

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Klinische Relevanz der Kryokonservierungen von Spermien im
Kontext gonadotoxischer Therapien

Clinical Relevance of Sperm Cryopreservation in Patients
Receiving Gonadotoxic Therapies

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadine Lackamp

aus Hamburg

Datum der Promotion: 25.06.2023

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Survey of Long-Term Experiences of Sperm Cryopreservation in Oncological and Non-Oncological Patients: Usage and Reproductive Outcomes of a Large Monocentric Cohort

Lackamp N, Wilkemeyer I, Jelas I, Keller U, Bullinger L, Stintzing S, le Coutre P.

Frontiers in Oncology. 2021;11(4648). doi:10.3389/fonc.2021.772809.

Veröffentlicht am 05 November 2021.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	6
Abstrakt (deutsch)	7
Abstract (English)	9
1. Einleitung	11
1.1 Geschichtlicher Hintergrund der Kryokonservierungen von Spermien	11
1.2 Gonadotoxische Therapieformen	11
1.3 Kryokonservierung von Spermien als Fertilitätsprotektion	13
1.4 Nutzung von kryokonservierten Spermien	15
1.5 Forschungsstand und Zielstellung	15
2. Methodik	16
2.1 Studiendesign und Studienvorbereitung	16
2.1.1 Ethikvotum	17
2.1.2 Datenbank Kryokonservierungspatienten	17
2.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien	17
2.2 Studiendurchführung	18
2.2.1 Spermioграмme	18
2.3 Studienauswertung	19
2.3.1 Kategorisierung gonadotoxischer Therapien	19
2.3.2 Statistische Analyse	21
3. Ergebnisse	21
3.1 Charakteristika und Diagnosen der Studienteilnehmer	21
3.2 Gonadotoxische Therapien der Studienteilnehmer	22
3.3 Spermienqualität zum Zeitpunkt der Kryokonservierung	24
3.4 Spermienutzung	25

3.4.1 Diagnosen und Therapieformen der Patienten, die ihr Kryokonservat verwendeten	27
3.4.2 ART Resultate	28
3.5 Natürliche Fertilität vor und nach Therapie	29
4. Diskussion	30
4.1 Vergleich der Studienergebnisse mit existierenden Forschungen	30
4.2 Klinische Anwendungen	31
4.3 Zukünftige Perspektiven und weiterführende Fragestellungen	32
4.4 Limitationen und Stärken der Arbeit	35
5. Detaillierte Aufstellung meiner selbst erbrachten Leistungen	36
Literaturverzeichnis	38
Eidesstattliche Versicherung/Anteilserklärung	44
Auszug aus der Journal Summary List	48
Publikation:	51
Lackamp N, Wilkemeyer I, Jelas I, Keller U, Bullinger L, Stintzing S, le Coutre P. Survey of Long-Term Experiences of Sperm Cryopreservation in Oncological and Non-Oncological Patients: Usage and Reproductive Outcomes of a Large Monocentric Cohort. Frontiers in Oncology. 2021;11(4648).	
Lebenslauf	67
Publikationsliste	68
Danksagung	69

Abkürzungsverzeichnis

ART	assistierte reproduktive Technologien
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IQR	Interquartilsabstand
IUI	intrauterine Insemination
ml	Milliliter
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Therapiekategorien nach gonadotoxischem Potenzial	20
Tabelle 2: Spermienparameter verschiedener Patientengruppen	26
Tabelle 3: Charakteristika der Patienten, die ihr Kryokonservat verwendeten	27
Tabelle 4: Charakteristika der mithilfe von ART gezeugten Neugeborenen	29
Abbildung 1: Schema des Studienablaufs	18
Abbildung 2: Diagnosegruppen der Studienteilnehmer	22
Abbildung 3: Verteilung der Therapiekategorien und jeweiligen gonadotoxischen Behandlungsformen in der Studienpopulation	24
Abbildung 4: Verteilung der Therapiekategorien und jeweiligen gonadotoxischen Behandlungsformen unter den Patienten, die ihr Kryokonservat verwendeten	28

Abstrakt (deutsch)

Hintergrund

Kryokonservierungen von Spermien fungieren seit Jahrzehnten als Standardmethode zur Fertilitätsprotektion für männliche Patienten. Da die meisten Alkylanzien, aber auch gonadale Bestrahlungen, Konditionierungsregimes für HSZT sowie Orchiectomien die Spermatogenese stark beeinträchtigen können, sollte jungen Krebspatienten vor Therapieinitiation eine entsprechende Fertilitätsprotektion angeboten werden. Jedoch nutzten in bisherigen Studien nur etwa 3 – 10% der Krebspatienten, die sich für eine Kryokonservierung entschieden, ihre Spermien zu einem späteren Zeitpunkt. Faktoren, die Einfluss auf die Spermienutzung nehmen, sind bislang nicht ausreichend erforscht.

Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Forschung besteht in der Analyse der klinischen Relevanz von Kryokonservierungen von Spermien als Fertilitätsprotektion vor gonadotoxischen Therapien anhand von Untersuchungen zu Spermienutzung und Erfahrungen aus assistierter und natürlicher Reproduktion der Patienten.

Methoden

In einer retrospektiven Studie wurde allen männlichen Patienten, die zwischen 1994 und 2017 reproduktives Material in der Kryobank der Charité konserviert hatten, Fragebögen mit Fragen zu Krankengeschichte, Kryokonservierung, Spermienutzung und reproduktiven Erfahrungen zugesandt. Insgesamt wurden 99 Patienten, die eine Kryokonservierung aufgrund einer gonadotoxischen Behandlung durchführen ließen, in die Studie eingeschlossen. Weiterhin wurden Spermienparameter der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt der Kryokonservierung analysiert. Die erhobenen Daten wurden statistisch mithilfe von SPSS ausgewertet.

Ergebnisse

Die häufigsten onkologischen Diagnosen waren maligne Hodentumore (29,3%) und Lymphome (26,3%), wohingegen alle nicht-onkologischen Patienten (8,1%) unter Autoimmunerkrankungen litten. Das mediane Alter zum Studienzeitpunkt und zum Zeitpunkt der Kryokonservierung betrug jeweils 38,0 und 29,0 Jahre. 25,0% der

Patienten wurde mit Behandlungen mit hohem und 45,5% mit mittlerem gonadotoxischen Potenzial therapiert. Die prätherapeutische mediane Spermienkonzentration von Patienten mit malignen Hodentumoren war signifikant niedriger im Vergleich zu der von Patienten mit anderen Diagnosen. Insgesamt 17 Patienten (17,2%) verwendeten ihr Kryokonservat und konnten in 58,8% die Vaterschaft mindestens eines mithilfe von ART gezeugten Kindes erlangen. Patienten, die ihre Spermien nutzten, erhielten in 40,0% Therapien mit hoher und in 33,3% mit mittlerer Gonadotoxizität. Ein Fünftel der Patienten (20,7%) zeugten mindestens ein Kind durch natürliche Konzeption nach durchgeführter Therapie.

Schlussfolgerung

Unsere Studie bestätigt, dass Kryokonservierungen von Spermien eine effektive Methode zur Fertilitätsprotektion darstellen und bei Nutzung in mehr als der Hälfte der Fälle erfolgreich zu Vaterschaft führen. Zudem weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass eine Korrelation zwischen dem gonadotoxischen Potenzial der durchgeführten Therapie und einer späteren Spermienutzung besteht.

Abstract (English)

Background

Cryopreservation of sperm has served as the standard method for fertility preservation in male patients for the last decades. Due to the deleterious effects on spermatogenesis that can result from most alkylating agents, gonadal irradiations, conditioning regimens for HSCT, and orchiectomies, young cancer patients should be provided an appropriate fertility preservation option prior to treatment initiation. However, in previous studies, only 3 – 10% of cancer patients who decided to undergo cryopreservation used their semen afterwards. Influencing factors for future sperm usage have not yet been analyzed sufficiently.

Purpose

The aim of the present research is to analyze the clinical relevance of sperm cryopreservation as a fertility preservation method prior to gonadotoxic treatments by examining patients' sperm usages and experiences of assisted and natural reproduction.

Methods

We conducted a retrospective survey including patients who cryopreserved ejaculated sperm or testicular tissue at the Cryobank of Charité between 1994 and 2017. Our questionnaire contained questions regarding the medical history, cryopreservation, material usage and reproductive experiences of the participants. A total of 99 patients who underwent cryopreservation of reproductive material to preserve their fertility due to gonadotoxic treatments were included in the study. In addition, semen characteristics from the time of cryopreservation were evaluated for study participants. Collected data was statistically analyzed in SPSS.

Results

Most frequent diagnoses among the oncological patients were malignant testicular tumors (29.3%) and lymphoma (26.3%), whereas all non-oncological patients (8.1%) suffered from autoimmune diseases. The median age at the time of the survey and the time of cryopreservation were 38.0 and 29.0 years, respectively. 25.0% of the patients underwent treatments with high and 45.5% with intermediate gonadotoxic potential. The pre-treatment median sperm concentration of testicular cancer patients was

significantly lower compared to the sperm concentration of non-testicular cancer patients. A total of 17 patients (17.2%) utilized their frozen material and achieved fatherhood of at least one ART-conceived child in 58.8% of cases. Patients who used their sperm received in 40.0% treatments with high and in 33.3% with intermediate gonadotoxicity. One-fifth of the patients (20,7%) sired at least one naturally conceived child after treatment.

Conclusion

Our study confirms that sperm cryopreservation is a safe and effective method for male fertility preservation and, in case of usage, leads to fatherhood in more than half of the cases. Furthermore, our results suggest that sperm usage directly correlates with the degree of gonadotoxicity patients received with their treatments.

1. Einleitung

1.1 Geschichtlicher Hintergrund der Kryokonservierungen von Spermien

Die Anfänge der Kryokonservierungen von Spermien gehen auf das Jahr 1776 zurück, als der italienische Priester und Physiologe Lazzaro Spallanzani das Verhalten von Spermien bei Kühlung mithilfe von Schnee beobachtete. Er beschrieb erstmals, dass durch das Einfrieren eine Immotilität der Spermien resultiere (1). Jedoch dauerte es knapp zwei weitere Jahrhunderte bis die erste Schwangerschaft durch Nutzung von menschlichen, kryokonservierten Spermien erzielt werden konnte (2). Weitere 10 Jahre später, im Jahr 1963, begann sich die Kryokonservierungstechnik, bei der die Spermatozoen mithilfe von flüssigem Stickstoff bei -196°C gefroren wurden, zu etablieren. Kurze Zeit darauf folgten erste Berichte über erfolgreiche Lebendgeburten nach Fertilisationen mit kryokonservierten Spermien. Als in den frühen 1970er Jahren die Nutzung von artifizieller Insemination zunahm, wuchs auch die Bedeutung von Samenbanken, in denen Spermien langfristig verwahrt werden konnten. In den Folgejahren wurde die Technik der Kryokonservierungen und der assistierten reproduktiven Technologien (ART) stetig weiterentwickelt, sodass sie heute als Standardmethode für männlichen Fertilitätserhalt fungiert (1, 3).

1.2 Gonadotoxische Therapieformen

Diverse Faktoren können die Spermatogenese beeinträchtigen und somit eine Schädigung der männlichen Fertilität bewirken. Unter anderem beeinflussen einige Krebserkrankungen die Spermatogenese negativ und führen bereits vor Therapiebeginn zu reduzierten Spermienkonzentrationen und Gesamt-Spermienzahlen. Insbesondere Patienten mit malignen Hodentumoren, wie in zahlreichen Studien berichtet wurde, weisen schon bei Diagnosestellung deutliche Einschränkungen der Spermatogenese auf (4-6). Dabei werden die Beeinträchtigungen sowohl durch eine Destruktion des Hodenparenchyms und Substitution durch Tumorgewebe, eine systemische Inflammation und erhöhte Körpertemperaturen als auch durch hormonelle Dysbalancen aufgrund von Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und des physiologischen Feedback-Mechanismus verursacht (7). Darüber hinaus bewirken zahlreiche Krebstherapien eine Minderung der Fertilität:

1. Zytostatika: Diverse Chemotherapeutika schädigen die sich differenzierenden Spermatogonien und führen zu einem progressiven Verlust an Spermatozoen. Entscheidend für das Ausmaß dieser Schädigung ist zum einen die Art des Zytostatikums und die Kombination mit weiteren gonadotoxischen Substanzen, zum anderen die initiale Spermienqualität sowie die verabreichte Gesamtdosis des Zytostatikums. In der existierenden Literatur wurden die meisten Alkylanzien sowie Cisplatin als stark fertilitätsschädigend beschrieben (8, 9). Besonders die Einnahme von Cyclophosphamid und Ifosphamid birgt das Risiko einer resultierenden permanenten Azoospermie. Dagegen verursachen Vincaalkaloide wie Vincristin und Vinblastin typischerweise temporäre Oligo- oder Azoospermien. Jedoch sind auch permanente Störungen der Spermatogenese möglich, wenn Vincaalkaloide mit Alkylanzien oder Platin-Analoga kombiniert verabreicht werden (7). Entstandene Schäden zeigen sich meist innerhalb der ersten sechs Monate nach Zytostatika-Einnahme. Eine langfristige Regeneration der Spermatogenese ist in Abhängigkeit von der Anzahl der geschädigten Spermatogonien zwar möglich, jedoch benötigt sie in einigen Fällen Zeiträume von mehr als fünf Jahren (9). Lampe et al. ermittelten in einer Metaanalyse, dass nach einer Cisplatin-basierten Chemotherapie zur Behandlung von Hodenkrebs die Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Regeneration der Spermatogenese nach zwei Jahren bei etwa 48% und nach fünf Jahren bei etwa 80% lag (10).
2. Gonadale Radiotherapie: Gonadale Radiationen verursachen Beeinträchtigungen der Spermatogenese in Abhängigkeit von der kumulativen Gesamtstrahlendosis. Bereits ab einer Strahlendosis von 0,1 Gy werden erste Einschränkungen beobachtet. Dosierungen ab vier Gy können zu permanenten Keimzellverlusten und 16 – 20 Gy zu irreversiblen Azoospermien führen. Für die vollständige Regeneration der Spermatogenese werden bei Gesamtstrahlenbelastungen von weniger als ein Gy bis zu 18 Monate, von zwei bis drei Gy bis zu 30 Monate und bei über vier Gy bis zu mehr als fünf Jahre benötigt (7, 11). Im Gegensatz zu den besonders radiosensitiven Spermatogonien weisen die adulten Leydigzellen des Hodens aufgrund ihrer niedrigeren Teilungsrate eine höhere Resistenz gegenüber gonadaler Bestrahlung und zytostatischer Therapie auf. Ihre Funktion, die Testosteronsynthese, wird erst bei Strahlendosen von 20 – 30 Gy kompromittiert. Nichtsdestotrotz ist eine Testosteronersatztherapie in einigen Fällen nach gonadaler Radiatio erforderlich (7).

3. Orchiektomie: Auch chirurgische Eingriffe an den Gonaden können negative Konsequenzen für die Spermatogenese nach sich ziehen. Bereits in zahlreichen Studien wurden reduzierte Spermienkonzentrationen, Gesamt-Spermienzahlen und Inhibin B-Level im Serum innerhalb der ersten Monate nach erfolgter radikaler inguinaler Orchiektomie beobachtet (7, 11). Obwohl die Orchiektomie zur Therapie von malignen Hodentumoren zumeist unilateral durchgeführt wird und der kontralaterale Hoden bestehen bleibt, zeigen bis zu 85% der Patienten verringerte Spermienparameter und weitere 9% entwickeln eine Azoospermie nach erfolgter unilateraler Orchiektomie (7).
4. Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT): Das Risiko einer Infertilität nach einer HSZT, allogenen oder autologen, ist aufgrund aggressiver gonadotoxischer Chemotherapie-Kombinationen und/oder Ganzkörperbestrahlungen als Teil der Konditionierungsregimes sehr hoch (9, 12). Azoospermie-Raten nach Hochdosis-Chemotherapie als Vorbereitung auf die HSZT liegen bei bis zu 90%. Eine Regeneration der Spermatogenese ist in einigen Fällen möglich, jedoch häufig erst viele Jahre später (12). Rovo et al. berichteten in einer Studie, dass nach einem medianen Beobachtungszeitraum von 9 Jahren nach HSZT nur 28% der Patienten eine teilweise Regeneration der Spermatogenese verzeichnen konnten. Der Großteil dieser Patienten (82%) erhielt im Zuge des Konditionierungsregimes eine Ganzkörperbestrahlung (13).

1.3 Kryokonservierung von Spermien als Fertilitätsprotektion

Ob nach durchgeführter gonadotoxischer Therapie wie sie im Vorherigen beschrieben wurde eine Infertilität vorliegen wird, ist nicht sicher vorhersagbar. Daher sollte allen männlichen Patienten in reproduktivem Alter vor Durchführung einer potenziell gonadotoxischen Therapie das Angebot einer Kryokonservierung von Spermien als Fertilitätsprotektion unterbreitet werden (14). Für präpubertäre Jungen, bei denen die Gewinnung ejakulierter Spermien nicht möglich ist, besteht innerhalb von klinischen Studien die Option zur Kryokonservierung von Hodengewebe (11, 14). Obwohl die Rate an Kryokonservierungen vor geplanter fertilitätsschädigender Therapie innerhalb der letzten Jahrzehnte kontinuierlich anstieg, ist eine entsprechende Fertilitätsprotektion in vielen Ländern noch nicht gängige Praxis (4, 5, 15-17). In den USA überwies einer Studie zufolge im Durchschnitt nur 47% der Onkolog*innen – darunter weibliche Onkologinnen doppelt so häufig wie männliche Kollegen – ihre

Krebspatient*innen in reproduktivem Alter an eine/n Reproduktionsmediziner*in (18). Weiterhin können für Patienten, die eine Kryokonservierung in Erwägung ziehen, ökonomische Aspekte eine Rolle spielen. In den USA beispielsweise müssen männliche Krebspatienten die Kosten für Kryokonservierungen sowie die Lagerung der Spermien in Samenbanken häufig privat zahlen. Eine Studie ergab, dass fast 10% der Patienten sich aus diesem Grunde gegen eine Kryokonservierung entschieden (17). Hingegen werden in einigen anderen Ländern die Kosten von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen (19). In Deutschland entschied der Gemeinsame Bundesausschuss erst kürzlich über die Kostenübernahme, sodass seit Anfang Juli 2021 die Kosten für Kryokonservierungen von ejakulierten Spermien oder Hodengewebe als Fertilitätsprotektion für männliche Patienten unter 50 Jahren, die aufgrund einer Erkrankung eine gonadotoxische Therapie erhalten, von der gesetzlichen Krankenkasse übernommen werden (Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses) (20).

Der Großteil der Patient*innen, die eine potenziell gonadotoxische Therapie erhalten, leidet unter Krebserkrankungen, die mit Chemo-, Radiotherapie, chirurgischen Eingriffen oder HSZT behandelt werden. Da sich die Diagnostik und Therapie dieser Krebserkrankungen innerhalb der letzten Jahrzehnte stark verbesserte, nahm sowohl die Lebensqualität der Patient*innen als auch Langzeit-Überlebensraten deutlich zu. Demgegenüber stieg die Inzidenz einiger Krebserkrankung. Beispielsweise erhöhte sich die Inzidenz von malignen Hodentumoren, an denen häufig junge Männer erkranken, die ihre Familienplanung erst vor sich oder noch nicht abgeschlossen haben, innerhalb der letzten Dekaden. Besonders betroffen hiervon ist der Norden Europas (21). Als Konsequenz aus verbessertem Langzeit-Überleben und steigenden Inzidenzen rückt die Bedeutung des Fertilitätserhalts für Krebspatient*innen vermehrt in den Fokus.

Allerdings werden auch im Rahmen von nicht-onkologischen Erkrankungen Zytostatika mit nachfolgender potenzieller Beeinträchtigung der Fertilität eingesetzt: Patient*innen mit Autoimmunerkrankungen profitieren häufig von immunsuppressiver Therapie mit Alkylanzien (z.B. Cyclophosphamid) oder müssen sich in einigen Fällen HSZT unterziehen, sodass die Möglichkeit zum Fertilitätserhalt vor Therapiebeginn angeboten werden sollte. Jedoch existieren bisher kaum Studien zu Kryokonservierungen von Spermien bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (3).

1.4 Nutzung von kryokonservierten Spermien

In der Literatur existieren bereits einige Studien, die sich mit der Kryokonservierung von Spermien bei onkologischen Patienten beschäftigen und Spermiennutzungs- sowie Erfolgsraten von ART analysieren. Die Nutzung der asservierten Spermien zur Kindeswunscherfüllung mithilfe von ART war in den bestehenden Studien meist gering. Häufig verwendeten weniger als 10% der Patienten ihr Kryokonservat zu einem späteren Zeitpunkt (4, 15, 22-27). Auch bei längeren Beobachtungszeiträumen von über 10 Jahren stiegen die Nutzungsraten nur wenig. Bisher wurden verschiedene Faktoren exploriert, die möglicherweise Einfluss auf die Spermiennutzung nehmen. Analysen zeigten, dass einerseits das Alter zum Zeitpunkt der Kryokonservierung und andererseits die Art der Krebserkrankung beeinflussende Variablen für die Spermienverwendung darstellen. Der Einfluss weiterer Faktoren, wie beispielsweise die Art der gonadotoxischen Therapie oder die Spermienqualität nach Behandlung, ist noch nicht abschließend geklärt (27).

Werden die kryokonservierten Spermien für eine assistierte Reproduktion verwendet, wird in 30 – 80% der Fälle eine Vaterschaft von mindestens einem mithilfe von ART gezeugten Neugeborenen erzielt (4, 23, 28, 29). Dabei lagen in der existierenden Literatur die Raten von erfolgreichen Lebendgeburten nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) deutlich höher als nach intrauteriner Insemination (IUI) (26, 30). Des Weiteren war die Spermienmotilität nach Auftauen des Kryokonservats entscheidend für das Ergebnis der ART (30).

1.5 Forschungsstand und Zielstellung

Trotz zunehmender Forschung auf dem Gebiet der Onkofertilität und bereits zahlreicher bestehender Studien bezüglich Kryokonservierungen von Spermien sind viele Aspekte aktuell noch nicht ausreichend exploriert. Beobachtungsstudien über längere Zeiträume sind limitiert und werden benötigt, um fundierte Aussagen über Langzeitnutzungsraten von Spermien und resultierende Erfolgsraten von ART treffen zu können. Zudem existieren kaum Studien, die den Zusammenhang zwischen der Art der gonadotoxischen Therapie und der späteren Verwendung von Kryokonservaten untersuchen. Weiterhin mangelt es an Daten zu natürlicher Fertilität der Kryokonservierungspatienten nach durchgeführter gonadotoxischer Behandlung und resultierenden Vaterschaften durch natürliche Reproduktion (28, 31-34). Einen

weiteren, bisher wenig untersuchten Aspekt stellt, wie bereits im obigen Abschnitt erwähnt, die Analyse von Ergebnissen von Kryokonservierungen bei nicht-onkologischen Patienten mit Indikationen für fertilitätsschädigende Therapien dar (3).

Die vorliegende Arbeit intendiert, die beschriebenen Aspekte zu adressieren und weist folgende Zielstellungen auf:

- Untersuchung der Langzeiterfahrungen von männlichen onkologischen und nicht-onkologischen Patienten mit kryokonserviertem reproduktiven Material in Bezug auf Nutzung der Kryokonservate und Ergebnisse aus assistierter und natürlicher Reproduktion
- Darstellung der durchgeführten Behandlungen der Patienten sowie des entsprechenden gonadotoxischen Potenzials im Kontext von Spermiennutzung und natürlicher Reproduktion

2. Methodik

Ausschnitte der Methodik der vorliegenden Arbeit wurden bereits mit der Originalpublikation veröffentlicht und werden im folgenden Abschnitt in geänderter Form beschrieben und ergänzt (35).

2.1 Studiendesign und Studienvorbereitung

Zur Untersuchung der vorgestellten Fragestellungen wurde eine retrospektive Fragebogenstudie für männliche Patienten, die in der Vergangenheit Kryokonservierungen von reproduktivem Material an der Charité durchführen ließen, konzipiert.

Zu Beginn wurde Kontakt mit der Leiterin der Kryobank der Charité aufgenommen und ein kooperatives Projekt initialisiert. Daraufhin wurden alle erforderlichen Unterlagen für die Fragebogenstudie sowie für ein Ethikvotum entworfen: Ethikantrag, Studieninformation für Patienten, Einwilligungserklärung, Fragebogen und wesentliche Veröffentlichungen zu der Fragestellung. Der studienspezifische Fragebogen umfasste Folgendes: personenbezogene Angaben, Fragen zur Kryokonservierung von reproduktivem Material (Frequenz, Indikation, zeitlicher Verlauf in Bezug auf die gonadotoxische Therapie, Anforderung und Verwendung der Spermien für ART, erfolgreiche Kindeszeugung/en mit asservierten Spermien, erfolglose Versuche,

Nutzung der Spermien in Zukunft), Fragen zur Krankengeschichte (für Kryokonservierung relevante Erkrankung, Art der Erkrankung, Datum Erstdiagnose, Therapieformen, Rezidive, heutiger Erkrankungsstatus) sowie Fragen zur Familie (Familienstand, Kinder, Parameter zu einzelnen Kindern (Geburtsdatum, Geschlecht, leiblich/nicht leiblich, Zeugungsart, Geburtsgewicht und -größe, Geburtskomplikationen, heutiger Gesundheitszustand, Geburtsdatum Mutter).

2.1.1 Ethikvotum

Die Durchführung der geplanten Studie wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Ethikausschuss am Campus Charité – Mitte) genehmigt. Ein entsprechendes Votum (EA1/172/18) vom 11.10.2018 ist vorliegend.

2.1.2 Datenbank Kryokonservierungspatienten

Die Kryobank der Charité stellte eine Liste aller männlichen Patienten, die im Zeitraum von 1992 bis 2017 ejakulierte Spermien oder Hodengewebe an der Charité kryokonservieren ließen, zur Verfügung. Im genannten Zeitraum waren insgesamt 1089 Patienten gelistet. Von allen Patienten mit verfügbarer Patientenakte in der Charité-internen SAP-Datenbank wurden in Vorbereitung auf die Fragebogenstudie Daten bezüglich der Kryokonservierungen sowie personenbezogene Daten einschließlich Wohnanschrift erfasst und passwortgeschützt gesichert.

2.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Alle gelisteten Patienten wurden auf folgende Einschlusskriterien überprüft:

- Volljährigkeit zum Studienzeitpunkt
- Kryokonservierung erfolgreich durchgeführt
- Kontaktdaten in Patientendatenbank (SAP) vorhanden
- Wohnanschrift innerhalb Deutschlands

Außerdem wurden die in der Kryobank- oder SAP-Datenbank als verstorben gekennzeichneten Patienten ausgeschlossen. In Abbildung 1 sind die jeweiligen Anzahlen der exkludierten Patienten aufgeführt.

2.2 Studiendurchführung

Abbildung 1 stellt ein Schema des weiteren Studienablaufs dar. Allen Patienten, die den Einschlusskriterien entsprachen, wurden Studienpakete inklusive Studieninformation, Einwilligungserklärung mit Kopie, Studienfragebogen und frankiertem Briefumschlag für den Rückversand postalisch zugeschickt. Von 515 zugestellten Fragebögen wurden 111 beantwortet und zurückgesandt, sodass sich eine Antwortrate von 21.5% ergab. Im weiteren Vorgehen wurde die Studie ausschließlich auf Patienten, die aufgrund ihrer Erkrankung eine gonadotoxische Therapie benötigten, eingegrenzt. Weitere 10 Patienten ohne entsprechende Erkrankung/Indikation einer gonadotoxischen Therapie wurden infolgedessen von der Studie ausgeschlossen. Insgesamt wurden 99 Patienten in die Fragebogenstudie eingeschlossen.

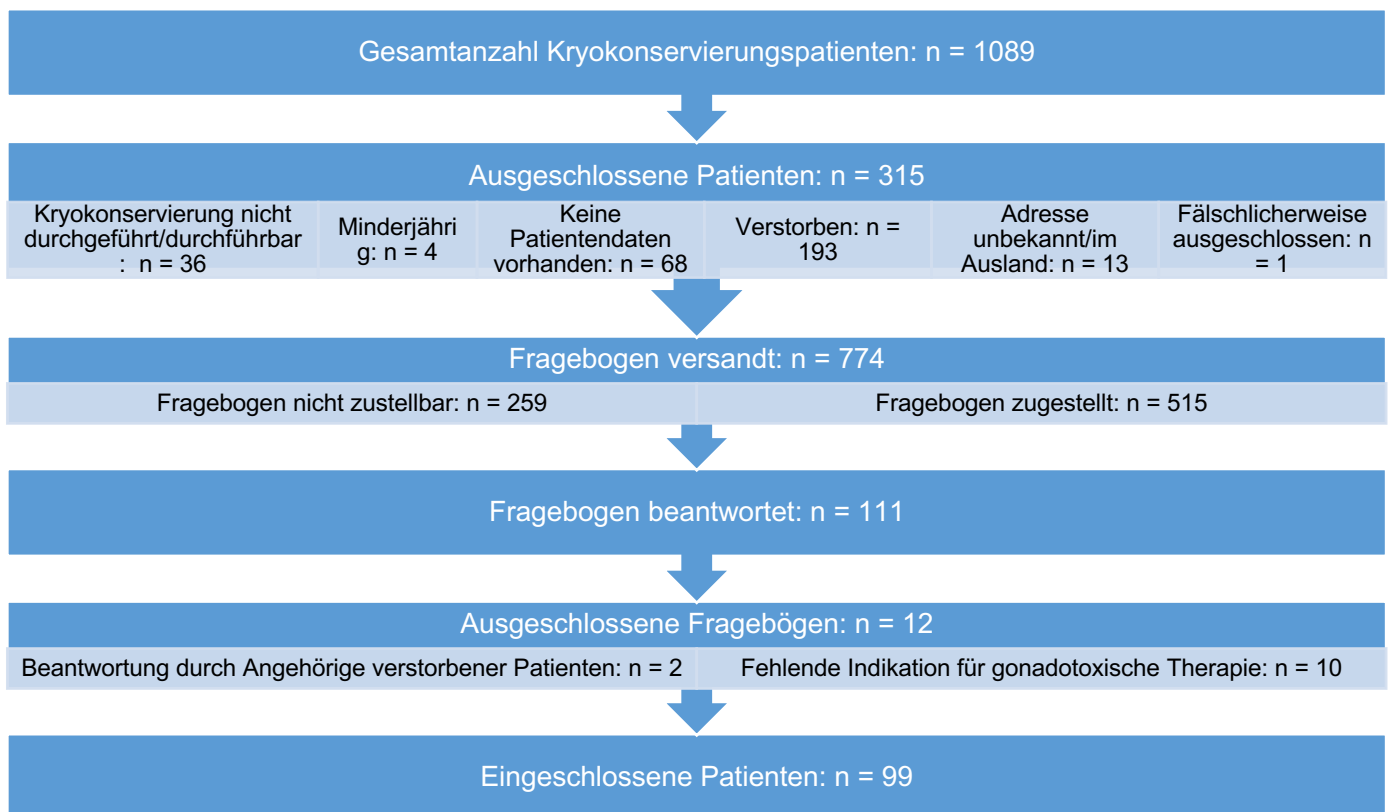


Abbildung 1: Schema des Studienablaufs

2.2.1 Spermioogramme

Um die Fertilität zum Zeitpunkt der Kryokonservierungen einschätzen zu können, wurden für die eingeschlossenen Patienten zusätzlich Spermioogramme bei der Kryobank der Charité angefragt. Es konnten 82 Analysen von Ejakulat sowie drei

Analysen von Hodengewebe jeweils zum Zeitpunkt der Kryokonservierung zur Verfügung gestellt werden. Von 14 Patienten lag kein Befund des Kryokonservats vor. Die Spermioogramme wurden nach den zum Zeitpunkt der Kryokonservierung jeweils gültigen Leitlinien der WHO (1999 bzw. 2010) in Bezug auf das Volumen, den pH-Wert, die Vitalität, die Motilität und die Spermienkonzentration untersucht. Die Motilität wurde dabei in die Kategorien progressiv (WHO Leitlinie 2010) bzw. schnell progressiv und progressiv (WHO Leitlinie 1999), nicht progressiv und immotil eingeteilt. Der jeweils untere Referenzwert lag für das Spermienvolumen bei 1,5 ml, den pH-Wert bei 7,2, die Vitalität bei 58%, die Gesamtmotilität bei 40%, die progressive bzw. schnell progressive und progressive Motilität bei 32% und die Spermienkonzentration bei 15 Millionen Spermatozoen/ml (36, 37). In den drei Analysen von Hodengewebe wurden die mikroskopische Nachweisbarkeit von Spermien und die Motilität der beobachteten Spermien beschrieben.

2.3 Studienauswertung

Zur weiteren Studienauswertung wurden alle Angaben aus den ausgefüllten Fragebögen und die Daten der Befunde der Kryokonservate in eine Datenbank in Microsoft Excel eingetragen und pseudonymisiert. Des Weiteren wurden die eingeschlossenen Patienten in der Charité-internen SAP-Datenbank gesucht und fehlende Angaben vervollständigt bzw. Unstimmigkeiten in den Fragebögen überprüft und ggf. korrigiert. Besonders die einzelnen Chemotherapeutika, Bestrahlungsregionen und -dosen sowie Datumsangaben der jeweiligen gonadotoxischen Therapien wurden aus der SAP-Datenbank extrahiert.

2.3.1 Kategorisierung gonadotoxischer Therapien

Um die einzelnen Therapieformen bezüglich ihrer Gonadotoxizität einschätzen und in die statistische Auswertung integrieren zu können, wurden alle Therapieschemata, die die Studienteilnehmer erhielten, anhand ihres gonadotoxischen Potenzials in vier Kategorien eingeteilt (Tabelle 1). Zur Kategorisierung der einzelnen Chemotherapeutika bzw. -Kombinationen wurden überwiegend Daten von Poorvu et al. genutzt, die das Risiko einer späteren Infertilität für verschiedene Therapieschemata jeweils in die folgenden Kategorien einteilten (38):

- Hohes Risiko: > 75% Reduktion der Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaftsentstehung oder > 75% Anstieg des Risikos für Infertilität
- Mittleres Risiko: 25 – 75% Reduktion der Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaftsentstehung oder 25 – 75% Anstieg des Risikos für Infertilität
- Niedriges Risiko: < 25% Reduktion der Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaftsentstehung oder < 25% Anstieg des Risikos für Infertilität

Da nicht alle verwendeten Chemotherapeutika von o.g. Autoren untersucht wurden, wurden die Daten anderer Autoren zur Kategorisierung der fehlenden Substanzen hinzugezogen (8, 11, 39, 40). Für die fehlenden Zytostatika konnte in den existierenden Studien jeweils das Bestehen eines Risikos für eine prolongierte Azoospermie oder eine temporäre Reduktion der Spermienkonzentration gezeigt werden. In Bezug auf einige Substanzen (Rituximab, Bendamustin, Imatinib, Cladribin, ¹³¹Iod) war die Datenlage in der existierenden Literatur bisher nicht ausreichend, um eine Gonadotoxizität sicher nachweisen oder ausschließen zu können, sodass für diese Substanzen mit potenzieller, jedoch nicht nachgewiesener Gonadotoxizität eine vierte Kategorie implementiert wurde.

Tabelle 1: Einteilung der Therapiekategorien nach gonadotoxischem Potenzial

Therapiekategorie	Therapieart oder Chemotherapeutikum/Chemotherapie-Schema
Kategorie 1: Hohe Gonadotoxizität	HSZT Konditionierung (Hochdosis-Chemotherapie und/oder Ganzkörperbestrahlung), BEACOPP, VAC
Kategorie 2: Mittlere Gonadotoxizität/Risiko für prolongierte Azoospermie	Gonadale Radiatio, Cyclophosphamid, Cisplatin, Ifosfamid, Lomustin, PEB, PEI, VIDE
Kategorie 3: Niedrige Gonadotoxizität/Risiko für temporäre Reduktion der Spermienkonzentration	Radikale inguinale Orchiectomie, Vincristin, Vinblastin, Carboplatin, Doxorubicin, Bleomycin, Methotrexat, Azathioprin, ABVD, CHOP
Kategorie 4: Potenzielle Gonadotoxizität	Rituximab, Bendamustin, Imatinib, Cladribin, ¹³¹ Iod

Daten von Poorvu et al. (38), zusätzlich von Meistrich et al. (8), Vakalopoulos et al. (11), Traila et al. (39) und Zang et al. (40).

BEACOPP: Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazin, Prednison; VAC: Vincristin, Actinomycin D, Cyclophosphamid; PEB: Cisplatin, Etoposid, Bleomycin; PEI: Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid; VIDE: Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin, Etoposid; CHOP: Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison.

Modifiziert nach Lackamp et al. (35).

2.3.2 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung erfolgte eine statistische Beratung durch das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité. Die pseudonymisierten Daten wurden in IBM SPSS Statistics übertragen und anschließend ausgewertet. Einige Berechnungen wurden zudem in Microsoft Excel durchgeführt. Es wurde vor allem deskriptive Statistik angewandt, um die Studienergebnisse zu untersuchen. Dabei wurden nominalskalierte Variablen prozentual und metrische Variablen mithilfe von Median und Interquartilsabstand dargestellt. Bei fehlenden Daten ist die Anzahl der fehlenden Werte jeweils aufgeführt und diese aus den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Einzelne fehlende Datumsangaben wurden jeweils mit dem ersten Tag des Monats bzw. dem ersten Monat des Jahres ersetzt. Keine der untersuchten Variablen folgte einer Normalverteilung, sodass ausschließlich nicht-parametrische Tests angewandt wurden, um Vergleiche zwischen verschiedenen Patientengruppen ziehen zu können (Mann-Whitney-U-Test und Chi-Quadrat-Test). Für die statistische Testung wurden die Diagnosegruppen in adäquate Obergruppen eingeteilt. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt.

3. Ergebnisse

Einige der dargestellten Ergebnisse und Abbildungen finden sich in der Originalpublikation wieder und werden im folgenden Abschnitt in modifizierter Form dargestellt und ergänzt (35).

3.1 Charakteristika und Diagnosen der Studienteilnehmer

Die Studie umfasste insgesamt 99 Patienten. Zum Zeitpunkt der Studienauewertung (01.12.2020) lag das mediane Alter der Teilnehmer bei 38,0 Jahren (IQR: 31,0 – 46,0 Jahre), zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei 27,0 Jahren (IQR: 20,0 – 36,0 Jahre) und am Tag der jeweiligen ersten Kryokonservierung bei 29,0 Jahren (IQR: 20,0 - 36,0 Jahre). Insgesamt 13 Patienten (13,1%) waren zum Zeitpunkt ihrer Kryokonservierung minderjährig - der jüngste von ihnen war 14 Jahre alt. Unter den Studienteilnehmern gaben 45 Patienten (47,4%) an verheiratet, 32 Patienten (33,7%) ledig, 16 Patienten (16,8%) in Partnerschaft und ein Patient (1,1%) verwitwet zu sein. Ein weiterer Patient (1,1%) gab einen anderen Familienstand an. Von vier Patienten war der Familienstand unbekannt. 44 Patienten (46,3%) berichteten leibliche Kinder, ein Patient (1,1%)

ausschließlich nicht leibliche Kinder und ein weiterer Patient (1,1%) eine schwangere Partnerin zum Zeitpunkt der Studiendurchführung zu haben. Weitere 49 Patienten (51,6%) waren kinderlos und vier Patienten stellten keine Informationen bezüglich ihrer Kinder zur Verfügung.

In Abbildung 2 sind die einzelnen Diagnosegruppen der Studienteilnehmer dargestellt. Der überwiegende Anteil (91,9%) litt an onkologischen Erkrankungen. Alle nicht-onkologischen Diagnosen (8,1%) waren Autoimmunerkrankungen. Das meistdiagnostizierte Lymphom war Morbus Hodgkin (57,7%), die häufigsten Sarkomarten Ewing- (33,3%) und Osteosarkome (33,3%) und die häufigsten Leukämieformen Chronische Myeloische (42,9%) und Akute Lymphatische Leukämien (28,6%). Unter den Patienten mit anderen Krebserkrankungen befanden sich jeweils ein Patient (14,3%) mit Kolorektalem Karzinom, Germinom, mediastinalem Keimzelltumor, Lungenkarzinom, Pinealoblastom, Medulloblastom und Schilddrüsenkarzinom. 24 Patienten (27,3%) berichteten, ein Rezidiv ihrer Erkrankung erlitten zu haben und 21 Patienten (22,3%) gaben an, zum Zeitpunkt der Studiendurchführung weiterhin unter ihrer Erkrankung zu leiden.

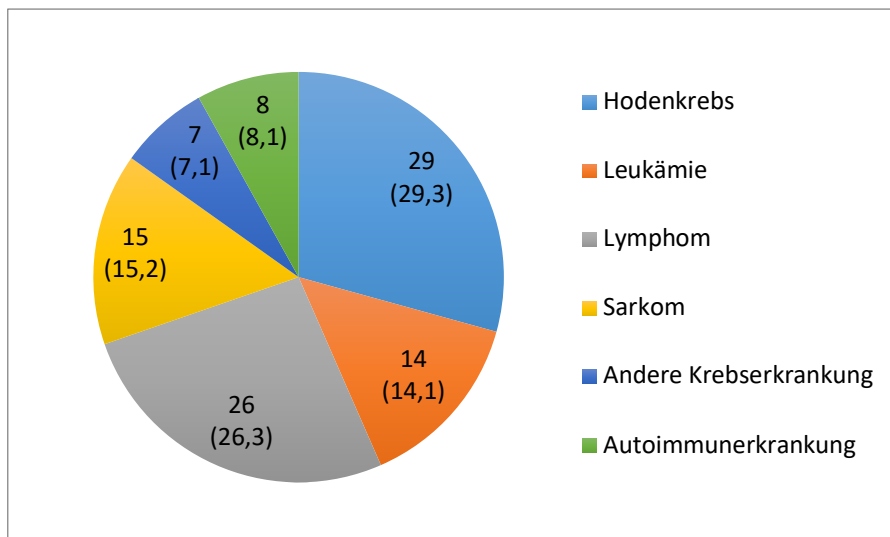


Abbildung 2: Diagnosegruppen der Studienteilnehmer; angeben als Anzahl der Patienten (%). Modifiziert nach Lackamp et al. (35).

3.2 Gonadotoxische Therapien der Studienteilnehmer

Bei 94 Patienten (94,9%) konnte die Fertilitätsprotektion in Form einer Kryokonservierung von reproduktivem Material wie empfohlen vor Therapiebeginn durchgeführt werden. Die anderen fünf Patienten (5,1%) konservierten erst nach Therapiebeginn oder teilweise durchgeführter Therapie. Darunter befanden sich drei

Patienten (3,0%) mit Hodenkrebs, die bereits orchiektomiert waren und die Fertilitätsprotektion vor adjuvanter Chemotherapie durchführten. Weiterhin befand sich unter ihnen ein Patient mit Sarkom (1,0%), der nach Initialisierung der Chemotherapie Material kryokonservierte, und ein Patient mit Leukämie (1,0%), der nach erfolgter Chemotherapie und vor Beginn seines Konditionierungsregimes für eine HSZT Spermien asservierte.

98 Studienteilnehmer (99,0%) erhielten eine oder mehrere der folgenden gonadotoxischen Therapieformen: Zytostatische Therapie (Chemo- oder Immuntherapie), gonadale Radiatio, Orchiektomie und/oder Konditionierungstherapie für eine HSZT (autolog oder allogene) bestehend aus Hochdosis-Chemotherapie und/oder Ganzkörperbestrahlung. Ein Patient (1,0%) führte die für ihn geplante gonadotoxische Therapie nicht durch und wurde von allen Analysen, die die Therapieform beinhalteten, exkludiert. 39 Patienten (39,8%) erhielten mehr als eine gonadotoxische Therapieform. Insgesamt 89 Patienten (90,8%) wurden im Rahmen ihres Therapieregimes – ausschließlich oder neben weiteren Therapieformen – mit Zytostatika behandelt, entweder als Chemotherapie zur Behandlung einer Krebserkrankung oder als Immuntherapie zur Behandlung einer Autoimmunerkrankung. Eine Radiotherapie wurde bei 13 Patienten (13,3%) durchgeführt – darunter drei Ganzkörperbestrahlungen, 9 gonadale Bestrahlungen und eine Radiojodtherapie. Die Bestrahlung anderer oder unbekannter Körperregionen (22 Patienten) wurde nicht als gonadotoxische Therapie mit in die Analysen aufgenommen.

Abbildung 3 stellt die Verteilung der Patienten auf die vier Therapiekategorien auf Grundlage der Gonadotoxizität ihrer Behandlungen dar. Weiterhin sind die verschiedenen Therapieformen und die zugehörige Anzahl an Patienten in den einzelnen Therapiekategorien aufgeführt. Von 10 Patienten war das in ihrer Behandlung verwendete Zytostatikum unbekannt, sodass eine Kategorisierung nicht möglich war.

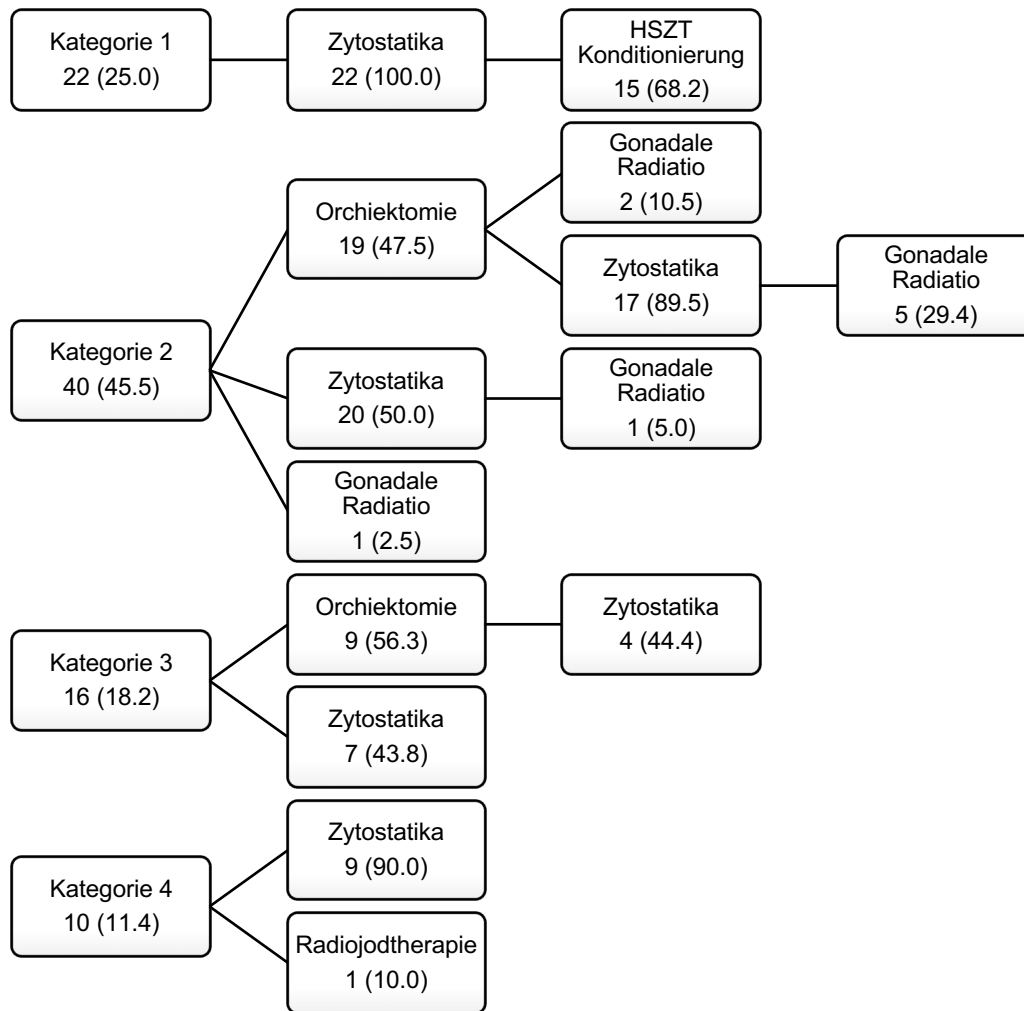


Abbildung 3: Verteilung der Therapiekategorien und jeweiligen gonadotoxischen Behandlungsformen in der Studienpopulation; angegeben als Anzahl der Patienten (%). Modifiziert nach Lackamp et al. (35).

3.3 Spermienqualität zum Zeitpunkt der Kryokonservierung

Die von der Kryobank der Charité zur Verfügung gestellten Kryokonservats-Befunde waren in 82 Fällen (95,6%) Analysen von Ejakulat und in drei Fällen (3,5%) Analysen von Hodengewebe. In Tabelle 2 sind die jeweiligen Mediane der Spermienkonzentration, progressiven und Gesamtmotilität, des Volumens, pH-Werts und der Vitalität der verfügbaren Spermioграмme von verschiedenen Patientengruppen aufgeführt. Die Spermioграмme von Patienten, die erst nach Therapiebeginn Spermien kryokonservierten, zeigten eine grenzwertige mediane progressive Motilität (32,0%) und eine leicht erniedrigte mediane Gesamtmotilität (38,0%). Die Spermienparameter der Patienten, die vor Therapiebeginn ihr Material asservierten, entsprachen nach WHO Leitlinien der Norm, jedoch wurde bei diesen Patienten in den statistischen Analysen eine signifikant niedrige

Spermienkonzentration bei Patienten mit malignen Hodentumoren (18,0 Millionen/ml (IQR: 9,7 – 37,8 Millionen/ml)) im Vergleich zu Patienten mit anderen Diagnosen (54,2 Millionen/ml (IQR: 23,0 – 110,2 Millionen/ml), Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,003$) ermittelt (37). Bezüglich progressiver und Gesamtmotilität, Volumen, pH-Wert und Vitalität wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Diagnosegruppen festgestellt (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,656$, $p = 0,688$, $p = 0,656$, $p = 0,781$, $p = 0,873$). In den drei Befunden von Hodengewebe waren in zwei Analysen immotile Spermien und in einer Analyse keine Spermien mikroskopisch nachweisbar.

3.4 Spermienutzung

Insgesamt 17 Patienten (17,2%) verwendeten ihr kryokonserviertes Material zur assistierten Reproduktion. Tabelle 3 zeigt verschiedene Charakteristika der Patienten, die ihre Spermien nutzten. Im Vergleich zu den Patienten, die ihr Material nicht verwendeten (27,0 Jahre (IQR: 20,0 – 35,3 Jahre)), waren die Nutzer zum Zeitpunkt der Kryokonservierung älter, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,135$). Ein Patient (5,9%) kryokonservierte seine Spermien erst nach Therapiebeginn. Er war an Hodenkrebs erkrankt und führte die Kryokonservierung erst nach erfolgter Orchiektomie und vor adjuvanter Chemotherapie durch. Wie in Tabelle 3 zu erkennen, verwendete nur ein Patient (5,9%) sein konserviertes Material nach mehr als 10 Jahren Verwahrungszeitraum. Er war zum Zeitpunkt der Kryokonservierung 17 Jahre alt. Von den Patienten, die ihr Kryokonservat nicht für eine assistierte Reproduktion verwendeten, gab ein Patient (1,3%) an, seine Spermien von der Kryobank abgefordert, allerdings nicht im Zuge einer ART genutzt zu haben. Weiterhin gaben 26 (34,7%) der Patienten, die keinen Gebrauch von ihren asservierten Spermien machten, eine mögliche Nutzung in Zukunft an.

Tabelle 2: Spermienparameter verschiedener Patientengruppen

Patientengruppe	Spermienkonzentration (10 ⁶ /ml)	Progressive Motilität (%)	Gesamtmotilität (%)	Volumen (ml)	pH-Wert	Vitalität (%)
Alle Patienten	37,8 (17,4 – 82,2)	46,5 (32,0 – 55,0)	56,0 (41,5 – 65,0)	3,0 (2,0 – 4,3)	7,7 (7,5 – 7,7)	68,0 (60,8 – 76,0)
Kryokonservierung vor Therapiebeginn	37,9 (17,3 – 93,2)	47,0 (32,0 – 55,0)	56,0 (43,3 – 65,0)	3,0 (2,0 – 4,1)	7,7 (7,5 – 7,7)	68,0 (61,5 – 76,0)
Kryokonservierung nach Therapiebeginn	20,5 (13,2 – 56,6)	32,0 (24,0 – 55,0)	38,0 (35,0 – 63,5)	3,0 (1,7 – 5,7)	7,7 (7,5 – 7,9)	66,0 (47,5 – 85,5)
Hodenkrebs (Kryokonservierung vor Therapiebeginn)	18,0 (9,7 – 37,8)	48,0 (23,0 – 55,0)	56,0 (35,0 – 65,0)	3,0 (2,0 – 4,1)	7,7 (7,5 – 7,7)	70,0 (58,0 – 76,0)
Nicht-Hodenkrebs (Kryokonservierung vor Therapiebeginn)	54,2 (23,0 – 110,2)	46,0 (32,0 – 55,8)	56,0 (44,0 – 65,5)	2,9 (1,9 – 4,2)	7,7 (7,5 – 7,7)	68,0 (62,0 – 75,0)
Leukämie	43,0 (22,7 – 118,2)	44,0 (33,0 – 54,0)	54,0 (47,0 – 64,0)	2,3 (1,8 – 3,8)	7,7 (7,7 – 7,9)	73,0 (60,0 – 81,0)
Lymphom	33,0 (14,0 – 91,8)	50,0 (30,0 – 54,8)	56,5 (39,8 – 66,0)	3,0 (1,8 – 4,3)	7,7 (7,5 – 7,9)	65,0 (61,0 – 73,5)
Sarkom	58,8 (19,1 – 171,0)	45,0 (31,5 – 50,5)	55,0 (42,5 – 63,5)	3,0 (1,9 – 3,8)	7,7 (7,5 – 7,7)	67,0 (62,5 – 71,5)
Andere Krebserkrankung	51,0 (22,7 – 138,0)	32,5 (28,0 – 59,5)	43,0 (30,0 – 62,0)	2,6 (1,3 – 4,7)	7,7 (7,4 – 7,7)	62,0 (55,0 – 74,0)
Autoimmunerkrankung	97,6 (68,7 – 224,6)	61,5 (52,5 – 68,3)	66,5 (59,3 – 73,8)	3,9 (2,4 – 5,5)	7,6 (7,4 – 7,8)	75,5 (74,8 – 85,8)

Angegeben als Median (IQR).

Modifiziert und erweitert nach Lackamp et al. (35).

Tabelle 3: Charakteristika der Patienten, die ihr Kryokonservat verwendeten

Charakteristikum	Maßangabe
Alter bei Kryokonservierung in Jahren (Median (IQR))	32,0 (27,0 – 36,5)
Verwahrungsdauer des Kryokonservats in Monaten (Median (IQR))	26,0 (16,5 – 65,5)
Zeitpunkt der Verwendung des Kryokonservats (Anzahl der Patienten (%))	
Im ersten Jahr	2 (11,8)
Im zweiten Jahr	6 (35,3)
Innerhalb der ersten 5 Jahre	13 (76,5)
Innerhalb der ersten 10 Jahre	16 (94,1)
Kryokonserviertes Material (Anzahl der Patienten (%))	
Ejakulierte Spermien	13 (100)
N.a.	4
Zeitpunkt der Kryokonservierung (Anzahl der Patienten (%))	
Vor Therapiebeginn	16 (94,1)
Nach Therapiebeginn	1 (5,9)

3.4.1 Diagnosen und Therapieformen der Patienten, die ihr Kryokonservat verwendeten

Die häufigsten Diagnosen unter den Patienten, die ihr Spermienasservat verwendeten, waren Lymphome (35,3%) und maligne Hodentumore (29,4%). Ferner waren drei von ihnen (17,6%) an Sarkomen und jeweils ein Patient (5,9%) an einer Leukämie, einer anderen Krebserkrankung und einer Autoimmunerkrankung erkrankt. Die Verteilung der Diagnosen unter den Patienten, die ihr Material nicht nutzten, war wie folgt: 24 Patienten (29,3%) mit Hodenkrebs, 20 Patienten (24,4%) mit Lymphom, 13 Patienten (15,9%) mit Leukämie, 12 Patienten (14,6%) mit Sarkom, 6 Patienten (7,3%) mit anderer Krebserkrankung und 7 Patienten (8,5%) mit Autoimmunerkrankung. Kein signifikanter Zusammenhang von Spermienutzung und Diagnosegruppe (Hodenkrebs im Vergleich zu Nicht-Hodenkrebs) konnte gezeigt werden (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,991$). In Abbildung 4 sind die Therapiekategorien und einzelnen fertilitätsschädigenden Behandlungsformen der Patienten, die von ihrem konservierten Material Gebrauch machten, dargestellt. Von zwei Patienten waren die entsprechenden Daten nicht verfügbar. Unter den Patienten, die ihr Kryokonservat nicht nutzten, erhielten 16 Patienten (21,9%) Therapien mit hoher (Kategorie 1), 35 Patienten (47,9%) Therapien mit mittlerer (Kategorie 2), 13 Patienten (17,8%)

Therapien mit niedriger (Kategorie 3) und 9 Patienten (12,3%) Therapien mit potenzieller Gonadotoxizität (Kategorie 4).

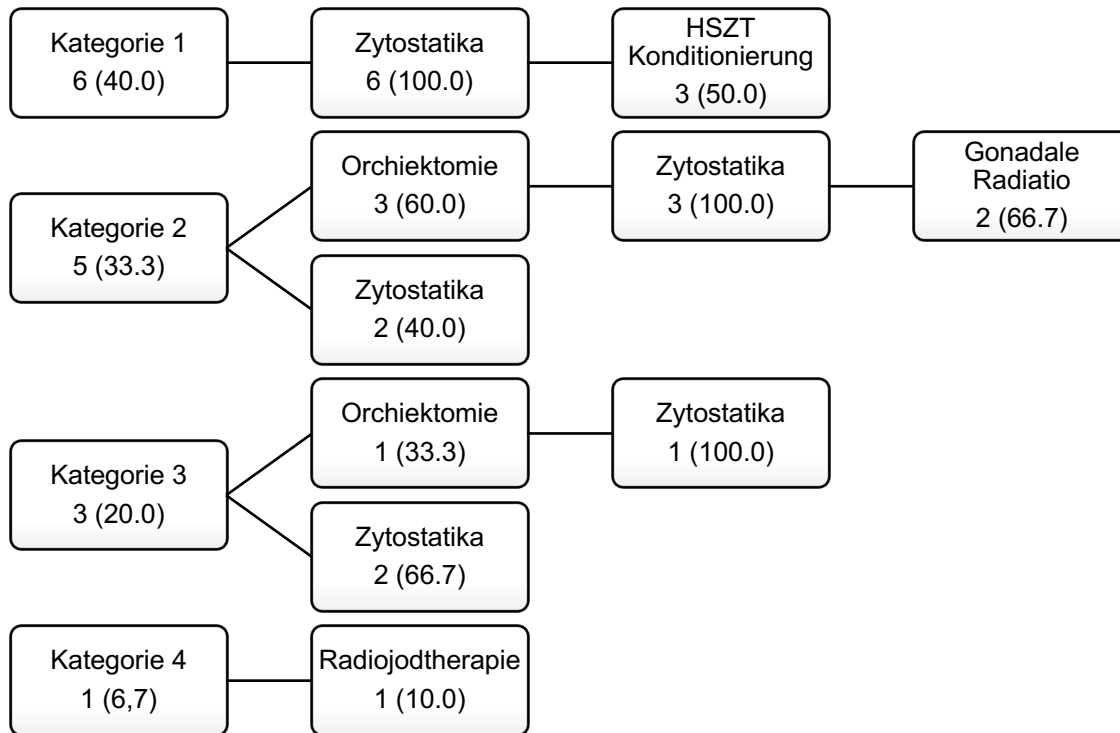


Abbildung 4: Verteilung der Therapiekategorien und jeweiligen gonadotoxischen Behandlungsformen unter den Patienten, die ihr Kryokonservat verwendeten; angegeben als Anzahl der Patienten (%).

3.4.2 ART Resultate

Von den 17 Patienten, die ihre Asservate verwendeten, erreichten 10 Patienten eine Vaterschaft von mindestens einem mithilfe von ART gezeugten Kind. Somit betrug die kumulative Lebendgeburtenrate pro Paar 58,8%. Die weiteren sieben Patienten blieben nach ein- oder mehrmaligen Versuchen der Kindeszeugung mit Nutzung des Kryokonservats erfolglos. Patienten mit Vaterschaft durch assistierte Reproduktion verwahrten ihr Material im Median 20,0 Monate (IQR: 17,3 – 42,5 Monate), wohingegen Patienten mit frustranen ART-Prozeduren eine mediane Verwahrungsdauer von 44,0 Monaten (IQR: 15,0 – 116,0 Monate) verzeichneten. Dieser Unterschied war nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,261$). Die längste Lagerungsdauer, nach der eine erfolgreiche Kindeszeugung mithilfe von ART resultierte, war 78 Monate.

Insgesamt wurden unter Verwendung der kryokonservierten Spermien 21 mithilfe von ART gezeugte Kinder geboren. Darunter war ein Kind, das mit Spermien gezeugt wurde, die nicht in der Kryobank der Charité gelagert wurden. Weitere Charakteristika der Neugeborenen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Charakteristika der mithilfe von ART gezeugten Neugeborenen

Charakteristikum	Maßangabe
Mehrlingsschwangerschaften (Anzahl der Kinder (%))	
Einling	9 (42,9)
Zwilling	12 (57,1)
Alter der Mutter bei Geburt in Jahren (Median (IQR))	35,0 (32,0 – 36,0)
Gesundheitsstatus (Anzahl der Kinder (%))	
Gesund, normal entwickelt	18 (85,7)
Erkrankt (Pulmonarklappenstenose)	1 (4,8)
Verstorben	2 (9,5)
Komplikationen bei Geburt (Anzahl der Kinder (%))	
Keine Komplikationen	12 (57,1)
Komplikationen	9 (42,9)
Geburtsgewicht in Gramm (Median (IQR))*	
Einlinge	3050,0 (2882,5 – 3355,0)
Zwillinge	1950,0 (1470,0 – 2330,0)
Geburtsgröße in cm (Median (IQR))*	
Einlinge	52,0 (50,5 – 53,0)
Zwillinge	45,5 (41,5 – 47,5)

*Perzentilen konnten aufgrund fehlenden Gestationsalters nicht berechnet werden. Teile der Tabelle wurden modifiziert übernommen von Lackamp et al. (35).

3.5 Natürliche Fertilität vor und nach Therapie

31 Patienten (33,7%) gaben an, mindestens ein Kind durch natürliche Konzeption vor oder nach gonadotoxischer Therapie gezeugt zu haben. Unter den 12 Patienten (13,1%) mit natürlich gezeugten Kindern vor Therapiebeginn waren drei Patienten, die ihr kryokonserviertes Material zu einem späteren Zeitpunkt erfolgreich zur assistierten Reproduktion verwendeten. Unter den 9 Patienten (9,8%) mit natürlich gezeugten Kindern nach Therapie und den 10 Patienten (10,9%) mit natürlich gezeugten Kindern sowohl vor als auch nach Therapie war jeweils ein Patient, der sein Kryokonservat für ART verwendete, die frustriert blieben. Die Therapiekategorien der 19 Patienten

(20,7%) mit mindestens einem natürlich gezeugten Kind nach Therapie waren folgendermaßen verteilt:

- Kategorie 1 (hohe Gonadotoxizität): 2 Patienten (12,5%)
- Kategorie 2 (mittlere Gonadotoxizität): 5 Patienten (31,3%)
- Kategorie 3 (niedrige Gonadotoxizität): 4 Patienten (25,0%)
- Kategorie 4 (potenzielle Gonadotoxizität): 5 Patienten (31,3%)

Von 3 Patienten waren die entsprechenden Daten nicht verfügbar.

Zusammen wurden 24 natürlich nach Therapie gezeugte Kinder – darunter ein Zwillingsspaar – geboren. Das mediane Geburtsgewicht der Einlinge lag bei 3570,0 Gramm (IQR: 3140,0 – 3910,0 Gramm) und die mediane Geburtsgröße bei 52,0 cm (50,0 – 54,0 cm). Die Zwillinge wogen bei Geburt jeweils 1860 und 1880 Gramm und waren je 44,5 cm groß. Alle Kinder wurden als gesund und normal entwickelt angegeben.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe einer retrospektiven Fragebogenstudie die Erfahrungen und reproduktiven Ergebnisse von männlichen onkologischen und nicht-onkologischen Patienten, die Kryokonservierungen an der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchführen ließen, zu erfassen und in einen Zusammenhang mit den erfolgten gonadotoxischen Behandlungen zu setzen. Weiterhin wurde die Nutzungsrate der Kryokonservate ermittelt und Charakteristika der entsprechenden Patienten evaluiert. Im Folgenden werde ich die Beobachtungen unserer Forschung mit den Ergebnissen existierender Studien vergleichen, sich ergebende klinische Anwendungen erläutern, weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen diskutieren und Limitationen der Arbeit darstellen.

4.1 Vergleich der Studienergebnisse mit existierenden Forschungen

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse in Bezug auf allgemeine Charakteristika der Kryokonservierungspatienten wie die Distribution der Krebserkrankungen (29,3% Hodenkrebs, 40,4% Lymphom und Leukämie), das mediane Alter zum Studienzeitpunkt sowie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (32,0 und 27,0 Jahre) und den Familienstand (47,4% verheiratet) stimmen mit den bereits in vorangegangenen Forschungen präsentierten Analysen überein (4, 15, 22, 24, 26-29).

Zudem wurde die Beobachtung zahlreicher Studien, dass Patienten mit malignen Hodentumoren bereits vor Therapiebeginn eine geringere mediane Spermienkonzentration als Patienten mit anderen Diagnosen aufweisen, durch unsere Studie bestätigt (4, 9, 24, 26, 27, 29). Im Vergleich zu bestehenden Untersuchungen war die Rate an Verwendungen des Kryokonservats mit 17,2% der Patienten höher als die von anderen Kliniken berichteten 3 – 10% (4, 15, 22-24, 29). Jedoch existieren auch Studien mit deutlich höheren Nutzungsraten. Beispielsweise beobachteten Hammarberg et al. in ihrer Kohorte eine Nutzungsrate von 27%. Ihre Daten resultierten wie die unseren aus einer Fragebogenstudie, sodass ein möglicher Self-Selection Bias bedacht werden sollte (28). Die Vermutung, dass die Spermienutzungsrate mit Verlängerung des Beobachtungszeitraums auf über 10 Jahre ansteigen würde, wird durch unsere Ergebnisse nicht unterstützt, da nur einer unserer Patienten sein Kryokonservat nach mehr als 10 Jahren verwendete (25, 26, 41). Die berichteten Erfolgsraten von assistierten Reproduktionen mit kryokonservierten Spermien weisen in der Literatur eine große Spannweite auf und unterscheiden sich je nach angewandter ART (1, 14, 19, 20). Die Rate an mindestens einer erreichten Vaterschaft mithilfe von ART liegt in unserer Studie bei 58,8% und ähnelt damit den Beobachtungen von van Casteren et al. (54%) (26). Aufgrund der stetigen Verbesserung der Methoden der assistierten Reproduktion ist heutzutage eine Fertilisation durch ICSI bereits mit einem einzelnen Spermatozoon möglich, sodass auch für Patienten mit wenig kryokonserviertem Material Chancen auf eine Vaterschaft bestehen (30). Die längste Kryokonservierungsdauer, die in einer Vaterschaft resultierte, betrug in unserer Studie 6,5 Jahre. Mit diesem Ergebnis unterstützen wir Studien, die erfolgreiche Kindeszeugungen auch nach vielen Jahren oder sogar Jahrzehnten berichteten, und bestätigen, dass Kryokonservierungen von Spermien als Langzeit-Fertilitätserhalt geeignet sind (4).

4.2 Klinische Anwendungen

Aus der vorliegenden Forschung ergeben sich einige Erkenntnisse, aus denen sich eine klinische Anwendung ableiten lässt. An erster Stelle bestätigt unsere Studie, dass Kryokonservierungen von Spermien eine erfolgreiche und effektive Methode zur Fertilitätsprotektion darstellen und daher allen männlichen Patienten in reproduktivem Alter vor Durchführung einer gonadotoxischen Therapie angeboten werden sollte (14). Eine bisher wenig berücksichtigte Gruppe ist in diesem Zusammenhang die Gruppe

der Patienten mit nicht-onkologischen Diagnosen, die beispielsweise eine zytostatische Immuntherapie oder HSZT benötigen (3). In unserer Studie nutzte ein Patient mit einer Autoimmunerkrankung sein Kryokonservat zur Kindeswunscherfüllung, womit die Wichtigkeit des Angebots einer Kryokonservierung für diese Patientengruppe unterstrichen wird. Zudem weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass Patienten, die eine äußerst stark sterilisierende Therapie – beispielsweise ein Konditionierungsregime vor einer HSZT – erhalten, ihr Kryokonservat häufiger verwenden als Patienten, die mit einer weniger fertilitätsschädigenden Behandlung therapiert werden. Somit stellt das gonadotoxische Potenzial der verabreichten Therapie einen möglichen prädiktiven Faktor für die Spermiennutzung dar und sollte in die Diskussion mit dem Patienten über die Durchführung einer Fertilitätsprotektion sowie in Überlegungen zu ökonomischen Aspekten von Kryokonservierungsprogrammen mit einfließen. Jedoch sind weitere Untersuchungen mit größeren Studienpopulationen zur Bestätigung unserer Beobachtungen nötig. Des Weiteren zeigen unsere Daten, dass etwa ein Fünftel der Studienteilnehmer (20,7%) Kinder durch natürliche Reproduktion nach erfolgter Therapie zeugen konnte und ihre Spermatogenese somit erhalten bleiben oder sich regenerieren konnte. Dies war vor allem der Fall, wenn die Behandlung nur wenig oder potenziell gonadotoxisch war und stellt daher besonders für die Patienten, denen eine Therapie mit geringer Gonadotoxizität bevorsteht, ein ermutigendes Ergebnis dar. Entsprechende Informationen könnten in Patientengespräche zur Fertilitätsprotektion eingebunden werden. Nichtsdestotrotz werden auch in diesem Aspekt weitere Forschungen benötigt (28).

4.3 Zukünftige Perspektiven und weiterführende Fragestellungen

Trotz zahlreicher existierender Forschungen auf dem Gebiet der Onkofertilität, sind viele Fragen weiterhin ungeklärt. Auf einige Aspekte, die in zukünftigen Studien weiter untersucht werden könnten, möchte ich im Folgenden eingehen.

Innerhalb der letzten Jahrzehnte nahm der Einsatz von „targeted therapies“ in der Behandlung von Krebserkrankungen immer weiter an Bedeutung zu. Zu diesen moderneren Substanzen gehören unter anderem monoklonale Antikörper oder sogenannte „small molecule“ Inhibitoren wie beispielsweise Proteasom- oder Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI). Jedoch sind Studien, die den Effekt der „targeted therapies“ auf das männliche reproduktive System analysieren, bisher stark limitiert

(8). Die meisten der bisher durchgeführten Studien zu diesem Thema befassen sich mit TKIs. TKIs wie zum Beispiel Imatinib werden mitunter zur Therapie von Chronischen Myeloischen Leukämien eingesetzt. Bislang wurden einige tierexperimentelle Studien sowie Fallberichte zu den fertilitätseinschränkenden Effekten von Imatinib veröffentlicht. In Experimenten mit männlichen Nagetieren wurden bei Gabe von Imatinib eine eingeschränkte Spermatogenese, ein niedrigeres testikuläres Gewicht, eine reduzierte Testosteronkonzentration im Serum und ein Verlust an Leydig Zellen beobachtet. Zudem wurden bei postnatalen Ratten Störungen der Hodenentwicklung und der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse nachgewiesen (42, 43). Einzelne Fallstudien mit menschlichen Probanden zeigten konträre Ergebnisse. Einige Autoren konnten schwere Oligozoospermien bei präpubertären Jungen nach langjähriger Einnahme von Imatinib beobachten, andere wiederum berichteten, dass trotz Verlusten an sich differenzierenden Spermatogonien die Spermatogenese nicht gestört wurde (42-44). Insgesamt scheint die Gabe von Imatinib im Erwachsenenalter weniger schädliche Effekte auf das reproduktive System nach sich zu ziehen, wohingegen die Verabreichung des Medikaments vor der Pubertät zu schweren Einschränkungen der Fertilität führen könnte (8, 43). Zu anderen „targeted therapies“ gibt es bisher kaum oder gar keine Studien, sodass keine Aussagen über ihre Gonadotoxizität getroffen werden können (8). Im Vergleich zu den klassischen Chemotherapeutika könnten sie ein deutlich niedrigeres fertilitätsschädigendes Potenzial besitzen und als Konsequenz eine geringere Notwendigkeit für eine prätherapeutische Fertilitätsprotektion aufweisen. Da die Verwendung von „targeted therapies“ in der Krebstherapie innerhalb der nächsten Jahre vermutlich weiter steigen wird, sollte die Untersuchung ihrer gonadotoxischen Effekte Gegenstand zukünftiger Forschungen sein.

Die Kryokonservierung von ejakulierten Spermien fungiert seit Jahrzehnten als Standardmethode zum Fertilitätserhalt. Jedoch ist die Gewinnung eines entsprechenden Ejakulats nicht immer möglich. Für präpubertäre Jungen besteht die Möglichkeit der Kryokonservierung von spermatogonialen Stammzellen mittels Extraktion aus testikulärem Gewebe. Allerdings ist diese Methode noch immer experimentell und wird daher nur im Rahmen von klinischen Studien oder nach einem anerkannten experimentellen Protokoll empfohlen (7, 14). Die Prozedur besteht aus der Gewinnung von spermatogonialen Stammzellen aus testikulärem Gewebe und eine späteren Autotransplantation der Stammzellen zur Wiederherstellung der

Spermatogenese. Bislang existieren in der Literatur nur Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien. Außerdem weist die Methode eine hohe Invasivität sowie ein mögliches Risiko der Reimplantation von malignen Zellen durch das Autotransplantat auf (45). In unserer Patientenkohorte waren drei Patienten, die diese Methode angewandt hatten. Keiner von ihnen verwendete das Kryokonservat bis zum Studienzeitpunkt. Obwohl seit über zwei Jahrzehnten Forschungen zur Kryokonservierung von Hodengewebe durchgeführt werden, konnten bisher noch keine erfolgreichen Ergebnisse aus Studien mit menschlichen Patienten veröffentlicht werden. Weitere Untersuchungen sind dringend nötig, um die Effektivität der Methode evaluieren zu können (7).

Weiterhin möchte ich einige Ideen diskutieren, die die klinische Praxis der Fertilitätsprotektion männlicher Patienten in Deutschland weiter verbessern könnten. Eine europäische Studie ergab, dass Dreiviertel der jugendlichen Krebspatient*innen in Deutschland Informationen über eine eventuelle Infertilität vor Initiierung einer gonadotoxischen Therapie erhielt und zu der Möglichkeit des Fertilitätserhalts beraten wurde (jeweils 75,6% und 71,4%). Nichtsdestotrotz fühlten sich nur 56,4% dieser Patient*innen genügend informiert, um über eine entsprechende Fertilitätsprotektion entscheiden zu können (46). Auch eine schweizerische Studie, die über Erfahrungen erwachsener Patienten mit malignen Hodentumoren berichtete, zeigte, dass die meisten Patienten über eine potenzielle Infertilität nach der Behandlung (87,6%) und die Möglichkeit einer Kryokonservierung von Spermien (77,1%) informiert wurden. Allerdings erhielt nur etwa ein Viertel (23,9%) der Patienten schriftliche Informationen und ein weiteres Viertel (23,5%) gab an, neutral, unzufrieden oder sehr unzufrieden mit der entsprechenden Beratung zu sein. Studien demonstrierten, dass schriftliche Informationen die Zufriedenheit von Patient*innen deutlich erhöhen können (19). Des Weiteren könnte die Einführung eines entsprechenden standardisierten Bildungsprogramms in Deutschland sinnvoll sein. Kelvin et al. untersuchten die Patient*innenzufriedenheit vor und nach der Durchführung eines Bildungsprogramms zu Krebs und Fertilität und zeigten, dass die Zufriedenheit der Patient*innen nach Erhalt detaillierter Informationen merklich stieg. Das Programm beinhaltete sowohl Informationen für Patient*innen als auch für behandelnde Ärzt*innen (47). Die Etablierung eines entsprechenden Programms in Deutschland könnte somit einen erheblichen Gewinn für alle Beteiligten darstellen.

4.4 Limitationen und Stärken der Arbeit

Die vorliegende Arbeit weist einige Schwächen und Limitationen auf, die ich im Folgenden genauer beleuchten möchte. Trotz der initial großen Anzahl an Kryokonservierungspatienten (1089 Patienten), die in der Liste der Kryobank der Charité angegeben wurden, war die Studienpopulation mit 99 eingeschlossenen Teilnehmern relativ klein. Daraus resultierend war die Anzahl an Spermienutzungen und mithilfe von ART gezeugten Neugeborenen ebenfalls limitiert. Da die Antwortrate der Fragebogenstudie bei nur 21,5% lag, sollte sowohl ein möglicher Self-Selection als auch Non-Response Bias bedacht werden. Die Antworten der Studienteilnehmer weichen somit eventuell von denen ab, die die Patienten gemacht hätten, die den Fragebogen nicht beantworteten, und sind somit möglicherweise nicht repräsentativ für die Gesamtheit der Kryokonservierungspatienten. Eine weitere Limitation stellt das Fehlen von Daten bezüglich der Spermienqualität nach erfolgter gonadotoxischer Behandlung und detaillierter Informationen zu den angewandten ART-Prozeduren der Patienten dar. Auch das Erheben von Versuchen der Kindeswunscherfüllung durch natürliche Zeugung nach Therapie wäre sinnvoll gewesen. Limitationen des Studiendesigns bestehen darin, dass die Daten retrospektiv erhoben, der Studienfragebogen nicht validiert und die Informationen größtenteils durch die Patienten selbst bereitgestellt wurden. Zudem wurden nicht alle Fragen von den Studienteilnehmern beantwortet, sodass für einige Variablen fehlende Werte existierten und die Fallzahlen entsprechend reduziert waren. Der Großteil der fehlenden Werte gehörte dabei zu den Fehlern der Art „missing completely at random“ oder „missing at random“. Aufgrund der dargestellten Limitationen der Forschung sind die Ergebnisse nur eingeschränkt für die Grundgesamtheit repräsentativ und eher hinweisend als generalisierbar.

Nichtsdestotrotz resultieren aus der beschriebenen Forschung einige interessante neue Erkenntnisse, sodass sie einen Zugewinn für den Fachbereich darstellt. Die Studie stellt Daten aus einem Langzeitbeobachtungszeitraum von über 22 Jahren zur Verfügung. Studien mit einem ähnlichen oder sogar längeren Beobachtungszeitraum von Kryokonservierungspatienten sind in der Literatur limitiert (4, 15, 22-29, 32, 33, 41). Als eine der ersten Studien integrierten wir den Aspekt der natürlichen Reproduktion nach Therapie sowie die Art der fertilitätsschädigenden Behandlung und ihr entsprechendes gonadotoxisches Potenzial in unsere Studie und weiterführende Überlegungen (28, 31-34). Weiterhin stellten wir Charakteristika der mithilfe von ART

oder spontan gezeugten Neugeborenen dar und präsentierten erste Ergebnisse zu Erfahrungen von nicht-onkologischen Patienten, die vor gonadotoxischen Immuntherapien Kryokonservierungen durchführten.

5. Detaillierte Aufstellung meiner selbst erbrachten Leistungen

Die vorliegende Forschung führte ich eigenständig mit Unterstützung und Supervision durch meinen Betreuer, Prof. Dr. Philipp le Coutre, durch. Die ursprüngliche Idee des Forschungsprojekts entstand durch Prof. le Coutre und wurde durch eigene Ideen ergänzt. Der Kontakt zur Leiterin der Kryobank der Charité, Frau Dr. Ina Wilkemeyer, die uns eine Liste der männlichen Kryokonservierungspatienten für den entsprechenden Zeitraum zur Verfügung stellte, wurde ebenfalls durch Prof. le Coutre hergestellt. Gemeinsam erarbeiteten wir das Promotionsthema und konzipierten das Design unserer Studie. Ich führte eine ausführliche Literaturrecherche – ergänzt durch Recherchen der Co-Autor*innen der Publikation – durch, stellte zusammen mit Prof. le Coutre den Ethikantrag bei der Ethikkommission der Charité und entwarf die benötigten Studienunterlagen: Studieninformation für Patienten, Studienfragebogen und Einverständniserklärung. Zudem erstellte ich eine passwortgeschützte Patientendatenbank für alle gelisteten Kryokonservierungspatienten, erfasste die für den Fragebogenversand benötigten Patientendaten und führte die Vorbereitung und den Versand der Fragebögen über die Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumورimmunologie der Charité eigenständig durch. Ich verwaltete die zurückgesandten Fragebögen und erfasste alle Daten aus den beantworteten Fragebögen in einer pseudonymisierten Excel-Tabelle. Weiterhin ergänzte ich fehlende Angaben mit Daten aus dem Charité-internen SAP-System und analysierte mit Unterstützung von Frau Dr. Wilkemeyer die von ihr übermittelten Kryokonservats-Befunde der eingeschlossenen Studienteilnehmer. Alle personenbezogenen Daten wurde den Standards entsprechend streng vertraulich behandelt. Die statistische Auswertung der Studie führte ich selbstständig nach statistischer Beratung durch Frau Anna Pöhlmann vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité mithilfe von SPSS Statistics durch. Mit Unterstützung von Prof. le Coutre und allen weiteren Co-Autor*innen interpretierte ich die Ergebnisse und verfasste das Manuskript für die Veröffentlichung der Studie. Alle sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der Originalpublikation enthaltenen Texte, Tabellen und Abbildungen sind eigenständig von mir erstellt und von den Co-Autor*innen der Publikation überprüft und

gegebenenfalls korrigiert worden. Als korrespondierende Erstautorin war ich in Absprache mit Prof. le Coutre für den vollständigen Publikationsprozess verantwortlich und führte alle erforderlichen Überarbeitungen an dem Artikel bis zur Veröffentlichung durch. Alle Ergebnisse, die nicht Teil der Publikation waren und in der vorliegenden Arbeit präsentiert wurden – beispielsweise weiterführende Analysen von Spermienparametern, detailliertere Darstellungen von Patientencharakteristika oder weitere Abbildungen – basieren ausschließlich auf meinen eigenen Leistungen.

Literaturverzeichnis

1. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol.* 2003;170(4 Pt 1):1079-84.
2. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature.* 1953;172(4382):767-8.
3. Martinez F, International Society for Fertility Preservation E-AEWG. Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives. *Fertil Steril.* 2017;108(3):407-15 e11.
4. Stigliani S, Massarotti C, De Leo C, Maccarini E, Sozzi F, Cagnacci A, Anserini P, Scaruffi P. Fifteen Year Regional Center Experience in Sperm Banking for Cancer Patients: Use and Reproductive Outcomes in Survivors. *Cancers (Basel).* 2021;13(1):116.
5. Abdel-Razeq N, Ammar K, Mahadeen A, Mansour R, Abdalwahed H, Gammoh R, Al Hur A, Al-Hassan N, Abdel-Razeq H. Fertility counseling and sperm banking among adolescents and adults treated for cancer with curative intent in a developing country. *Support Care Cancer.* 2020;28(8):3915-9.
6. Nigam M, Aschebrook-Kilfoy B, Shikanov S, Eggener S. Increasing incidence of testicular cancer in the United States and Europe between 1992 and 2009. *World J Urol.* 2015;33(5):623-31.
7. Parekh NV, Lundy SD, Vij SC. Fertility considerations in men with testicular cancer. *Transl Androl Urol.* 2020;9(Suppl 1):S14-S23.
8. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril.* 2013;100(5):1180-6.
9. Tournaye H, Dohle GR, Barratt CL. Fertility preservation in men with cancer. *Lancet.* 2014;384(9950):1295-301.

10. Lampe H, Horwich A, Norman A, Nicholls J, Dearnaley DP. Fertility after chemotherapy for testicular germ cell cancers. *J Clin Oncol*. 1997;15(1):239-45.
11. Vakalopoulos I, Dimou P, Anagnostou I, Zeginiadou T. Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. *Hormones (Athens)*. 2015;14(4):579-89.
12. Joshi S, Savani BN, Chow EJ, Gilleece MH, Halter J, Jacobsohn DA, Pidala J, Quinn GP, Cahn JY, Jakubowski AA, Kamani NR, Lazarus HM, Rizzo JD, Schouten HC, Socie G, Stratton P, Sorrow ML, Warwick AB, Wingard JR, Loren AW, Majhail NS. Clinical guide to fertility preservation in hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(4):477-84.
13. Rovo A, Tichelli A, Passweg JR, Heim D, Meyer-Monard S, Holzgreve W, Gratwohl A, De Geyter C. Spermatogenesis in long-term survivors after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with age, time interval since transplantation, and apparently absence of chronic GvHD. *Blood*. 2006;108(3):1100-5.
14. Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS, Wallace WH, Wang ET, Loren AW. Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(19):1994-2001.
15. Depalo R, Falagario D, Masciandaro P, Nardelli C, Vacca MP, Capuano P, Specchia G, Battaglia M. Fertility preservation in males with cancer: 16-year monocentric experience of sperm banking and post-thaw reproductive outcomes. *Ther Adv Med Oncol*. 2016;8(6):412-20.
16. Klosky JL, Wang F, Russell KM, Zhang H, Flynn JS, Huang L, Wasilewski-Masker K, Landier W, Leonard M, Albritton KH, Gupta AA, Casillas J, Colte P, Kutteh WH, Schover LR. Prevalence and Predictors of Sperm Banking in Adolescents Newly Diagnosed With Cancer: Examination of Adolescent, Parent, and Provider Factors Influencing Fertility Preservation Outcomes. *J Clin Oncol*. 2017;35(34):3830-6.

17. Sonnenburg DW, Brames MJ, Case-Eads S, Einhorn LH. Utilization of sperm banking and barriers to its use in testicular cancer patients. *Support Care Cancer*. 2015;23(9):2763-8.
18. Quinn GP, Vadaparampil ST, Lee JH, Jacobsen PB, Bepler G, Lancaster J, Keefe DL, Albrecht TL. Physician referral for fertility preservation in oncology patients: a national study of practice behaviors. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5952-7.
19. Krouwel EM, Jansen TG, Nicolai MPJ, Dieben SWM, Luelmo SAC, Putter H, Pelger RCM, Elzevier HW. Identifying the Need to Discuss Infertility Concerns Affecting Testicular Cancer Patients: An Evaluation (INDICATE Study). *Cancers (Basel)*. 2021;13(3):553.
20. Gemeinsamer Bundesausschuss. Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses zur Kryokonservierung von Ei- oder Samenzellen oder Keimzellgewebe sowie entsprechende medizinische Maßnahmen wegen keimzellschädigender Therapie (Kryo-RL). *BAnz AT 19.02.2021. Sect. B7 (2021)*.
21. Gurney JK, Florio AA, Znaor A, Ferlay J, Laversanne M, Sarfati D, Bray F, McGlynn KA. International Trends in the Incidence of Testicular Cancer: Lessons from 35 Years and 41 Countries. *Eur Urol*. 2019;76(5):615-23.
22. Song SH, Kim DK, Sung SY, Her YS, Lee OH, Choi MH, Kim HK, Lyu SW, Kim DS. Long-Term Experience of Sperm Cryopreservation in Cancer Patients in a Single Fertility Center. *World J Mens Health*. 2019;37(2):219-25.
23. Fu L, Zhou F, An Q, Zhang K, Wang X, Xu J, Guo Y, Lu W, Liang X, Gu Y. Sperm Cryopreservation for Male Cancer Patients: More than 10 Years of Experience, in Beijing China. *Med Sci Monit*. 2019;25:3256-61.
24. Kobayashi H, Tamura K, Tai T, Nagao K, Nakajima K. Semen cryopreservation as an oncofertility treatment in 122 Japanese men with cancer: A decade-long study. *Reprod Med Biol*. 2017;16(4):320-4.

25. Ferrari S, Paffoni A, Filippi F, Busnelli A, Vegetti W, Somigliana E. Sperm cryopreservation and reproductive outcome in male cancer patients: a systematic review. *Reprod Biomed Online*. 2016;33(1):29-38.
26. van Casteren NJ, van Santbrink EJ, van Inzen W, Romijn JC, Dohle GR. Use rate and assisted reproduction technologies outcome of cryopreserved semen from 629 cancer patients. *Fertil Steril*. 2008;90(6):2245-50.
27. Ferrari S, Paffoni A, Reschini M, Noli S, Dallagiovanna C, Guarneri C, Filippi F, Somigliana E. Variables affecting long-term usage rate of sperm samples cryopreserved for fertility preservation in cancer patients. *Andrology*. 2021;9(1):204-11.
28. Hammarberg K, Kirkman M, Stern C, McLachlan RI, Clarke G, Agresta F, Gook D, Rombauts L, Vollenhoven B, Fisher JRW. Survey of Reproductive Experiences and Outcomes of Cancer Survivors Who Stored Reproductive Material Before Treatment. *Hum Reprod*. 2017;32(12):2423-30.
29. Muller I, Oude Ophuis RJ, Broekmans FJ, Lock TM. Semen cryopreservation and usage rate for assisted reproductive technology in 898 men with cancer. *Reprod Biomed Online*. 2016;32(2):147-53.
30. Agarwal A, Ranganathan P, Kattal N, Pasqualotto F, Hallak J, Khayal S, Mascha E. Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens. *Fertil Steril*. 2004;81(2):342-8.
31. Girasole CR, Cookson MS, Smith JA, Jr., Ivey BS, Roth BJ, Chang SS. Sperm banking: use and outcomes in patients treated for testicular cancer. *BJU Int*. 2007;99(1):33-6.
32. Ping P, Gu BH, Li P, Huang YR, Li Z. Fertility outcome of patients with testicular tumor: before and after treatment. *Asian J Androl*. 2014;16(1):107-11.

33. Magelssen H, Haugen TB, von Düring V, Melve KK, Sandstad B, Fossa SD. Twenty years experience with semen cryopreservation in testicular cancer patients: who needs it? *Eur Urol.* 2005;48(5):779-85.
34. Li Y, Zhang J, Zhang H, Liu B, Wang G, Cao M, Fu B, Li H, Jiang Q, Yu L, Xian Y, Su B, Jiang X. Importance and safety of autologous sperm cryopreservation for fertility preservation in young male patients with cancer. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(15):e19589.
35. Lackamp N, Wilkemeyer I, Jelas I, Keller U, Bullinger L, Stintzing S, le Coutre P. Survey of Long-Term Experiences of Sperm Cryopreservation in Oncological and Non-Oncological Patients: Usage and Reproductive Outcomes of a Large Monocentric Cohort. *Frontiers in Oncology.* 2021;11(4648).
36. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, UK ; New York, NY: Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press; 1999. x, 128 p.
37. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. xiv, 271 p.
38. Poorvu PD, Frazier AL, Feraco AM, Manley PE, Ginsburg ES, Laufer MR, LaCasce AS, Diller LR, Partridge AH. Cancer Treatment-Related Infertility: A Critical Review of the Evidence. *JNCI Cancer Spectr.* 2019;3(1):pkz008.
39. Traila A, Dima D, Achimas-Cadariu P, Micu R. Fertility preservation in Hodgkin's lymphoma patients that undergo targeted molecular therapies: an important step forward from the chemotherapy era. *Cancer Manag Res.* 2018;10:1517-26.
40. Zang MB, Zhou Q, Zhu YF, Liu MX, Zhou ZM. Effects of chemotherapeutic agent bendamustine for non-hodgkin lymphoma on spermatogenesis in mice. *J Biomed Res.* 2018;32(5):442-53.

41. Ragni G, Somigliana E, Restelli L, Salvi R, Arnoldi M, Paffoni A. Sperm banking and rate of assisted reproduction treatment: insights from a 15-year cryopreservation program for male cancer patients. *Cancer*. 2003;97(7):1624-9.
42. Heim C, Minniear K, Dann CT. Imatinib has deleterious effects on differentiating spermatogonia while sparing spermatogonial stem cell self renewal. *Reprod Toxicol*. 2011;31(4):454-63.
43. Rambhatla A, Strug MR, De Paredes JG, Cordoba Munoz MI, Thakur M. Fertility considerations in targeted biologic therapy with tyrosine kinase inhibitors: a review. *J Assist Reprod Genet*. 2021;38(8):1897-908.
44. Mariani S, Basciani S, Fabbri A, Agati L, Ulisse S, Lubrano C, Spera G, Gnassi L. Severe oligozoospermia in a young man with chronic myeloid leukemia on long-term treatment with imatinib started before puberty. *Fertil Steril*. 2011;95(3):1120 e15-7.
45. Picton HM, Wyns C, Anderson RA, Goossens E, Jahnukainen K, Kliesch S, Mitchell RT, Pennings G, Rives N, Tournaye H, van Pelt AM, Eichenlaub-Ritter U, Schlatt S, Diseases ETFOFPIS. A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Hum Reprod*. 2015;30(11):2463-75.
46. Korte E, Schilling R, Balcerek M, Campbell H, Dirksen U, Herrmann G, Kepakova K, Kepak T, Klco-Brosius S, Kruseova J, Kunstreich M, Lackner H, Langer T, Panasiuk A, Stefanowicz J, Strauss G, Ranft A, Byrne J, Goldbeck L, Borgmann-Staudt A. Fertility education for adolescent cancer patients: Gaps in current clinical practice in Europe. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2020;29(5):e13279.
47. Kelvin JF, Thom B, Benedict C, Carter J, Corcoran S, Dickler MN, Goodman KA, Margolies A, Matasar MJ, Noy A, Goldfarb SB. Cancer and Fertility Program Improves Patient Satisfaction With Information Received. *J Clin Oncol*. 2016;34(15):1780-6.

Eidesstattliche Versicherung/Anteilserklärung

„Ich, Nadine Lackamp, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Klinische Relevanz der Kryokonservierungen von Spermien im Kontext gonadotoxischer Therapien – Clinical Relevance of Sperm Cryopreservation in Patients Receiving Gonadotoxic Therapies“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autor*innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Nadine Lackamp hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation: Lackamp N, Wilkemeyer I, Jelas I, Keller U, Bullinger L, Stintzing S, le Coutre P. Survey of Long-Term Experiences of Sperm Cryopreservation in Oncological and Non-Oncological Patients: Usage and Reproductive Outcomes of a Large Monocentric Cohort. *Frontiers in Oncology*. 2021;11(4648).

Beitrag im Einzelnen:

1. Literaturrecherche: detaillierte Literaturrecherche zur Erfassung des Stands der Forschung zum Studienthema, ergänzt durch Prof. Philipp le Coutre und weitere Co-Autor*innen
2. Studienvorbereitung: gemeinsam mit Prof. le Coutre Erstellung der Studieninformation für Patienten, der Einverständniserklärung und des Studienfragebogens und Einreichung des Ethikantrag bei der Ethikkommission der Charité.
3. Erstellung einer Patientendatenbank: Erfassung von Patientendaten (personenbezogene Daten, Diagnose, Daten zur Kryokonservierung) aus der SAP-Datenbank der Charité (1089 Patienten, die in der Kryobank gelistet waren) und Selektion der Patienten nach Ein- und Ausschlusskriterien der Studie.
4. Fragebogenversand: Vorbereitung und Versand der Studienpakete.
5. Datenerhebung: Erfassung aller Daten aus den beantworteten Fragebögen in einer pseudonymisierten Datenbank, Ergänzung der fehlenden Daten mit Daten aus dem SAP-System und Erhebung der Kryokonservats-Befunde der eingeschlossenen Patienten nach Beratung durch Dr. Ina Wilkemeyer.
6. Statistische Auswertung: vollständige statistische Analyse der Studiendaten in SPSS Statistics und Microsoft Excel nach statistischer Beratung durch das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité.
7. Anfertigung des Manuskripts: Interpretation der Ergebnisse, vollständige Verfassung des Manuskripts inklusive selbstständiger Erstellung aller in der Publikation dargestellten Tabellen und Abbildungen mit Hilfestellungen und Korrekturen aller Co-Autor*innen, im Einzelnen:
 - Prof. Philipp le Coutre: Beratung und Korrekturen aller Abschnitte des Manuskripts, besonders bei der Ergebnisinterpretation und Diskussion

- Dr. Ina Wilkemeyer: Beratung bei allen Fragen bezüglich Kryokonservaten und Fertilitätsprotektion sowie Korrektur von entsprechenden Abschnitten des Manuskripts
 - Dr. Ivan Jelas: sprachliche Korrekturen und Beratung bezüglich Schwangerschaften bei Krebspatient*innen
 - Prof. Sebastian Stintzing, Prof. Ulrich Keller und Prof. Lars Bullinger: sprachliche Korrekturen, statistische Beratung, Hilfestellungen zu gonadotoxischen Krebstherapien und Anregungen zum Diskussionsteil
8. Publikationsprozess: Einreichung des Manuskripts als korrespondierende Erstautorin und Durchführung der Revision nach erfolgtem Peer Review.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"ONCOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 242 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS	55,868	508.702	0.105140
2	Nature Reviews Clinical Oncology	17,973	66.675	0.038760
3	NATURE REVIEWS CANCER	62,391	60.716	0.059170
4	JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY	189,443	44.544	0.249030
5	LANCET ONCOLOGY	72,804	41.316	0.138530
6	Cancer Discovery	27,030	39.397	0.072460
7	ANNALS OF ONCOLOGY	61,542	32.976	0.117180
8	JAMA Oncology	22,382	31.777	0.080430
9	CANCER CELL	50,839	31.743	0.081040
10	Molecular Cancer	24,931	27.401	0.030030
11	Journal of Hematology & Oncology	10,615	17.388	0.018360
12	SEMINARS IN CANCER BIOLOGY	11,552	15.707	0.012110
13	Journal of Thoracic Oncology	24,405	15.609	0.042780
14	Trends in Cancer	4,237	14.226	0.012440
15	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	11,042	13.751	0.028830
16	JNCI-Journal of the National Cancer Institute	42,005	13.506	0.038260
17	CANCER RESEARCH	159,236	12.701	0.105150
18	CLINICAL CANCER RESEARCH	105,958	12.531	0.131040
19	NEURO-ONCOLOGY	17,812	12.300	0.029210
20	CANCER TREATMENT REVIEWS	11,834	12.111	0.016910

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	Journal of the National Comprehensive Cancer Network	10,050	11.908	0.021920
22	Liver Cancer	1,579	11.740	0.002800
23	LEUKEMIA	34,181	11.528	0.045940
24	Clinical and Translational Medicine	2,201	11.492	0.003110
25	JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH	16,717	11.161	0.023310
26	Cancer Immunology Research	11,185	11.151	0.027290
27	Blood Cancer Journal	4,691	11.037	0.011440
28	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-REVIEWS ON CANCER	7,025	10.680	0.007000
29	Cancer Communications	1,307	10.392	0.002530
30	ONCOGENE	77,576	9.867	0.059180
31	Annual Review of Cancer Biology-Series	703	9.391	0.002910
32	CANCER AND METASTASIS REVIEWS	7,809	9.264	0.006010
33	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER	40,294	9.162	0.046490
34	CANCER LETTERS	42,174	8.679	0.040130
35	npj Precision Oncology	931	8.254	0.002500
36	Therapeutic Advances in Medical Oncology	3,021	8.168	0.005350
37	Oncolmmunology	14,987	8.110	0.030230
38	JOURNAL OF PATHOLOGY	22,441	7.996	0.017610
39	BRITISH JOURNAL OF CANCER	54,924	7.640	0.042070
40	Oncogenesis	4,065	7.485	0.008320
41	European Urology Oncology	1,413	7.479	0.004350

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
42	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER	64,014	7.396	0.059180
43	Gastric Cancer	7,698	7.370	0.011490
44	Molecular Therapy-Oncolytics	1,582	7.200	0.002970
45	INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS	50,525	7.038	0.039410
46	CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY	11,382	6.968	0.012190
47	npj Breast Cancer	1,236	6.923	0.004060
48	CANCER	79,706	6.860	0.059500
49	CELLULAR ONCOLOGY	2,462	6.730	0.002430
50	CANCER SCIENCE	18,834	6.716	0.020010
51	Cancers	28,128	6.639	0.039860
52	Molecular Oncology	8,378	6.603	0.012250
53	Clinical Epigenetics	5,526	6.551	0.011550
54	ESMO Open	2,452	6.540	0.006880
55	Translational Lung Cancer Research	3,169	6.498	0.006560
56	BREAST CANCER RESEARCH	13,841	6.466	0.013840
57	CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY HEMATOLOGY	10,934	6.312	0.014090
58	RADIOTHERAPY AND ONCOLOGY	22,462	6.280	0.024940
59	STEM CELLS	23,967	6.277	0.017860
60	MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS	23,832	6.261	0.024000
61	JACC: CardioOncology	267	6.250	0.000230
62	Frontiers in Oncology	24,690	6.244	0.040290
63	Advances in Cancer Research	3,144	6.242	0.002690

Publikation:

Lackamp N, Wilkemeyer I, Jelas I, Keller U, Bullinger L, Stintzing S, le Coutre P.

Survey of Long-Term Experiences of Sperm Cryopreservation in Oncological and Non-Oncological Patients: Usage and Reproductive Outcomes of a Large Monocentric Cohort. *Frontiers in Oncology*. 2021;11(4648).



Survey of Long-Term Experiences of Sperm Cryopreservation in Oncological and Non-Oncological Patients: Usage and Reproductive Outcomes of a Large Monocentric Cohort

OPEN ACCESS

Nadine Lackamp^{1*}, Ina Wilkemeyer², Ivan Jelas¹, Ulrich Keller¹, Lars Bullinger¹, Sebastian Stintzing¹ and Philipp le Coutre¹

Edited by:

Yawei Zhang,
Chinese Academy of Medical
Sciences and Peking Union Medical
College, China

Reviewed by:

Mujeeb Zafar Bandy,
Government Medical College (GMC),
India
Abdelbaset Mohamed Elasbali,
Al Jouf University, Saudi Arabia

***Correspondence:**

Nadine Lackamp
nadine.lackamp@charite.de

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Epidemiology and Prevention,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 08 September 2021

Accepted: 19 October 2021

Published: 05 November 2021

Citation:

Lackamp N, Wilkemeyer I, Jelas I,
Keller U, Bullinger L, Stintzing S and
le Coutre P (2021) Survey of Long-
Term Experiences of Sperm
Cryopreservation in Oncological and
Non-Oncological Patients: Usage and
Reproductive Outcomes of a Large
Monocentric Cohort.
Front. Oncol. 11:772809.
doi: 10.3389/fonc.2021.772809

¹ Department of Hematology, Oncology, and Tumor Immunology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany, ² Department of Urology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany

Progress in oncological treatment has led to an improved long-term survival of young male cancer patients over the last decades. However, standard cancer treatments frequently implicate fertility-damaging potential. Cryopreservation of sperm is the current standard option to preserve patient's fertility after treatment, yet long-term data on usage and reproductive experiences is still limited. Natural fertility after treatment and especially in relation to the type of treatment has been poorly analyzed so far. Therefore, we performed a retrospective survey including male patients with an indication for gonadotoxic treatment who cryopreserved reproductive material at our institution between 1994 and 2017. Study questionnaires regarding treatment, material usage, and reproductive outcomes were sent to eligible patients. Additionally, semen analyses of study participants from the time of cryopreservation were evaluated. A total of 99 patients were included in the study. Respondents' median age was 38.0 years. Most frequent diagnoses were testicular cancer (29.3%) and lymphoma (26.3%). A further 8.1% suffered from autoimmune diseases. Testicular cancer patients had a significantly lower pre-treatment median sperm concentration (18.0 million/ml) compared to non-testicular cancer patients (54.2 million/ml). Until November 2020, the determined sperm usage and cumulative live-birth rate per couple were 17.2% and 58.8%, respectively. Most sperm users received treatments with high (40.0%) or intermediate (33.3%) gonadotoxic potential. 20.7% of all patients reported to had fathered at least one naturally conceived child after treatment, this being the case especially if they had been treated with less or potentially gonadotoxic therapies. In conclusion, our findings emphasize the importance of sperm

cryopreservation in the context of male fertility preservation. Furthermore, they indicate that the gonadotoxic potential of patients' treatments could represent a predictive factor for sperm usage.

Keywords: sperm cryopreservation, cancer, fertility preservation, assisted reproduction techniques (ART), chemotherapy, natural fertility, reproductive outcomes, cancer treatment

INTRODUCTION

Due to advances in both oncological diagnosis and treatment, over the last few decades the long-term survival of young male cancer patients has significantly improved. However, standard cancer treatments – including radiation therapy, classical cytotoxic substances, and increasingly personalized, modern approaches – often implicate potential risks for patients' future fertility.

Several studies have shown reduced semen quality in some cancer patients even prior to the initiation of their treatment. This impairment of spermatogenesis, induced by the malignancies themselves, especially applies to patients with testicular cancer, the most frequently diagnosed cancer type in young men (1–3). In addition, various cancer treatments cause damage to spermatogenesis: Firstly, cytotoxic agents frequently compromise spermatogenesis, at least temporarily, and in some cases even induce permanent azoospermia. Among the cytotoxic substances, most alkylating agents and cisplatin are known to be strongly gonadotoxic; however, their deleterious effects on spermatogenesis ultimately depend on drug combination and dosage (4, 5). Secondly, the irradiation of the radiosensitive testicles deteriorates their function in a dose dependent way. Doses above four Gy can cause permanent germ cell defects, and 16 – 20 Gy can lead to irreversible azoospermia. Although recovery of spermatogenesis is attainable, it is highly dependent on radiation doses and the number of cycles conducted, requiring up to five years or even longer. Leydig cells of adults were observed to be more resistant to radiotherapy, nevertheless, in some cases testosterone replacement therapy after gonadal radiation is still necessary (6). Thirdly, conditioning regimens for hematopoietic stem cell transplantations (HSCT) have an extremely high gonadotoxicity due to aggressive chemotherapies and/or total body irradiation (TBI) combinations (5, 7). Finally, fertility can be reduced after gonadal surgeries, such as the radical inguinal orchiectomy, which is the mainstay of treatment for testicular cancer patients. Several studies report adverse effects on semen parameters and hormonal functions after radical inguinal orchiectomies (6).

Patients' fertility after cancer treatment is not predictable. Therefore, fertility preservation is a primary concern for cancer patients of reproductive age and should be discussed as early as possible before treatment is initiated. Currently, the standard option for fertility preservation in men is cryopreservation of ejaculated semen (8). The number of cancer patients who undergo sperm cryopreservation has increased during the last 20 years (1, 9). Regardless, in many countries, pre-treatment

sperm banking has not been established in clinical practice or is underutilized when offered (2, 10, 11). Depending on the country, costs for storage differ (11, 12). In Germany, as of the beginning of July 2021, the costs of sperm storage for cancer patients who have to undergo fertility-damaging therapies are covered by the public health insurance, according to the decision of the Federal Joint Committee (G-BA).

Reported usage rates of stored material remain low, often less than 10%, with a slight increase when examining long-term follow-ups of above 10 years (1, 9, 13–18). Different variables impacting long-term usage of sperm have been described so far, including age at the time of cryopreservation, type of cancer, and total number of cryopreserved spermatozoa (18). Nevertheless, many influencing factors are still unexplored. After deciding to use the frozen semen, couples proceed with assisted reproductive techniques (ART) and achieve parenthood in 35 – 80% of cases (1, 14, 19, 20).

Ample literature on outcomes of sperm cryopreservation in cancer patients exists, however, various aspects have not yet been analyzed sufficiently. Data on long-term follow-ups is still limited and more research is needed to make reliable conclusions about ART usage and success rates (1, 9, 11, 13–15, 19, 20). Moreover, studies exploring the relation between different cancer treatment types, sperm usage, and reproductive outcomes of natural fertility after treatment are lacking (19, 21–24). In addition, fertility preservation also concerns young patients affected by various non-oncological medical conditions. One group in this context are patients suffering from autoimmune diseases treated with gonadotoxic immunotherapy or HSCT. To our knowledge, cryopreservation experiences and outcomes from non-oncological patients who undergo fertility-damaging treatments have been barely reported (25).

In order to address the above-mentioned aspects of interest, and to add new findings to the existing literature, we performed a questionnaire-based survey of patients who cryopreserved reproductive material at our institution over a period of 22 years. This study aimed to analyze participants' usage of stored material, resulting ART outcomes, and natural reproduction outcomes after treatment, and to examine these outcomes with regard to treatment types and their gonadotoxic potential.

MATERIALS AND METHODS

Availability of Materials

The study questionnaire and original data underlying the conclusions listed in the manuscript are included in the supplementary material; further inquiries can be directed to the corresponding author.

Abbreviations: ART, assisted reproductive techniques. HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; TBI, total body irradiation; IQR, interquartile range.

Study Population and Data Source

The study population included all male patients who cryopreserved reproductive material at the Cryobank of Charité – Universitätsmedizin Berlin in the period from February 1994 until November 2017. All oncological and non-oncological patients with diagnoses requiring potentially gonadotoxic treatments were considered. Inclusion criteria were an age above 18 years, patient data available in our patient database and a German contact address. Deceased patients as well as patients with unsuccessful cryopreservation were excluded.

A study-specific questionnaire was developed by the researchers including the following questions: sociodemographic characteristics (personal data, occupation), questions related to diagnosis and treatment (disease/treatment as indication for cryopreservation, type of cancer/other diagnosis, date of initial diagnosis, type/s of treatment, date/s of treatment, relapses of disease, current disease status), questions concerning the cryopreservation (date/s, frequency, indication, time of cryopreservation in relation to treatment), questions about usage of stored material (material request, collection date, usage for ART, successful live-births, unsuccessful ART procedures, usage planned in future), and questions regarding family and children [marital status, number of children, characteristics of children (biological/not biological, type of reproduction, date of birth, sex, birth weight, height at birth, events during birth, current health status, date of birth of mother)].

Procedure and Data Management

Our patient database was reviewed to find potential study participants. Out of 1089 patients, who were listed in the Cryobank for the mentioned period, 774 were identified as possible participants. In June and September 2020, the eligible patients were sent a study pack containing a participant's information sheet, a consent form and copy, the study questionnaire and a pre-paid envelope addressed to the director of the study. 259 study packs could not be delivered due to outdated mailing addresses. 515 study packs could be delivered. A total of 111 questionnaires were completed and returned, yielding a response rate of 21.5%. Two respondents were relatives of recently deceased patients and had completed the questionnaires for them. Their data were excluded from the analysis. Further 10 patients were excluded because of missing indication for gonadotoxic treatment.

Semen Analyses

Semen analyses at the time of cryopreservation were requested from our Cryobank for patients included in the study. 82 analyses of ejaculated semen and three analyses of testicular tissue could be provided. The researchers evaluated sperm concentration, progressive and total motility (progressive and non-progressive motility) based on reference parameters from the World Health Organization (WHO) guidelines of 1999 and 2010, respectively (26, 27).

Data Analysis

Data was entered into a password protected secure database. Not all respondents replied to all questions. Where possible, missing,

or inconsistent data was revised and completed with data from our patient database. The number of patients whose data was still missing after this procedure is indicated and the respective patients were excluded from percentage calculations. Missing day or month specifications were replaced with the first day of a month or the first month of a year, respectively.

Data was analyzed in IBM SPSS Statistics Version 27. Categorical variables were presented as percentages. Continuous variables were presented as medians and interquartile range (IQR). Since the variables did not follow normal distribution, non-parametric tests were used to compare patient groups (Mann-Whitney-U-test and Chi-square-test). A p-value <0.05 was considered as statistically significant. Diagnosis groups were subsumed into appropriate upper-level groups for statistical testing.

Due to the retrospective design of the study, randomization or blinding of participants were not applicable. No power calculation was performed as the sample size directly resulted from the number of respondents to the questionnaire.

RESULTS

Characteristics and Treatments of Respondents

A total of 99 patients were included in the study. 91 patients (91.9%) suffered from oncological and 8 patients (8.1%) from non-oncological diseases. Most frequent diagnoses were testicular cancer (29.3%) and malignancies of the lymphatic and hematopoietic tissue (40.4%), as illustrated in **Figure 1**. All non-oncological patients were diagnosed with autoimmune diseases (namely membranous glomerulonephritis (two patients), neurosarcoidosis, Crohn's disease, autoimmune thrombocytopenia, central nervous system vasculitis, systemic lupus erythematosus and septic granulomatosis). Respondents' median age at the time of the survey was 38.0 years (IQR: 31.0 – 46.0 years). Further characteristics of the participants are shown in **Table 1**.

The participants received one (60.2%) or multiple (39.8%) of the following gonadotoxic treatment types: cytotoxic agents (chemotherapy or immunotherapy), orchiectomy, radiotherapy, and/or HSCT. Radiation therapy was included as a fertility-damaging treatment exclusively in case of gonadal irradiation or TBI as a conditioning regimen for HSCT, meaning that irradiation of other body parts (13 patients) or unknown areas (9 patients) were not included. One patient did not undergo the planned treatment and was excluded from treatment analyses. The fertility-damaging treatments were classified into four categories depending on their gonadotoxic potential (**Table 2**). In total, 89 patients (90.8%) were treated with cytotoxic agents as part of their therapy regimens. 10 patients did not specify the cytotoxic substances and were excluded from the treatment classification. **Figure 2** illustrates the distribution of the treatment categories in the study population.

Five patients (5.1%) underwent cryopreservation after treatment initialization or partial treatment completion. Among them, three patients had been orchiectomized and two patients had been treated with chemotherapy prior to cryopreservation.

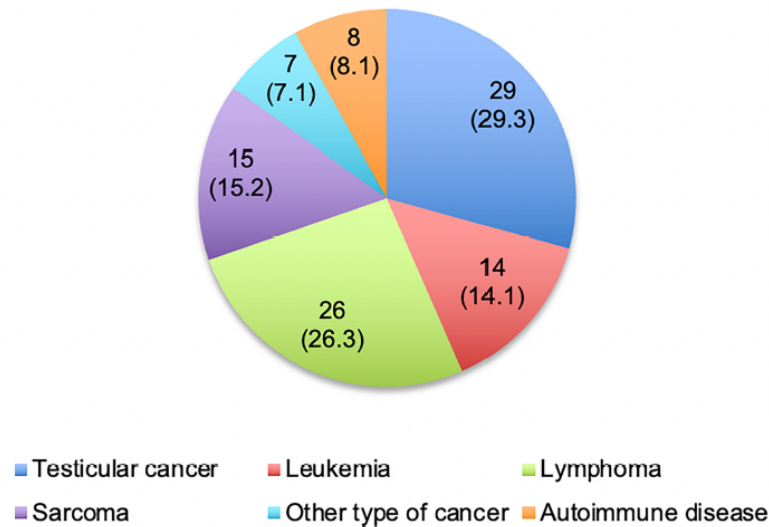


FIGURE 1 | Diagnoses of respondents. Values are presented as number of patients (%). One patient with other type of cancer was additionally diagnosed with testicular cancer during the follow-up.

Semen Analyses

Semen analyses of ejaculated sperm at the time of cryopreservation were available for 82 of 99 patients. Median sperm concentration [37.9 million/ml (IQR: 17.3 – 93.2 million/ml)], progressive [47.0% (IQR: 32.0 – 55.0%)] and total sperm motility [56.0% (IQR: 43.3 – 65.0%)] of patients who cryopreserved sperm before initiating gonadotoxic therapy were normal. The five patients who stored material after partial treatment completion had a median sperm concentration of 20.5 million/ml (IQR: 13.2 – 56.6 million/ml), progressive motility of 32.0% (IQR: 24.0 – 55.0%) and total motility of 38.0% (IQR: 35.0 – 63.5%).

TABLE 1 | Respondents' characteristics.

Characteristics	
Age at time of survey, median (IQR)	38.0 (31.0 – 46.0)
Age at diagnosis, median (IQR)	27.0 (20.0 – 36.0)
Age at cryopreservation, median (IQR)	29.0 (20.0 – 36.0)
Marital status, n (%)	
Single	32 (33.7)
Married	45 (47.4)
In Partnership	16 (16.8)
Widowed	1 (1.1)
Other	1 (1.1)
N.a.	4
Reproductive material stored, n (%)	
Ejaculated semen	82 (96.5)
Testicular tissue	3 (3.5)
N.a.	14
Time of cryopreservation, n (%)	
Before treatment*	94 (94.9)
After treatment initialization	5 (5.1)

*One of the patients did not undergo the planned gonadotoxic treatment.

Pre-treatment semen analyses according to diagnosis groups are shown in **Table 3**. Testicular cancer patients had a significantly lower median sperm concentration [18.0 million/ml (IQR: 9.7 – 37.8 million/ml)] compared to non-testicular cancer patients (54.2 million/ml (IQR: 23.0 – 110.2 million/ml), Mann-Whitney-U-test, $p = 0.003$). No significant differences in progressive and total motility between the two groups were observed (Mann-Whitney-U-test, $p = 0.656$ and $p = 0.688$).

Sperm Usage and ART Outcomes

Overall, 17 patients (17.2%) decided to use their cryopreserved material for ART procedures. In 13 cases, the reproductive material was ejaculated sperm, while the reproductive material remained unknown in the other four cases. The median age was 32.0 years (IQR: 27.0 – 36.5 years) at the time of cryopreservation. No significant difference from the median age at the time of cryopreservation of patients who did not use their material [27.0 years (IQR: 20.0 – 35.3 years)] was observed (Mann-Whitney-U-test, $p = 0.135$). **Table 4** summarizes the diagnosis groups and treatment categories of patient groups who used and did not use the cryopreserved material. All six sperm users in treatment category 1 (40.0%) were treated with highly sterilizing chemotherapy and three of them (20.0%) additionally underwent HSCT. Out of the five users in category 2 (33.3%), three (20.0%) were treated with orchiectomy and chemo-/chemoradiotherapy, and two (13.3%) exclusively with chemotherapy. The three sperm users in category 3 (20.0%) received less gonadotoxic agents and one of them (6.7%) had previously been orchiectomized. One sperm user (6.7%) underwent radioiodine therapy. No significant correlation between sperm usage and diagnosis group was observed (Chi-square-test, $p = 0.991$).

The median storage time until the first material request was 26.0 months (IQR: 16.5 – 65.5 months). Most of those who

TABLE 2 | Treatment categories according to the gonadotoxic potential.

Treatment category	Treatment or cytotoxic agent
Category 1: High gonadotoxicity	HSCT conditioning (chemotherapy and/or TBI), BEACOPP, VAC
Category 2: Intermediate gonadotoxicity/risk for prolonged azoospermia	Pelvic irradiation, cyclophosphamide, cisplatin, ifosfamide, lomustine, BEP, VIP, VIDE
Category 3: Low gonadotoxicity/risk for only temporary reduction in sperm counts	Radical inguinal orchiectomy, vincristine, vinblastine, carboplatin, doxorubicin, bleomycin, methotrexate, azathioprine, ABVD, CHOP
Category 4: Potential gonadotoxicity (existing data not sufficient)	Rituximab, bendamustine, imatinib, cladribine, ¹³¹ Iod

Data from Poorvu et al. (28), additionally from Meistrich et al. (4), Vakilopoulos et al. (29), Traita et al. (30), and Zang et al. (31).

BEACOPP, bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, prednisone; VAC, vincristine, actinomycin D, cyclophosphamide; BEP, bleomycin, etoposide, cisplatin; VIP, cisplatin, etoposide, ifosfamide; VIDE, vincristine, ifosfamide, doxorubicin, etoposide; CHOP, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone.

utilized the frozen material (13 patients, 76.5%) did so during the first five years of storage. The highest number of sperm usages was observed in the second year (six patients, 35.3%). During the first 10 years of storage, 94.1% of the users requested their frozen semen, and only one patient (5.9%) used his semen after a longer storage time. He was 17 years old at the time of cryopreservation. Among the non-users, 26 patients (34.7%) stated they would potentially make use of their material in the future. 10 sperm users (58.8%) achieved parenthood of at least one ART-conceived child. However, seven patients (41.2%) reported they had remained childless after unsuccessful ART procedures, yielding a cumulative live-birth rate per couple of 58.8%. All

users had cryopreserved their semen prior to gonadotoxic treatment except for one testicular cancer patient, whose sperm cryopreservation was commissioned after orchiectomy. His ART procedures remained unsuccessful. Analysis of storage periods showed no significant difference in storage time between sperm users with successful [20.0 months (IQR: 17.3 – 42.5 months)] and unsuccessful ART outcomes [44.0 months (IQR: 15.0 – 116.0 months, Mann-Whitney-U-test, $p = 0.261$)]. The longest storage time before sperm usage resulting in fatherhood was 78 months.

A total of 20 children were born from ART cycles (8 singletons and six pairs of twins). Additionally, one patient stated he had an ART-conceived child from cryopreserved

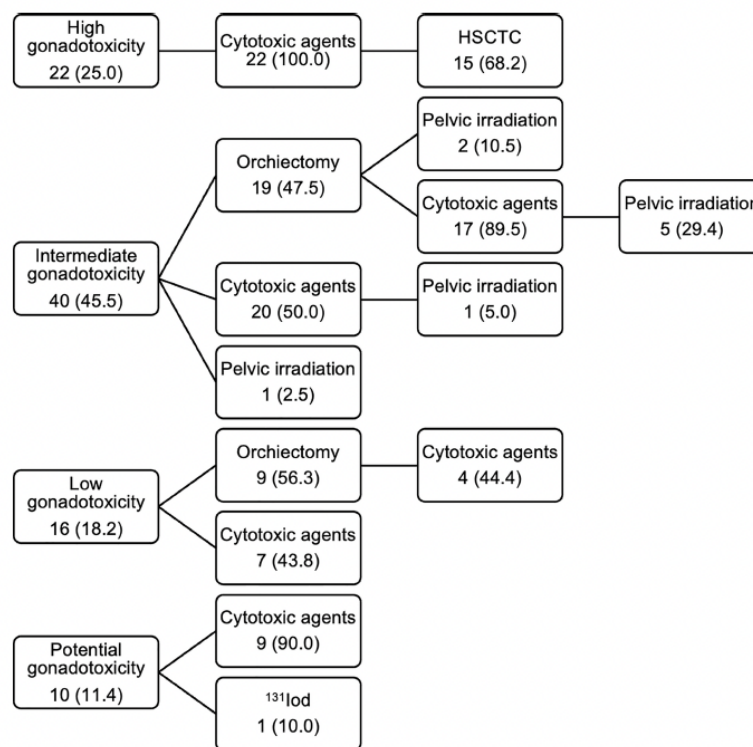
**FIGURE 2** | Treatment categories and treatment types of respondents. Values are presented as number of patients (%). HSCTC, HSCT conditioning regimen.

TABLE 3 | Pre-treatment semen characteristics at the time of cryopreservation according to diagnosis groups.

Diagnosis group	Sperm concentration (10 ⁶ /ml)	Progressive motility (%)	Total motility (%)
Testicular cancer	18.0 (9.7 – 37.8)	48.0 (23.0 – 55.0)	56.0 (35.0 – 65.0)
Non-testicular cancer	54.2 (23.0 – 110.2)	46.0 (32.0 – 55.8)	56.0 (44.0 – 65.5)
Leukemia	43.0 (22.7 – 118.2)	44.0 (33.0 – 54.0)	54.0 (47.0 – 64.0)
Lymphoma	33.0 (14.0 – 91.8)	50.0 (30.0 – 54.8)	56.5 (39.8 – 66.0)
Sarcoma	58.8 (19.1 – 171.0)	45.0 (31.5 – 50.5)	55.0 (42.5 – 63.5)
Other type of cancer	51.0 (22.7 – 138.0)	32.5 (28.0 – 59.5)	43.0 (30.0 – 62.0)
Autoimmune disease	97.6 (68.7 – 224.6)	61.5 (52.5 – 68.3)	66.5 (59.3 – 73.8)

Values are presented as median (IQR).

material that was not stored at our institution. The females' median age at the time of childbirth was 35.0 years (IQR: 32.0 – 36.0 years). One ART-conceived child (4.8%) suffered from a pulmonary valve stenosis and one pair of twins (9.5%) was reported deceased at the time of the survey. All the other children (85.7%) were reported to be alive, healthy, and normally developing. Birth weights and heights at birth are tabulated in **Table 5** (percentiles were in calculable due to missing information on gestational age). Not all patients provided the appropriate data.

Natural Fertility of Respondents

In total, 92 patients provided detailed data on their biological children. 31 patients (33.8%) reported to have fathered at least one child from natural conception, 8 patients (8.7%) exclusively had ART-conceived children, and two patients (2.2%) had children of unspecified type of reproduction. One patient (1.1%) stated to have a pregnant partner at the time of the survey and 50 patients (54.3%) reported to have no biological children. Among those with naturally conceived children, 12 patients had achieved parenthood before (13.1%), 9 patients after (9.8%), and 10 patients (10.9%) before as well as after receiving gonadotoxic treatments. The first group included three sperm users, the second and third group one sperm user each. **Table 4** illustrates diagnosis groups and

treatment categories of patient groups who fathered and did not father naturally conceived children after treatment. If available, birth weights and heights at birth of naturally conceived children after treatment are summarized in **Table 5** (percentiles were in calculable due to missing information on gestational age).

DISCUSSION

In the present survey we reported on experiences of sperm cryopreservation and outcomes of natural fertility in oncological and non-oncological patients at the Cryobank of Charité – Universitätsmedizin Berlin over a period of 22 years. Our paper supplements findings to the existing data on cryopreservation usage and success rates and is one of the first to analyze the relation between gonadotoxic treatment types and reproductive outcomes (19, 21–24).

Integration of Study Findings in the Current State of Research

Our findings regarding patients' characteristics and analysis of pre-treatment semen parameters are mainly in line with those presented by other authors. As already observed in previous studies, oncological patients in this survey were most frequently

TABLE 4 | Diagnosis groups and treatment categories of sperm users and non-users, and patients with and without naturally conceived children after gonadotoxic treatment.

Diagnosis group/treatment category	Use of cryopreserved sperm		Natural conception after treatment	
	Yes (n = 17)	No (n = 82)	Yes (n = 19)	No (n = 73)
<i>Diagnosis group</i>				
Testicular cancer	5 (29.4)	24 (29.3)	7 (36.8)	20 (27.4)
Non-testicular cancer	12 (70.6)	58 (70.7)	12 (63.2)	53 (72.6)
Leukemia	1 (5.9)	13 (15.9)	3 (15.8)	11 (15.1)
Lymphoma	6 (35.3)	20 (24.4)	5 (26.3)	19 (26.0)
Sarcoma	3 (17.6)	12 (14.6)	2 (10.5)	11 (15.1)
Other type of cancer	1 (5.9)	6 (7.3)		7 (9.6)
Autoimmune disease	1 (5.9)	7 (8.5)	2 (10.5)	5 (6.8)
<i>Treatment category</i>				
Category 1: High gonadotoxicity	6 (40.0)	16 (21.9)	2 (12.5)	18 (27.3)
Category 2: Intermediate gonadotoxicity	5 (33.3)	35 (47.9)	5 (31.3)	32 (48.5)
Category 3: Low gonadotoxicity	3 (20.0)	13 (17.8)	4 (25.0)	12 (18.2)
Category 4: Potential gonadotoxicity	1 (6.7)	9 (12.3)	5 (31.3)	4 (6.1)
Treatment not realized		1		1
N.a.	2	8	3	6

Values are presented as number of patients (%).

TABLE 5 | Birth weights and heights of newborns.

Newborns	Birthweight (grams)	Height at birth (cm)
All newborns	3300.0 (2765.0 – 3660.0)	52.0 (49.0 – 53.0)
ART-conceived twins	1950.0 (1470.0 – 2330.0)	45.5 (41.5 – 47.5)
ART-conceived singletons	3050.0 (2882.5 – 3355.0)	52.0 (50.5 – 53.0)
Naturally conceived twins after treatment	1870.0	44.5
Naturally conceived singletons after treatment	3570.0 (3140.0 – 3910.0)	52.0 (50.0 – 54.0)

Values are presented as median (IQR).

diagnosed with testicular cancer and tumors of the lymphatic and hematopoietic tissue (1, 9, 13, 15, 17–20). Although our analysis of pre-treatment semen parameters at the time of cryopreservation showed a huge interindividual variability, the lowest median sperm count was observed in patients with malignant testis tumors. Similar findings were reported by other authors (1, 5, 15, 17, 18, 20). Factors impairing spermatogenesis caused by testicular tumors even prior to treatment initiation seem to be multifactorial, including direct parenchymal damage and replacement by the malignancy, interferences in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, systemic inflammation, and increased oxidative stress (6).

The sperm usage rate in our study (17.2%) was higher compared to the 3 – 10% experienced by most of the other clinics (1, 9, 13–15, 20). For example, Ferrari and colleagues calculated in their review an aggregated usage rate of 8% (30 studies included) (16). However, a much higher usage rate of 27% was reported by Hammarberg and colleagues, who performed a cross-sectional survey (19). In contrast, the live-birth rate per couple we observed (58.8%) corresponds to findings reported in previous studies, even though the rates for each study vary strongly (35 – 80%) (1, 14, 19, 20). Nevertheless, when comparing the usage and ART success rates in our cohort to other results, the number of patients and a possible participation bias should be considered.

Variables Affecting Sperm Usage

Although the usage rate in the present study was a bit higher compared to previous, it remained relatively low. In the following, we want to discuss on some variables that may affect the number of sperm usages:

Period of follow-up: Some authors suggested that sperm usage might increase with longer follow-up (16, 17, 32). However, our results did not confirm this (94.1% of the sperm users requested their material within the first 10 years of storage). Similarly, in their latest study, Ferrari and colleagues showed only a marginal increase in the usage rate (from 9.4% to 12.0%) by extending the period of follow-up beyond 10 years (18).

Type of gonadotoxic treatment: 40.0% of the sperm users compared to only 21.9% of the non-users in our cohort received highly sterilizing treatments. This observation indicates that treatments with strong gonadotoxicity might represent a predictive factor for future sperm usage even though our sample sizes were too small to apply reliable statistical tests to show the correlation. To our knowledge, the relation between different types of treatment and usage of cryopreserved sperm has not yet been analyzed sufficiently and, hence, further research is necessary to confirm our results.

Outcomes of natural reproduction: One of the reasons for low sperm usage rates could be maintained or recovered fertility. Given that 20.7% of our patients reported to have fathered children from natural conception after treatment, a substantial proportion of patients have retained or retrieved fertility. Nevertheless, two of them used their cryopreserved sperm. More research is needed to draw further conclusions on this aspect (19).

Costs for storage: Since, in some countries, the costs of cryopreserving reproductive material are born by patients themselves, they may affect cryopreservation rates and future sperm usage. However, no consistent data on this regard exists (11, 12). In Germany, since the beginning of July 2021, Public Health Insurance covers the costs for cryopreservation, specifically for male cancer patients under 50 years to preserve ejaculated sperm or testicular tissue when undergoing fertility-damaging therapies. Previously, such patients had to bear the costs privately and some may have chosen not to cryopreserve or to maintain the storage for this reason. It remains to be seen to what extent the alteration in insurance coverage will influence sperm cryopreservation, storage, and usage rates.

Future Perspectives

The gonadotoxic potential of many commonly used chemotherapeutics is still not definitely explored. Despite this, we want to raise the topic of modern, targeted therapies and their impact on the male reproductive system as an important direction for future research. The effects of targeted therapies on male fertility are poorly investigated, and some of those agents could be less damaging compared to classical chemo- and radiotherapy regimens. So far, studies exploring the harmful effects on spermatogenesis caused by the tyrosine kinase inhibitor imatinib have demonstrated controversial outcomes. Fertility impairments might be only modest in adult males or more severe when the agent is given during puberty (4). Since the use of targeted therapies in cancer therapy is increasing recently, their impact on fertility should be addressed in future research.

Limitations

We are aware of the shortcomings and limitations of the present study. Even though the initial number of considered sperm banking patients was high (1089 patients), the survey had a relatively small number of participants and reported sperm usages. Due to the low response rate of 21.5%, participation bias may have an influence on our findings. It is not possible to predict how these outcomes would have differed with a larger study cohort. Further limitations are found in the lack of information about semen characteristics after treatment, details

on ART procedures, and pregnancy attempts. The study also has a retrospective design, our questionnaire was not validated previously, and most of the information was self-reported by the patients. Due to these limitations, our study findings should be interpreted with caution and might be more indicative than generalizable.

Implications

The findings presented in this study affirm that the cryopreservation of sperm is an effective fertility preservation method for male patients treated with gonadotoxic therapies and that more than half of the patients achieve parenthood by using the cryopreserved material. Our results may serve a practical application for health care providers and their patients when discussing the possible benefits of fertility preservation programs. Moreover, our data indicates that treatments with high gonadotoxicity might represent a predictive factor for future sperm usage and may encourage patients to store reproductive material, especially before undergoing treatments with a high risk for fertility loss. Given that the group of sperm users reported in this study consisted of oncological as well as non-oncological patients, the results emphasize the importance that cryopreservation should be offered to all patients before initiating a fertility-damaging therapy.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics Committee of Charité - Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin. The patients/participants

provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PC conceived of the present idea and supervised the whole study. NL and PC contributed to conception and design of the study. IW provided the initial list of possible study participants and semen analyses for included patients. IJ, UK, LB, and SS were involved in treatments of study patients. NL performed the study preparation, data collection and evaluation as well as the statistical analysis of the data. NL wrote the manuscript in consultation with PC. All authors contributed to manuscript revision, provided critical feedback, read, and approved the submitted version.

FUNDING

The authors received funds from Charité - Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin (Department of Hematology, Oncology, and Tumor Immunology, and Charité Medical Library).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Anna Pöhlmann from the Institute of Biometry and Clinical Epidemiology of Charité - Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin for the statistical counselling in the early stages of this project.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.772809/full#supplementary-material>

REFERENCES

1. Stigliani S, Massarotti C, De Leo C, Maccarini E, Sozzi F, Cagnacci A, et al. Fifteen Year Regional Center Experience in Sperm Banking for Cancer Patients: Use and Reproductive Outcomes in Survivors. *Cancers (Basel)* (2021) 13(1):116. doi: 10.3390/cancers13010116
2. Abdel-Razeq N, Ammar K, Mahadeen A, Mansour R, Abdalwahed H, Gammoh R, et al. Fertility Counseling and Sperm Banking Among Adolescents and Adults Treated for Cancer With Curative Intent in a Developing Country. *Support Care Cancer* (2020) 28(8):3915–9. doi: 10.1007/s00520-019-05235-9
3. Nigam M, Aschebrook-Kilfoy B, Shikanov S, Eggener S. Increasing Incidence of Testicular Cancer in the United States and Europe Between 1992 and 2009. *World J Urol* (2015) 33(5):623–31. doi: 10.1007/s00345-014-1361-y
4. Meistrich ML. Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis in Humans. *Fertil Steril* (2013) 100(5):1180–6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.08.010
5. Tournaye H, Dohle GR, Barratt CL. Fertility Preservation in Men With Cancer. *Lancet* (2014) 384(9950):1295–301. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60495-5
6. Parekh NV, Lundy SD, Vij SC. Fertility Considerations in Men With Testicular Cancer. *Transl Androl Urol* (2020) 9(Suppl 1):S14–23. doi: 10.21037/tau.2019.08.08
7. Joshi S, Savani BN, Chow EJ, Gilleece MH, Halter J, Jacobsohn DA, et al. Clinical Guide to Fertility Preservation in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Bone Marrow Transplant* (2014) 49(4):477–84. doi: 10.1038/bmt.2013.211
8. Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS, et al. Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* (2018) 36(19):1994–2001. doi: 10.1200/JCO.2018.78.1914
9. Depalo R, Falagario D, Masciandaro P, Nardelli C, Vacca MP, Capuano P, et al. Fertility Preservation in Males With Cancer: 16-Year Monocentric Experience of Sperm Banking and Post-Thaw Reproductive Outcomes. *Ther Adv Med Oncol* (2016) 8(6):412–20. doi: 10.1177/1758834016665078
10. Klosky JL, Wang F, Russell KM, Zhang H, Flynn JS, Huang L, et al. Prevalence and Predictors of Sperm Banking in Adolescents Newly Diagnosed With

- Cancer: Examination of Adolescent, Parent, and Provider Factors Influencing Fertility Preservation Outcomes. *J Clin Oncol* (2017) 35(34):3830–6. doi: 10.1200/JCO.2016.70.4767
11. Sonnenburg DW, Brames MJ, Case-Eads S, Einhorn LH. Utilization of Sperm Banking and Barriers to its Use in Testicular Cancer Patients. *Support Care Cancer* (2015) 23(9):2763–8. doi: 10.1007/s00520-015-2641-9
 12. Krouwel EM, Jansen TG, Nicolai MPJ, Dieben SWM, Lueldo SAC, Putter H, et al. Identifying the Need to Discuss Infertility Concerns Affecting Testicular Cancer Patients: An Evaluation (INDICATE Study). *Cancers (Basel)* (2021) 13(3):553. doi: 10.3390/cancers13030553
 13. Song SH, Kim DK, Sung SY, Her YS, Lee OH, Choi MH, et al. Long-Term Experience of Sperm Cryopreservation in Cancer Patients in a Single Fertility Center. *World J Mens Health* (2019) 37(2):219–25. doi: 10.5534/wjmh.180061
 14. Fu L, Zhou F, An Q, Zhang K, Wang X, Xu J, et al. Sperm Cryopreservation for Male Cancer Patients: More Than 10 Years of Experience, in Beijing China. *Med Sci Monit* (2019) 25:3256–61. doi: 10.12659/MSM.913513
 15. Kobayashi H, Tamura K, Tai T, Nagao K, Nakajima K. Semen Cryopreservation as an Oncofertility Treatment in 122 Japanese Men With Cancer: A Decade-Long Study. *Reprod Med Biol* (2017) 16(4):320–4. doi: 10.1002/rmb2.12044
 16. Ferrari S, Paffoni A, Filippi F, Busnelli A, Vegetti W, Somigliana E. Sperm Cryopreservation and Reproductive Outcome in Male Cancer Patients: A Systematic Review. *Reprod BioMed Online* (2016) 33(1):29–38. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.04.002
 17. van Casteren NJ, van Santbrink EJ, van Inzen W, Romijn JC, Dohle GR. Use Rate and Assisted Reproduction Technologies Outcome of Cryopreserved Semen From 629 Cancer Patients. *Fertil Steril* (2008) 90(6):2245–50. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.10.055
 18. Ferrari S, Paffoni A, Reschini M, Noli S, Dallagiovanna C, Guameri C, et al. Variables Affecting Long-Term Usage Rate of Sperm Samples Cryopreserved for Fertility Preservation in Cancer Patients. *Andrology* (2021) 9(1):204–11. doi: 10.1111/andr.12894
 19. Hammarberg K, Kirkman M, Stern C, McLachlan RI, Clarke G, Agresta F, et al. Survey of Reproductive Experiences and Outcomes of Cancer Survivors Who Stored Reproductive Material Before Treatment. *Hum Reprod* (2017) 32(12):2423–30. doi: 10.1093/humrep/dex314
 20. Muller I, Oude Ophuis RJ, Broekmans FJ, Lock TM. Semen Cryopreservation and Usage Rate for Assisted Reproductive Technology in 898 Men With Cancer. *Reprod BioMed Online* (2016) 32(2):147–53. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.11.005
 21. Girasole CR, Cookson MS, Smith JAJr., Ivey BS, Roth BJ, Chang SS. Sperm Banking: Use and Outcomes in Patients Treated for Testicular Cancer. *BJU Int* (2007) 99(1):33–6. doi: 10.1111/j.1464-410X.2006.06537.x
 22. Ping P, Gu BH, Li P, Huang YR, Li Z. Fertility Outcome of Patients With Testicular Tumor: Before and After Treatment. *Asian J Androl* (2014) 16(1):107–11. doi: 10.4103/1008-682X.122194
 23. Magelssen H, Haugen TB, von Düring V, Melve KK, Sandstad B, Fossa SD. Twenty Years Experience With Semen Cryopreservation in Testicular Cancer Patients: Who Needs it? *Eur Urol* (2005) 48(5):779–85. doi: 10.1016/j.eururo.2005.05.002
 24. Li Y, Zhang J, Zhang H, Liu B, Wang G, Cao M, et al. Importance and Safety of Autologous Sperm Cryopreservation for Fertility Preservation in Young Male Patients With Cancer. *Med (Baltimore)* (2020) 99(15):e19589. doi: 10.1097/MD.00000000000019589
 25. Martinez F. International Society for Fertility Preservation E-AEWG. Update on Fertility Preservation From the Barcelona International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM 2015 Expert Meeting: Indications, Results and Future Perspectives. *Fertil Steril* (2017) 108(3):407–15 e11. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.024
 26. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. 4th. Cambridge, UK; New York, NY: Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press (1999). 128 p.
 27. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5th. Geneva: World Health Organization (2010). 271 p.
 28. Poorvu PD, Frazier AL, Feraco AM, Manley PE, Ginsburg ES, Laufer MR, et al. Cancer Treatment-Related Infertility: A Critical Review of the Evidence. *JNCI Cancer Spectr* (2019) 3(1):pkz008. doi: 10.1093/jncics/pkz008
 29. Vakalopoulos I, Dimou P, Anagnostou I, Zeginiadou T. Impact of Cancer and Cancer Treatment on Male Fertility. *Hormones (Athens)* (2015) 14(4):579–89. doi: 10.14310/horm.2002.1620
 30. Traila A, Dima D, Achimas-Cadariu P, Micu R. Fertility Preservation in Hodgkin's Lymphoma Patients That Undergo Targeted Molecular Therapies: An Important Step Forward From the Chemotherapy Era. *Cancer Manag Res* (2018) 10:1517–26. doi: 10.2147/CMAR.S154819
 31. Zang MB, Zhou Q, Zhu YF, Liu MX, Zhou ZM. Effects of Chemotherapeutic Agent Bendamustine for non-Hodgkin Lymphoma on Spermatogenesis in Mice. *J BioMed Res* (2018) 32(5):442–53. doi: 10.7555/JBR.31.20170023
 32. Ragni G, Somigliana E, Restelli L, Salvi R, Arnoldi M, Paffoni A. Sperm Banking and Rate of Assisted Reproduction Treatment: Insights From a 15-Year Cryopreservation Program for Male Cancer Patients. *Cancer* (2003) 97(7):1624–9. doi: 10.1002/cncr.11229

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Lackamp, Wilkemeyer, Jelas, Keller, Bullinger, Stintzing and le Coutre. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



CharitéCentrum für Tumormedizin

Charité | Campus Mitte | 10117 Berlin

Medizinische Klinik mit Schwerpunkt
Onkologie, Hämatologie und Tumorimmunologie (CCM)

Standort Charité Campus Mitte
Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Sebastian Stintzing

Studienarzt: Prof. Dr. med. Philipp le Coutre
Tel.: (030) 450 665 307
E-Mail: philipp.lecoutre@charite.de

Doktorandin: Nadine Lackamp
E-Mail: nadine.lackamp@charite.de

English translation of the study questionnaire:

Fragebogen für Patienten (*Questionnaire for patients*)

1. Fragen zu Ihrer Person (*Personal data*)

Name: _____

(*Name*)

Geburtsdatum: _____

(*Date of birth*)

Adresse: _____

(*Mailing address*)

Telefon: _____

(*Phone number*)

E-Mail: _____

(*E-Mail address*)

Beruf: _____

(*Occupation*)

2. Fragen zur Spermienkonservierung (Questions related to sperm cryopreservation)

2.1 Haben Sie in der Vergangenheit Spermien konservieren lassen?

(*Did you cryopreserve sperm in the past?*)

ja, Datum/Daten (*Yes, date/s*): _____

nein (falls zutreffend bitte direkt zu 3.) (*No*)

2.2 Wie häufig haben Sie Spermien einfrieren lassen?

(*How often did you cryopreserve sperm?*)

Name: _____

2.3.4 Wann war die Spermienkonservierung in Bezug auf die Hodenoperation?

(When was the sperm cryopreservation in relation to the orchiectomy?)

vor Hodenoperation (*Before orchiectomy*) nach Hodenoperation (*After orchiectomy*)

Datum der Hodenoperation (falls erinnerlich): _____ (*Date of orchiectomy*)

2.3.5 Welcher Hoden wurde entfernt? (*Which testicle was removed?*)

Hodenentfernung links (*Left orchiectomy*) Hodenentfernung rechts (*Right orchiectomy*)

Hodenentfernung beidseits (*Orchiectomy on both sides*)

2.3.6 Wann war die Spermienkonservierung in Bezug auf die Operation?

(When was the sperm cryopreservation in relation to the surgery?)

vor Operation (*Before surgery*) nach Operation (*After surgery*)

Datum der Operation (falls erinnerlich): _____ (*Date of surgery*)

2.4 Haben Sie Ihre konservierten Spermien zu einem späteren Zeitpunkt abgeholt?

(Did you request your cryopreserved sperm afterwards?)

ja, Datum der Abholung: _____ (*Yes, date of the request*)

2.4.1 Wurden mit den Spermien Kinder gezeugt? (*Did you father children with the sperm?*)

ja, Anzahl: _____ (*Yes, number of children*) nein (*No*)

Versuch leider erfolglos (*Attempts remained unsuccessful*)

nein, Spermien wurden nicht abgeholt (*No, I did not request my sperm*)

Nutzung der Spermien nicht geplant (*Usage of sperm not planned*)

Nutzung der Spermien in Zukunft geplant (*Usage of sperm planned in the future*)

3. Fragen zur Krankengeschichte (*Questions related to medical history*)

3.1 Haben Sie aufgrund einer Erkrankung oder deren Therapie Ihre Spermien einfrieren lassen? (*Did you undergo sperm cryopreservation because of a disease or disease treatment?*)

ja (*Yes*)

nein (falls zutreffend bitte direkt zu 4.) (*No*)

Name: _____

**3.2 Bitte kreuzen Sie die für die Spermieinfrierung relevante Erkrankung an.
(Please specify the relevant disease.)**

- Hodenkrebs (*Testicular cancer*)
- Leukämie (*Leukemia*)
 - Akute myeloische Leukämie (*Acute myeloid leukemia*) Chronische myeloische Leukämie (*Chronic myeloid leukemia*)
 - Akute lymphatische Leukämie (*Acute lymphocytic leukemia*)
 - Chronische lymphatische Leukämie (*Chronic lymphocytic leukemia*)
- Lymphom (*Lymphoma*)
 - Morbus Hodgkin (*Hodgkin's lymphoma*) B-Zell Non-Hodgkin Lymphom (*B-cell non-Hodgkin lymphoma*)
 - T-Zell Non-Hodgkin Lymphom (*T-cell non-Hodgkin lymphoma*)
 - Burkitt-Lymphom (*Burkitt lymphoma*)
 - andere Art des Lymphoms (*Other type of lymphoma*)
- Darmkrebs (*Gastrointestinal cancer*)
- Sarkom, Art des Sarkoms: _____
(*Sarcoma, type of sarcoma*)
- andere Krebserkrankung: _____ (*Other type of cancer*)
- andere Erkrankung: _____ (*Other disease*)

**3.3 Wann wurde die Erkrankung zum ersten Mal diagnostiziert?
(When was the disease first diagnosed?)**

Monat/Jahr: _____ (*Month/year*)

**3.4 Mit welcher Therapie/Therapien wurde die Erkrankung behandelt?
(Which treatment/s did you receive?)**

- Chemotherapie, verwendete Chemotherapeutika: (*Chemotherapy, used agents*)

- Operation: _____ (*Surgery*)
- Bestrahlung (*Radiotherapy*)
 - Ganzkörperbestrahlung (*Total body irradiation*) lokale Bestrahlung (*Local irradiation*)

Name: _____

andere Therapie: _____ (Other treatment)

3.5 Ist die Erkrankung nach der ersten Therapie erneut aufgetreten?
(Did you suffer from disease relapses?)

ja, Monat/Jahr des Rezidivs: _____ (Yes, month/year of the relapse)
 nein (No)

3.6 Leiden Sie noch heute an dieser Erkrankung?
(Do you suffer from the disease currently?)

ja (Yes) nein (No)

4. Fragen zur Familie (Questions related to the family)

4.1 Familienstand (Family status)

ledig (Single) in Partnerschaft lebend (In partnership)
 verheiratet (Married) verwitwet (Widowed) anderes (Other)

4.2 Haben Sie Kinder? (Do you have children?)

ja, Anzahl: _____ (Yes, number) Partnerin schwanger (Pregnant partner)
 nein (No)

4.3 Bitte füllen Sie die Tabelle bezüglich Ihrer Kinder aus (bei mehr als 4 Kindern bitte Tabelle auf Rückseite des Fragebogens erweitern).
(Please complete the following table.)

	Kind 1 (Child 1)	Kind 2 (Child 2)	Kind 3 (Child 3)	Kind 4 (Child 4)
Geburtsdatum (Date of birth)				
Geschlecht (Gender)	<input type="checkbox"/> männlich (Male) <input type="checkbox"/> weiblich (Female) <input type="checkbox"/> divers (Non-binary)	<input type="checkbox"/> männlich (Male) <input type="checkbox"/> weiblich (Female) <input type="checkbox"/> divers (Non-binary)	<input type="checkbox"/> männlich (Male) <input type="checkbox"/> weiblich (Female) <input type="checkbox"/> divers (Non-binary)	<input type="checkbox"/> männlich (Male) <input type="checkbox"/> weiblich (Female) <input type="checkbox"/> divers (Non-binary)
Leiblich/nicht	<input type="checkbox"/> leiblich	<input type="checkbox"/> leiblich	<input type="checkbox"/> leiblich	<input type="checkbox"/> leiblich

Name: _____

leiblich <i>(Biological/not biological)</i>	<i>(Biological)</i> <input type="checkbox"/> nicht leiblich <i>(Not biological)</i>	<i>(Biological)</i> <input type="checkbox"/> nicht leiblich <i>(Not biological)</i>	<i>(Biological)</i> <input type="checkbox"/> nicht leiblich <i>(Not biological)</i>	<i>(Biological)</i> <input type="checkbox"/> nicht leiblich <i>(Not biological)</i>
Art der Zeugung des Kindes (Type of reproduction)	<input type="checkbox"/> natürlich <i>(Natural)</i> <input type="checkbox"/> künstliche Befruchtung mit konservierten Spermien <i>(Fertilization with cryopreserved sperm)</i> <input type="checkbox"/> andere <i>(Other)</i>	<input type="checkbox"/> natürlich <i>(Natural)</i> <input type="checkbox"/> künstliche Befruchtung mit konservierten Spermien <i>(Fertilization with cryopreserved sperm)</i> <input type="checkbox"/> andere <i>(Other)</i>	<input type="checkbox"/> natürlich <i>(Natural)</i> <input type="checkbox"/> künstliche Befruchtung mit konservierten Spermien <i>(Fertilization with cryopreserved sperm)</i> <input type="checkbox"/> andere <i>(Other)</i>	<input type="checkbox"/> natürlich <i>(Natural)</i> <input type="checkbox"/> künstliche Befruchtung mit konservierten Spermien <i>(Fertilization with cryopreserved sperm)</i> <input type="checkbox"/> andere <i>(Other)</i>
Geburtsgewicht (Birth weight)	_____ g	_____ g	_____ g	_____ g
Geburtsgröße (Height at birth)	_____ cm	_____ cm	_____ cm	_____ cm
Komplikationen während der Geburt (Events during birth)	<input type="checkbox"/> nein <i>(No)</i> <input type="checkbox"/> ja <i>(Yes)</i>	<input type="checkbox"/> nein <i>(No)</i> <input type="checkbox"/> ja <i>(Yes)</i>	<input type="checkbox"/> nein <i>(No)</i> <input type="checkbox"/> ja <i>(Yes)</i>	<input type="checkbox"/> nein <i>(No)</i> <input type="checkbox"/> ja <i>(Yes)</i>
Gesundheitszustand des Kindes heute (Current health status of the child)	<input type="checkbox"/> gesund, normal entwickelt <i>(Healthy, normally developing)</i> <input type="checkbox"/> erkrankt <i>(Diseased):</i> _____ _____ _____ <input type="checkbox"/> verstorben <i>(Deceased)</i>	<input type="checkbox"/> gesund, normal entwickelt <i>(Healthy, normally developing)</i> <input type="checkbox"/> erkrankt <i>(Diseased):</i> _____ _____ _____ <input type="checkbox"/> verstorben <i>(Deceased)</i>	<input type="checkbox"/> gesund, normal entwickelt <i>(Healthy, normally developing)</i> <input type="checkbox"/> erkrankt <i>(Diseased):</i> _____ _____ _____ <input type="checkbox"/> verstorben <i>(Deceased)</i>	<input type="checkbox"/> gesund, normal entwickelt <i>(Healthy, normally developing)</i> <input type="checkbox"/> erkrankt <i>(Diseased):</i> _____ _____ _____ <input type="checkbox"/> verstorben <i>(Deceased)</i>
Geburtsdatum der Mutter (Date of birth of mother)				

Vielen Dank für Ihre Teilnahme!

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Lackamp N, Wilkemeyer I, Jelas I, Keller U, Bullinger L, Stintzing S, le Coutre P.
Survey of Long-Term Experiences of Sperm Cryopreservation in Oncological and Non-Oncological Patients: Usage and Reproductive Outcomes of a Large Monocentric Cohort. *Frontiers in Oncology.* 2021;11(4648).

Danksagung

An dieser Stelle möchte von Herzen allen Personen, die mich während meines Forschungsprojekts und der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben, meinen Dank aussprechen.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Philipp le Coutre für die wunderbare Betreuung meiner Promotion und die fortwährende Unterstützung danken.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Ina Wilkemeyer für die Kooperation und Bereitstellung wichtiger Ressourcen für die Umsetzung des Forschungsprojekts.

Ferner danke ich Frau Anna Pöhlmann vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité für die hilfreiche statistische Beratung.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Patienten, die an unserer Studie teilgenommen und ihre Daten zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich zudem bei meinen Eltern, Karin und Jürgen Lackamp, und meiner Schwester, Janina Lackamp, die immer für mich da sind, mich ermutigen, unterstützen und an mich glauben. Ohne sie wären mein Medizinstudium und meine Promotion nicht möglich gewesen.

Zuletzt danke ich von Herzen meinen zwei Mitbewohnerinnen und engen Freundinnen, Chiara Mattusch und Alessandra Engel, die mich während der gesamten Zeit der Promotion begleitet, mir immer wieder Motivation geschenkt und in unzähligen Situationen zur Seite gestanden haben.