vitro-Kultur wurden die OS für die RNA-Purifikation verwendet. Die GAPDH-Expression wurde durch die konventionelle RT-PCR analysiert (Abb. 4). Es zeigte sich ein drastisch reduzierter Level der GAPDH-Genexpression in den OS nach Vitrifikation (Liniengruppe A) im Vergleich zur Gruppe 3 (konventionelles Einfrieren, Liniengruppe B).

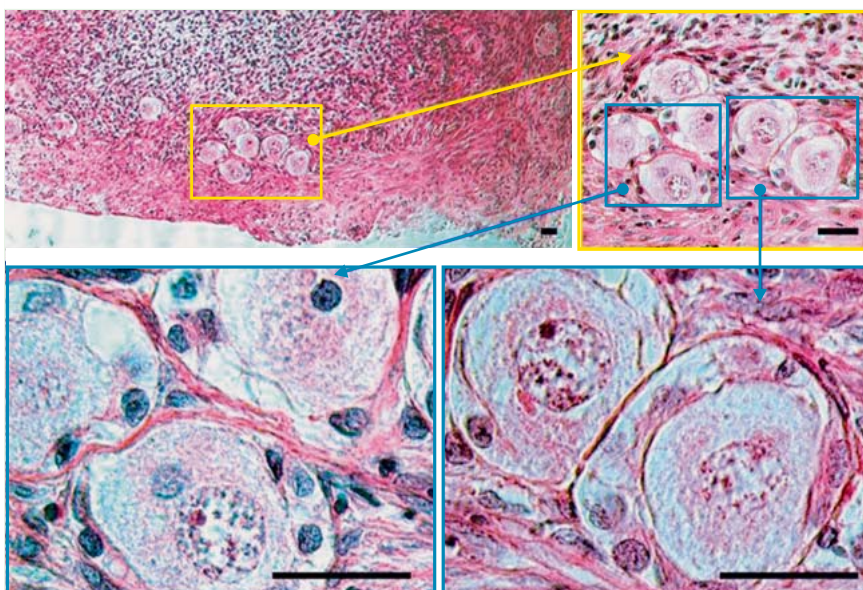


Abb. 3 Mikroskopische Fotos von Ovarialgewebestücken (OS) von der gleichen Patientin B. nach konventionellem Einfrieren [18, 36] und In-vitro-Kultur [23]. Bar = 20 μ m.

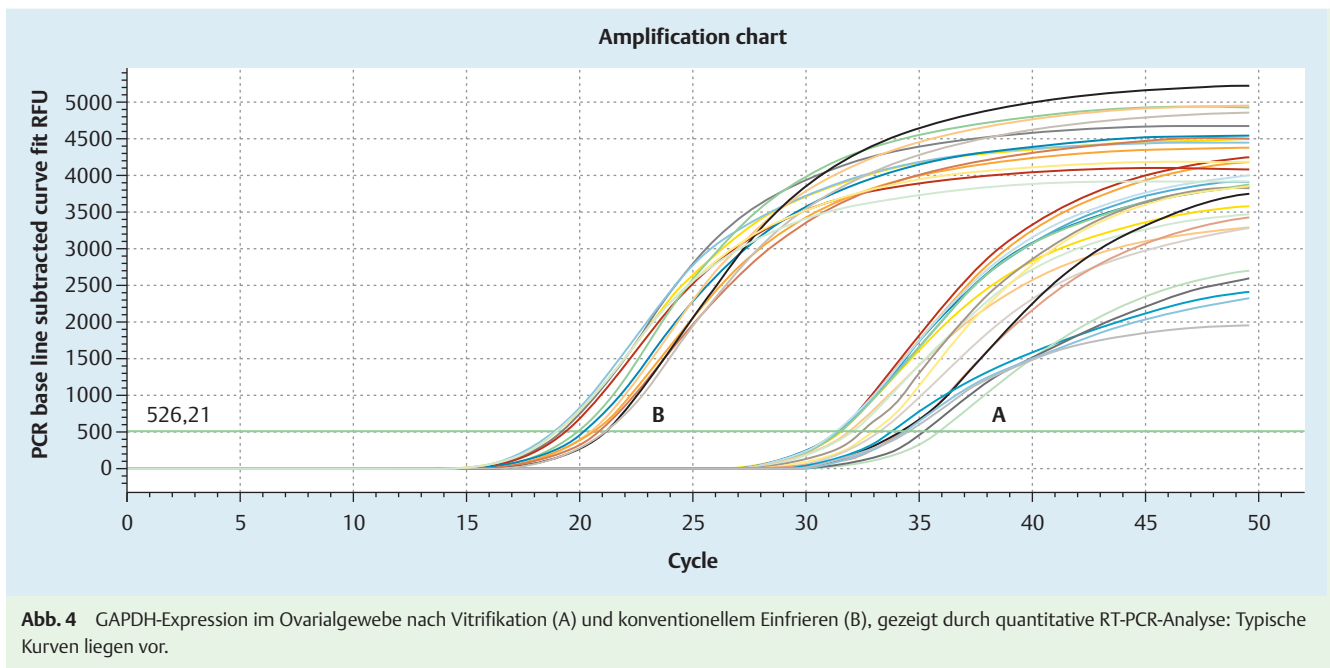


Abb. 4 GAPDH-Expression im Ovarialgewebe nach Vitrifikation (A) und konventionellem Einfrieren (B), gezeigt durch quantitative RT-PCR-Analyse: Typische Kurven liegen vor.

Diskussion

Eines der wichtigen Ziele der Ovargewebeentnahme und deren Kryobanking ist eine Wiederherstellung der reproduktiven Funktion nach einer onkologischen Behandlung. Die Methoden der Zellkryokonservierung lassen sich in 2 Gruppen unterteilen: traditionelles („langsames“) Einfrieren und Kryokonservierung durch das direkte Eintauchen des Gewebes in flüssigen Stickstoff (sog. Vitrifikation).

Bisherige Publikationen zeigten, dass es möglich ist, erfolgreich humanes Ovarialgewebe mit penetrierenden Kryoprotektiva ohne Disaccharide zu vitrifizieren [24]. Es zeigte sich, dass die langsame Kryokonservierung dabei besser als die Vitrifikation ist [18].

Später wurde ein neues Protokoll für die humane Ovarialgewebetrififikation eingeführt [25]. Verschiedene kryoprotektive Lösungen und die Art der Kühlung/Erwärmung wurden getestet. Die besten Ergebnisse wurden für das Protokoll mit 2,62 M DMSO + 2,6 M Acetamid + 1,31 M Propylenglykol + 0,0075 M Polyethylenglykol in Kombination mit direktem Eintauchen der Ovarialgewebefragmente (ohne Hülle) in flüssigen Stickstoff erzielt [25]. Die vergleichenden Untersuchungen (Einfrieren vs. Vitrifikation) wurden auch an humanem, Rinder- und Schweineovarialgewebe durchgeführt [17]. In dieser Studie verwendeten die Autoren 2 Vitrifikationsprotokolle. Im 1. Protokoll [26] wurden OS in 35% Ethylenglykol + 5% Polyvinylpyrrolidon + 0,4 M Trehalose durch das Abkühlen des Gewebes in kleinen Mengen der Vitrifikationslösung, spätere Erwärmung auf 37 °C und stufenweiser Entfernung der Kryoprotektiva in 0,3 M Trehalose kryokonserviert. Im 2. Protokoll [27] wurden die Gewebestücke in 22% Ethylenglykol + 22% DMSO mit Entfernung der Kryoprotektiva in 0,25 M Saccharose nach Erwärmung mit 37 °C vitrifiziert. Die OS wurden auch konventionell mit 1,5 M DMSO oder 1,5 M Propylenglykol unter stufenweiser Entfernung der Kryoprotektiva in DMSO oder Propylenglykol [27] eingefroren. Unmittelbar nach Erwärmung/Auftauen wurden die Ovarialgewebefragmente histologisch untersucht und ausgewertet. Die Autoren dieser Studie haben fest-

gestellt, dass einige Besonderheiten der Kryostabilität der Follikel von Art und Typ der Kryoprotektoren abhängig sind. Allerdings ist die zentrale Schlussfolgerung folgende: Konventionelles Einfrieren ist die bessere Methode für die Kryokonservierung von Ovarialgewebe im Vergleich zur Vitrifikation [17]. Dies entspricht unseren Ergebnissen und erlaubt somit die gleiche Schlussfolgerung: Das konventionelle Einfrieren ist im Vergleich zur Vitrifikation effektiver für die Kryokonservierung von Ovarialgewebe.

Dagegen stehen die Ergebnisse von Rahimi et al. [28], die das konventionelle Einfrieren mit der Vitrifikation von humanem Ovarialgewebe nach Transplantation auf SCID-Mäuse verglichen. Die Prüfung der nekrotisierenden Bereiche im Ovarialgewebe nach Kryokonservierung mit diesen beiden Methoden und nachfolgende Transplantation auf SCID-Mäuse zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen konventionellem Einfrieren und Vitrifikation.

Die Arbeitsgruppe von Li et al. [19] verglich die beiden Methoden (konventionelles Einfrieren und Vitrifikation) von menschlichem Ovarialgewebe mit nachfolgender langfristiger In-vitro-Kultur von Gewebe nach dem Auftauen/Erwärmung. Die Gewebestreifen wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Streifen aus der 1. Gruppe wurden in 2,5 M (15,6%) DMSO + 2,5 M (15,2%) Propylenglykol + 0,2 M Saccharose durch direktes Eintauchen in den flüssigen Stickstoff vitrifiziert. Auftauen der vitrifizierten Streifen wurde durch direktes Eintauchen der vitrifizierten Tropfen mit Gewebe in 0,5 M Saccharose bei 38 °C mit stufiger Rehydrierung der Streifen in 0,5, 0,25 und 0,125 M Saccharose durchgeführt. Die konventionell eingefrorenen Streifen der 2. Gruppe wurden in 1,5 M (11,7%) DMSO + 0,1 M Saccharose bei 37 °C aufgetaut und schrittweise in 0,25 und 0,125 M Saccharose rehydriert. Nach 2 Wochen der In-vitro-Kultur zeigten beide Gruppen keinen Unterschied hinsichtlich des Anteils der normalen Follikel [19]. Die durchschnittlichen Konzentrationen von 17 β -Östradiol und Progesteron waren bei der Vitrifikation und dem konventionellen Einfrieren statistisch gleich. Die Autoren glauben, dass die Vitrifikation durch direktes Eintauchen von Gewebe in flüssigen Stickstoff eine effektivere Methode als das konventionelle Einfrieren ist.

Erst kürzlich veröffentlichten Keros et al. [22] vergleichende Untersuchungen von konventionellem Einfrieren und Vitrifikation von menschlichem Ovarialgewebe mit nachfolgender langfristiger In-vitro-Kultur von Gewebe nach Auftauen/Erwärmung. Kryoprotektiva für das langsame Einfrieren waren Propylenglykol mit Saccharose und Ethylenglykol mit Saccharose. Für die Vitrifikation wurde das Gewebe für 5 oder 10 Minuten in 3 Lösungen inkubiert, die eine Kombination von Dimethylsulfoxid (DMSO), Propylenglykol, Ethylenglykol und Polyvinylpyrrolidon darstellten.

Nach Kryokonservierung mit dem konventionellen Einfrieren und Vitrifikation war die Qualität von Ovarialgewebe grundsätzlich gut. Das Ovarialstroma war nach Vitrifikation morphologisch deutlich besser als nach dem langsamen Einfrieren. Die Follikel waren nach der Kryokonservierung aller Methoden gut erhalten. In unseren Versuchen haben wir genau dieses Protokoll der Arbeitsgruppe von Keros et al. [22] für unsere Experimente verwendet.

Wir glauben aber, dass bei ähnlicher Effektivität von konventionellem Einfrieren und Vitrifikation der Hauptnachteil der Vitrifikation im direkten Kontakt von Gewebe mit dem flüssigen Stickstoff besteht.

In unseren Untersuchungen wurde die Vitrifikationsmethodik durch direkte Kühlung der Zellen in flüssigem Stickstoff getestet. Der direkte Kontakt zwischen flüssigem Stickstoff und dem Gewebe konnte nicht vermieden werden. Wir postulieren, dass jede Technologie, die für die Reproduktionsmedizin verwendet wird, den vollen Schutz der biologischen Objekte vor Mikroorganismen garantieren muss [29,30]. Es ist aber so, dass flüssiger Stickstoff, der für die Lagerung der gefrorenen Materialien verwendet wird, eine Quelle der Kontamination durch Mikroorganismen sein könnte [30,31]. Auch die Filtration oder UV-Bestrahlung können keinen sterilen flüssigen Stickstoff garantieren. Zum Beispiel wurde eine Kontamination des Blutes mit Hepatitisviren während der Zeit der Lagerung der Proben in flüssigem Stickstoff beobachtet [32]. Verschiedene Arten von Viren haben sehr kryostabile Strukturen. Beim Hepatitisvirus [32], Papovavirus [33], Stomatitisvirus [34] und Herpesvirus [35] wurde eine Erhöhung der Virulenz bei der Lagerung in flüssigem Stickstoff beobachtet. Demnach stützt sich die von uns geäußerte Präferenz für das konventionelle Einfrieren nicht nur auf statistisch signifikante Viabilitätsunterschiede nach Vitrifikation und konventionellem Einfrieren. Unsere Schlussfolgerung basiert auf der Beurteilung unter Einbezug praktisch und hygienisch orientierter Gründe. In der Tat ist es aber so, dass die Vitrifikation technologisch viel einfacher ist, der Kryozyklus braucht weniger Zeit, und sie ist billiger als das konventionelle Verfahren zum Einfrieren.

Allerdings ist das zentrale Ziel der Kryotechnologie die Erhaltung der Follikel und nicht die Einfachheit und Erleichterung der Arbeitsbedingungen der durchführenden Mitarbeiter. Obwohl die Ergebnisse unserer Untersuchung zwar gezeigt haben, dass die Vitrifikation die Lagerung von lebensfähigen Follikeln nach Erwärmung garantieren kann, ist das konventionelle Einfrieren dennoch effektiver.

Schlussfolgerung

Die Kryokonservierung von menschlichem Ovarialgewebe ist mit dem konventionellen langsamen Einfrieren effektiver als mit der Vitrifikation.

Fazit für die Praxis

Das Ziel dieser Studie war der Vergleich des konventionellen Einfrierens mit der Vitrifikation bei der Anwendung für das menschliche Ovarialgewebe. Es ist anzunehmen, dass für die Kryokonservierung von menschlichem Ovarialgewebe das konventionelle Einfrieren besser geeignet ist als die Vitrifikation.

Danksagung

Forschungsprojekt wurde gefördert durch ESF, Projekt-Nr. 2007000003.

Interessenkonflikt

Es liegt kein Interessenkonflikt vor.

Literatur

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E et al. 2008 Cancer statistics. CA A Cancer J Clin 2008; 58: 71–96
- 2 Grovas A, Fremgen A, Rauck A et al. The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. Cancer 1997; 80: 2321–2332
- 3 Donnez J, Bassil S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. Hum Reprod Update 1998; 4: 248–259
- 4 Oktay K, Newton H, Aubard Y et al. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? Fertil Steril 1998; 69: 1–7
- 5 Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. New Engl J Med 2000; 342: 1919
- 6 Meirou D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. Hum Reprod Update 2001; 7: 534–543
- 7 Meirou D, Baum M, Yaron R et al. Ovarian tissue cryopreservation in hematologic malignancy: ten years' experience. Leuk Lymphoma 2007; 48: 1569–1576
- 8 Gosden RG. Prospects for oocyte banking and in vitro maturation. J Natl Cancer Inst Monogr 2005; 34: 60–63
- 9 Schmidt KL, Andersen CY, Loft A et al. Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. Hum Reprod 2005; 20: 3539–3546
- 10 Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. Hum Reprod Update 2006; 12: 519–535
- 11 Donnez J, Dolmans MM, Demylle D et al. Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report. Hum Reprod 2006; 21: 183–188
- 12 Silber SJ, Gosden R. Ovarian transplantation in a series of monozygotic twins discordant for ovarian failure. New Engl J Med 2007; 356: 1382–1384
- 13 Isachenko V, Isachenko E, Kreienberg R et al. Eine Kryobank für humanes Ovarialgewebe: Konzept und Perspektiven. Frauenarzt 2008; 49: 518–521
- 14 Donnez J, Dolmans MM, Demylle D et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet 2004; 364: 1405–1410
- 15 Meirou D, Levron J, Eldar-Geva T et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. New Engl J Med 2005; 353: 318–321
- 16 Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. Hum Reprod 2008; 23: 2266–2272
- 17 Gandolfi F, Paffoni A, Brambilla EP et al. Efficiency of equilibrium cooling and rapid freezing procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. Fertil Steril 2006; 85 (Suppl.): 1150–1156

- 18 *Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J et al.* Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of rapid and conventional freezing. *Cryobiology* 2007; 55: 261–268
- 19 *Li YB, Zhou CG, Yang GF et al.* Modified rapid freezing method for cryopreservation of human ovarian tissue *Chin Med J* 2007; 120: 110–114
- 20 *Sirover MA.* Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J Cell Biochem* 1997; 66: 133–140
- 21 *Barber RD, Harmer DW, Coleman RA et al.* GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 2005; 2: 389–395
- 22 *Keros V, Xella S, Hulthenby K et al.* Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009; 24: 1670–1683
- 23 *Isachenko V, Montag M, Isachenko E et al.* Effective method for in-vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 228–234
- 24 *Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G et al.* Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen: negative effect of disaccharides in rapid freezing solution. *CryoLetters* 2002; 23: 333–344
- 25 *Isachenko E, Isachenko V, Nawroth F et al.* Human ovarian tissue preservation: is vitrification acceptable method for assisted reproduction? *CryoLetters* 2008; 29: 301–314
- 26 *Al-Aghbari AM, Menino AR.* Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissue. *Anim Reprod Sci* 2002; 71: 101–110
- 27 *Silvestre MA, Saeed AM, Escriba MJ et al.* Rapid freezing and rapid conventional freezing of rabbit fetal tissues and skene samples from rabbits and pigs. *Theriogenology* 2002; 58: 69–76
- 28 *Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V et al.* Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 187–193
- 29 *Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T et al.* Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000; 40: 110–116
- 30 *Bielanski A, Bergeron H, Lau PCK et al.* Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003; 46: 146–152
- 31 *Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH et al.* Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995; 346: 137–140
- 32 *Hawkins AE, Zuckerman MA, Briggs M et al.* Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. *J Virol Methods* 1996; 60: 81–88
- 33 *Charles GN, Sire DJ.* Transmission of papova virus by cryotherapy applicator. *J Am Med Assoc* 1971; 218: 1435
- 34 *Schaffer TW, Everett J, Silver GH et al.* Biohazard: virus-contaminated liquid nitrogen. *Science* 1976; 192: 25–26
- 35 *Jones SK, Darville JM.* Transmission of virus-particles by cryo-therapy and multi-use caustic pencils: a problem to dermatologist? *Brit J Dermatol* 1989; 121: 481–486
- 36 *Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J et al.* Simplified technique of human ovarian tissue freezing: quick cooling from –36 degree C. *CryoLetters* 2008; 29: 261–268