

Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München
des Klinikums rechts der Isar
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle-Bahat)

**Der prädiktive Wert perinataler fetaler und maternaler
Geburtsparameter für den relativen Gehalt mononukleärer und
CD34-positiver Zellen im Nabelschnurblut Neugeborener**

Maria Magdalena Bölsterl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. V. R. Jacobs
2. Univ.-Prof. Dr. K.-Th. M. Schneider

Die Dissertation wurde am 07.08.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.11.2007 angenommen.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Verzeichnis der Abkürzungen.....	IV
III.	Abbildungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen der Stammzellforschung	1
1.1.1	Definition und Vorkommen verschiedener Stammzellarten.....	1
1.1.2	Stammzellen aus Knochenmark	4
1.1.2.1	Mesenchymale Stammzellen.....	4
1.1.2.2	Hämatopoetische Stammzellen	5
1.1.3	Stammzellen aus Nabelschnurblut.....	6
1.2	Nutzungsmöglichkeiten und Einlagerung von Nabelschnurblut.....	8
1.3	Klinische Anwendung von Nabelschnurblutstammzellen	9
1.3.1	Einsatzmöglichkeiten für die Transplantation.....	9
1.3.2	Einsatz im Rahmen der Regenerativen Medizin.....	11
1.4	Fragestellung und Zielsetzung vorliegender Arbeit.....	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Das STEMMAT-Projekt	13
2.2	Probengewinnung	14
2.2.1	Rechtliche Grundlagen	14
2.2.2	Abnahmetechnik	15
2.2.3	Lagerung und Verteilung der Proben	16
2.3	Probenverarbeitung	17
2.3.1	Grundlagen der Labormethodik.....	17
2.3.1.1	Dichtegradientenzentrifugation.....	17
2.3.1.2	FACS-Analyse	18
2.3.1.3	MACS-Zellisolation.....	20
2.3.2	Protokoll zur Zellzahlbestimmung im Labor des Blutspendedienstes.....	21
2.3.2.1	Bestimmung des Gehalts an mononukleären Zellen.....	21
2.3.2.2	Bestimmung des Gehalts an CD34-positiven Zellen mittels FACS-Analyse.....	22

2.3.3	Protokoll zur Zellzahlbestimmung im Labor der III. Medizinischen Klinik.....	23
2.3.3.1	Bestimmung des Gehalts an mononukleären Zellen.....	23
2.3.3.2	Bestimmung des Gehalts an CD34-positiven Zellen mittels FACS-Analyse.....	24
2.3.3.3	Zellisolierung der CD34-positiven Zellen mittels MACS	25
2.4	Untersuchte Parameter	26
2.4.1	Geschlecht und Geburtsgewicht des Kindes.....	27
2.4.2	Gestationsalter	27
2.4.3	Arterieller Nabelschnur-pH-Wert	27
2.4.4	Apgar-Score.....	28
2.4.5	Entbindungsmodus.....	29
2.4.6	Geburtslage	29
2.4.7	Maternaler Nikotinabusus.....	29
2.4.8	Maternale Cortisonmedikation.....	30
2.4.9	Mikroblutuntersuchung	30
2.4.10	Verarbeitungsintervall	31
2.5	Datenerhebung	31
2.5.1	Patientenaufklärung.....	31
2.5.2	Datenquellen	32
2.5.3	Dokumentation	33
2.6	Statistische Auswertung	34
2.6.1	Ziel- und Einflussgrößen.....	34
2.6.2	Deskriptive Statistik.....	35
2.6.3	Mittelwertvergleich und Lagetests	35
2.6.4	Bivariate Korrelationsanalyse	36
2.6.5	Multivariate Regressionsanalyse.....	36
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Allgemeine Angaben zur Probenzahl	38
3.1.1	Rekrutierung.....	38
3.1.2	Probenzahlen	39
3.2	Zellzahlgehalt der Nabelschnurblutproben.....	40
3.3	Zusammenhang von Evaluationsfaktoren und Stammzellgehalt	41
3.3.1	Geschlecht.....	41
3.3.2	Geburtsmodus	42
3.3.3	Geburtslage des Neugeborenen	45
3.3.4	Geburtsgewicht des Neugeborenen	45
3.3.5	Schwangerschaftsalter	47

3.3.6	Apgar-Score des Neugeborenen.....	49
3.3.7	Arterieller Nabelschnur-pH-Wert	51
3.3.8	pH-Wert der Mikroblutuntersuchung.....	55
3.3.9	Maternaler Nikotinabusus.....	56
3.3.10	Maternale Cortisonmedikation.....	57
3.3.11	Intervall bis zur Verarbeitung der Blutprobe	58
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	61
4	Diskussion	62
4.1	Bewertung der Ergebnisse und Einordnung in die Literatur.....	62
4.1.1	Zellzahlen und Zellkonzentration	62
4.1.2	Geschlecht.....	63
4.1.3	Geburtsmodus	64
4.1.4	Lage des Neugeborenen	66
4.1.5	Geburtsgewicht des Neugeborenen	67
4.1.6	Schwangerschaftsalter	69
4.1.7	Apgar-Score des Neugeborenen.....	70
4.1.8	Arterieller Nabelschnur-pH-Wert	71
4.1.9	pH-Wert der Mikroblutuntersuchung.....	72
4.1.10	Maternaler Nikotinabusus.....	73
4.1.11	Maternale Cortisonmedikation.....	74
4.1.12	Intervall bis zur Verarbeitung der Blutprobe	76
4.2	Methodenkritik und Anregung weiterführender Untersuchungen ...	77
4.2.1	Probleme bei Datenerhebung, Dokumentation und Probengewinnung	77
4.2.2	Probleme bei der Verarbeitung im Labor.....	78
4.2.3	Probleme bei der Datenauswertung.....	79
4.2.4	Ausblick und Anregungen für weitere Untersuchungen.....	79
5	Zusammenfassung	81
IV.	Literaturverzeichnis	VII
V.	Dankvermerk	XX
VI.	Anhang.....	XXI

II. Verzeichnis der Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AGA	appropriate for gestational age
BFU-E	burst forming unit-erythroid / Vorläuferzellen der erythroiden Linie
BRK	Bayerisches Rotes Kreuz
Ca	Calcium
CD	cluster of differentiation / Zelloberflächenantigene
CD34 ⁺	CD34-positive Zellen
CFC	colony forming cells / koloniebildende Zellen
CFU	colony forming unit / koloniebildende Einheit
CFU-GEMM	colony forming unit-granulocyte erythrocyte monocyte megakaryocyte
CFU-GM	colony forming unit-granulocyte macrophage
CFU-TOT	Gesamtheit von CFU-GM, CFU-GEMM und BFU-E
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose
CSF	colony stimulating factor / Wachstumsfaktor
CTG	Kardiotokographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting / Durchflusszytometrie
FCS	Fetal Calf Serum / fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FS	Forward Scatter / Vorwärtsstreulicht
\bar{g}	g-Zahl (Schleuderziffer einer Zentrifuge)
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLA	human leukocyte antigen / Histokompatibilitätsantigen
HSC	hematopoietic stem cell / hämatopoetische Stammzelle
HTG	Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie (Uniklinik Regensburg)
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
ICM	inner cell mass / innere Zellmasse
IL	Interleukin

ISHAGE	International Society of Hematotherapy and Graft Engineering
kD	Kilodalton
LGA	large for gestational age
MACS	Magnetic Cell Separation / Magnetische Zellseparation
MBU	Mikroblutuntersuchung
Mg	Magnesium
MNC	mononukleäre Zelle
MSC	mesenchymal stem cell / mesenchymale Stammzelle
NC	nucleated cell / nukleäre Zelle
NIH	National Institute of Health
n. s.	nicht signifikant
NS	Nabelschnur
p	p-Wert
PBS	phosphate buffered saline / Phosphatpufferlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
r	Korrelationskoeffizient
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
SCF	stem cell factor / Stammzellfaktor
SGA	small for gestational age
SS	Sideward Scatter / Seitwärtsstreulicht
SSA	Schwangerschaftsalter
Std. Abw.	Standardabweichung
STEMMAT	Projekteigename (Neologismus) aus STEM cells and MATerials
TNC	total nucleated cells / Gesamtzahl an nukleären Zellen
TU	Technische Universität
VE	Vakuumentextraktion
w/o	without / ohne
WMA	World Medical Association
ZIMT	Zentralinstitut für Medizintechnik der TU München
α	Signifikanzniveau

III. Abbildungsverzeichnis

- (1) **European Commission Research Directorate:** About stem cells – Seven important questions on stem cells
<http://ec.europa.eu/research/quality-of-life/stemcells/about-graphic01.html> (Stand: 11.07.07)
- (2) **Kirschstein R (Acting Director), Office of Science Policy: Skirboll LR (Director):** Stem Cell Markers
In: „*Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*“. Report prepared by the National Institutes of Health. Department of Health and Human Services Bethesda, MD, USA, 2001, Appendix E
- (3) **Kirschstein R (Acting Director), Office of Science Policy: Skirboll LR (Director):** The Adult Stem Cell
In: „*Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*“. Report prepared by the National Institutes of Health. Department of Health and Human Services Bethesda, MD, USA, 2001, S.23-42
- (4) **Meyer TP, Hofmann B, Zaisserer J, Jacobs VR, Fuchs B, Rapp S, Weinauer F, Burkhart J:** Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2006; 8:265-76
- (5) **Miltenyi Biotec GmbH:** MACS Technology – Gold Standard in cell separation (2006)
http://www.miltenyibiotec.com/download/background_information/680/MACS_Technology_Flyer.pdf (Stand: 27.07.07)
- (6) **Raff M:** Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19:1-22
- (7) **Senn A:** Die Entstehung der Blastozyste (2006)
<http://www.embryology.ch/allemand/evorimplantation/furchung02.html> (Stand: 01.08.07)
- (8) **Sieff CA:** Overview of hematopoiesis and stem cell function (2005)
http://www.uptodateonline.com/utd/content/topic.do?topicKey=hcell_tr/2485&type=A&selectedTitle=1~34 (Stand: 17.07.06)

1 Einleitung

Die Erforschung von Stammzellen, ihrer besonderen Eigenschaften und der sich daraus entwickelnden neuen Therapieansätze in der Medizin hat in den letzten Jahren signifikant an Bedeutung zugenommen. Wissenschaftler und Stammzellforscher erkennen ein großes Potential in diesem relativ neuen Fachgebiet, entwickeln viel versprechende Perspektiven und sehen die Möglichkeit, den menschlichen Bauplan, der in der DNA jeder Zelle kodiert vorliegt, zur Reparatur und ggf. zum Nachbau von verletzten Organen zu verstehen und zu nutzen. Parallel dazu sind die Erwartungen der Öffentlichkeit an die Stammzellforschung durch eine starke Medienpräsenz des Themas sehr hoch. Die Gesellschaft erhofft sich eine schnelle Entwicklung und baldige klinische Anwendung neuer Therapien zur Behandlung oder Heilung bisher inkurabler Erkrankungen und auch die Sehnsucht nach Wiederverjüngung durch innovative Anti-Aging-Therapien wächst zusehends.

Dabei ist die Stammzellforschung zugleich auch ein sensibles Gebiet: Eine Vielzahl von Aspekten u. a. aus den Bereichen Datenschutz, Ethik, Recht, Religion und kultureller Akzeptanz und die Problematik länderspezifischer Unterschiede selbst innerhalb Europas müssen parallel zur Forschung berücksichtigt und gelöst werden. Langfristige Grundlagenforschung und ein umfassendes Verständnis der Funktion von Stammzellen und ihrer Differenzierung sind für eine später erfolgreiche Therapieentwicklung und klinische Anwendung die Voraussetzung.

1.1 Grundlagen der Stammzellforschung

1.1.1 Definition und Vorkommen verschiedener Stammzellarten

Eine Stammzelle wird definiert als Zelle, die sowohl die Fähigkeit besitzt, sich selbst durch Zellteilung zu reproduzieren, als auch das Potential bereithält, sich in differenzierte, d.h. reifere, spezialisierte Zellarten weiterzuentwickeln.

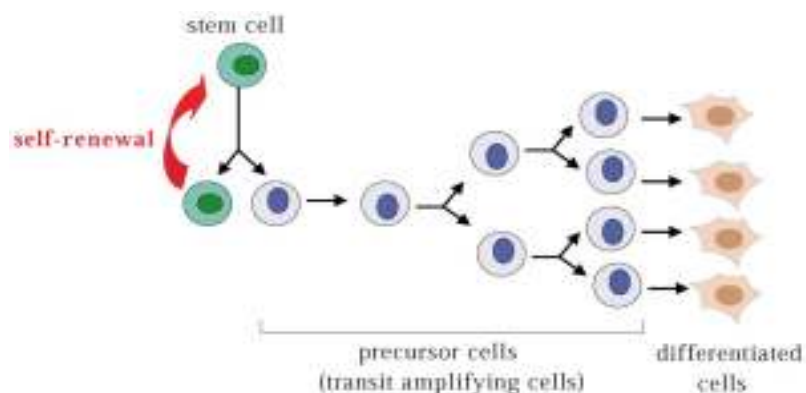
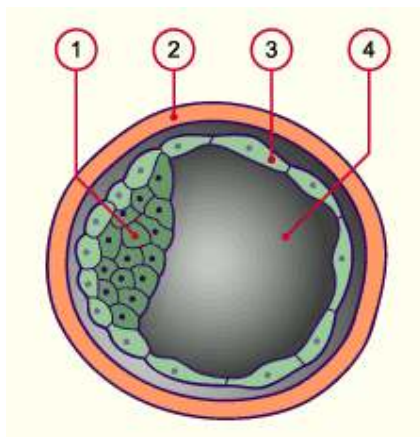


Abb. 1: Die asymmetrische Zellteilung und Differenzierung von Stammzellen. (6)

Im Modell entspricht diese Doppelfunktion einer asymmetrischen Zellteilung (s. Abb. 1), wobei eine der beiden neu entstandenen Zellen die Stammzeleigenschaften behält und die andere sich zu einem differenzierten Zelltyp weiter entwickelt.

Stammzellen variieren in ihrem Differenzierungspotential. Ihre Entwicklung ist hierarchisch aufgebaut und verläuft von der omni- oder totipotenten Stammzelle über die Stadien der Pluri- und Multipotenz bis hin zu den Vorläufer- oder Progenitorzellen der endgültig differenzierten Zellen. An der Spitze dieser Struktur stehen die totipotente Zygote und die Zellen der ersten beiden Zellteilungsschritte.

Etwa vier Tage nach der Fekundation beginnen die vermehrenden Zellen sich zu spezialisieren und bilden die Blastozyste mit der so genannten inneren Zellmasse (ICM), aus der sich der Embryo entwickelt. Dieser auch so genannte Embryoblast besteht zu diesem Zeitpunkt aus etwa 12 Zellen, während der umhüllende Trophoblast, aus dem sich die Eihäute sowie der embryonale Teil der Plazenta entwickeln, um die hundert Zellen aufweist (vgl. Abb. 2 und Abb. 3). Embryonale Stammzellen, die aus der ICM gewonnen werden, sind pluripotent, können sich also in alle Zelllinien der drei Keimblätter, mit Ausnahme des Trophoblasten, ausdifferenzieren ([2] S.420).



- 1) Embryoblast
- 2) Zona pellucida
- 3) Trophoblast
- 4) Blastozystenhöhle

Abb. 2: Blastozyste – Schema. (7)

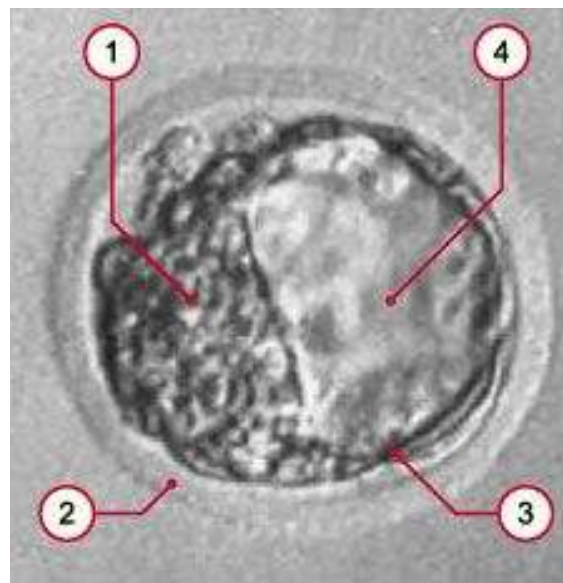


Abb. 3: Aufnahme der Blastozyste am Tag 5. (7)

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen werden Stammzellen, die nach der Geburt dem Organismus oder anhängenden Geweben wie der Nabelschnur entnommen werden, als adulte oder somatische Stammzellen bezeichnet. Sie sind über Jahre hinweg, möglicherweise sogar

jahrzehntlang, in vielen differenzierten Geweben im menschlichen Körper zu finden. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, dienen also dazu einen festen Pool an organspezifischen Stammzellen aufrechtzuerhalten und sind multipotent, d.h. sie können sich je nach Lokalisation in eine limitierte Anzahl von Zelllinien differenzieren ([14] S.831).

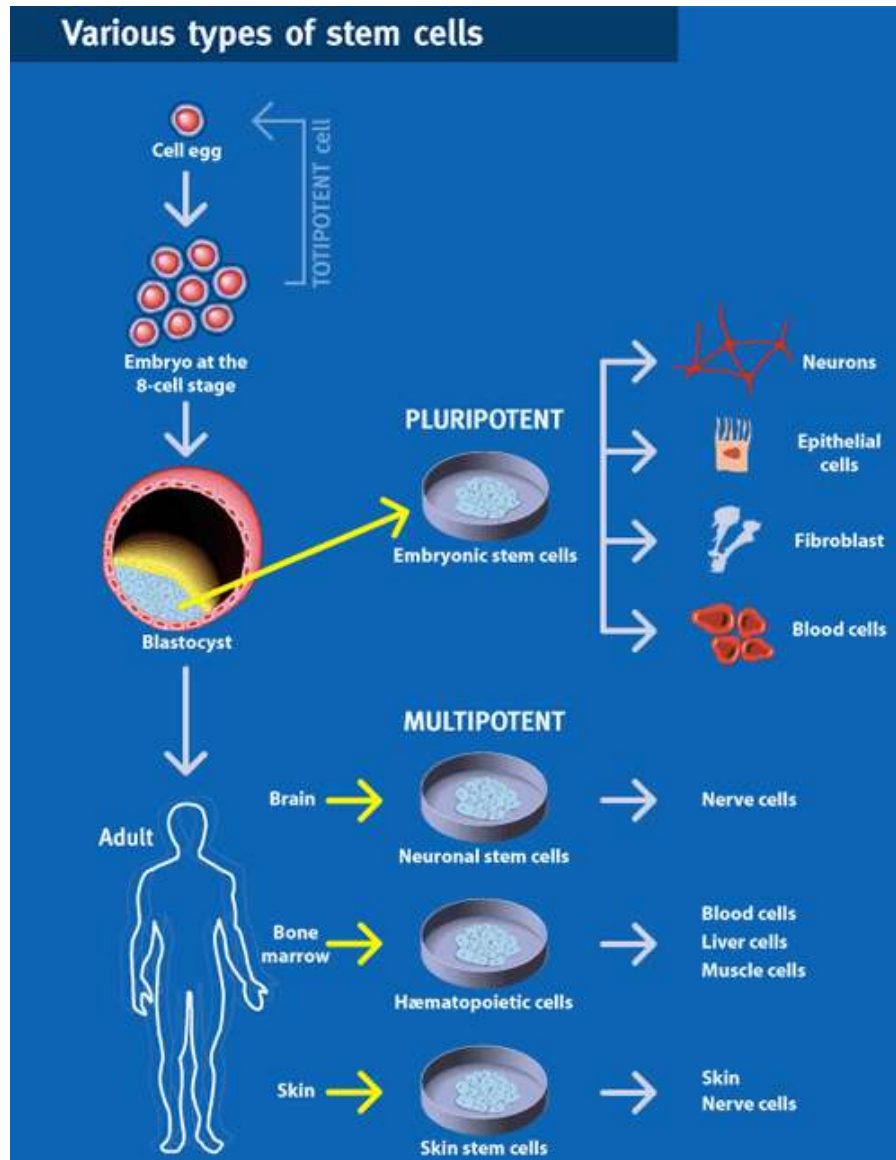


Abb. 4: Differenzierungsweg und Potenz von Stammzellen. (1)

Im weiteren Verlauf der Differenzierungskaskade entstehen aus einer Stammzelle so genannte Vorläuferzellen (engl. *progenitor* oder *precursor cells*). Sie unterscheiden sich von der Stammzelle durch eine sehr hohe Proliferationskapazität, weshalb sie auch als *transit amplifying cells* bezeichnet werden, und stärker limitierte Differenzierungsmöglichkeiten ([77] S.3). Dieser Vorgang läuft im Prinzip in allen Organen nach demselben Mechanismus ab: Zellen teilen sich

und bilden Nachkommen, deren Potential immer weiter eingeschränkt ist, so dass sie am Schluss auf die Bildung eines einzigen Zelltyps beschränkt sind ([36] S.8). Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung geht den Zellen dabei über die Zeit verloren.

Zunächst wurde angenommen, dass adulte Stammzellen nur in Geweben mit hohen Erneuerungsraten wie Blut, Haut, Darm, Gonaden oder dem Respirationstrakt vorkommen; es hat sich aber gezeigt, dass neben Knochenmark und Nabelschnurblut, auf das in dieser Arbeit primär eingegangen werden soll, die meisten, wenn nicht sogar alle Organe, spezifische Stammzellen besitzen oder diese zumindest in Kultur ausbilden können ([77] S.4). Zum Beispiel sind gewebeständige Stammzellen im Fettgewebe des menschlichen Körpers bis ins vierte oder fünfte Lebensjahrzehnt nachweisbar und haben vermutlich regenerative Funktion.

Plastizität bezeichnet die Fähigkeit einer adulten Stammzelle, sich in verschiedene Endgewebe zu differenzieren. Das Konzept der Stammzellplastizität ist neu und die biologischen Vorgänge, die diesem Phänomen zugrunde liegen, sind noch nicht ausreichend geklärt. Lange Zeit galt das Dogma, dass die Differenzierung nur in eine Richtung möglich und unumkehrbar sei. In neuerer Zeit wurden aber Ergebnisse publiziert die nahe legen, dass einige Stamm- und sogar Vorläuferzellen unter experimentellen Bedingungen durch „genetisches Umprogrammieren“ ein keimblatt-überschreitendes Differenzierungspotential, die so genannte Fähigkeit zur Transdifferenzierung, entwickeln können ([52] S.834). Dies könnte vielleicht dazu beitragen, dass embryonale Stammzellen in Zukunft unter Laborbedingungen hergestellt werden können und auf die umstrittene Durchführung von verbrauchender Embryonenforschung verzichtet werden kann.

1.1.2 Stammzellen aus Knochenmark

1.1.2.1 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) bilden zusammen mit den hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) die beiden wichtigsten Stammzellpopulationen des Knochenmarks. Beide sind mesodermalen Ursprungs. Während die hämatopoetischen Stammzellen die Vorläufer der verschiedenen Blutzellen sind, zeigen sich die MSCs für die Ausbildung der Knochenmarkstromazellen verantwortlich ([75] S.443).

Mesenchymale Stammzellen kommen im Knochenmark in einem Verhältnis von einer Stammzelle pro 10^5 mononukleären Knochenmarkszellen (MNCs) vor, können aber aufgrund ihrer spezifischen Adhäsionseigenschaften und mit Hilfe von Zellkulturassays in vitro identifiziert und isoliert werden ([20] S.3216-7). Die Tatsache, dass mesenchymale Stammzellen in vitro vermehrt werden können und nachweislich zur Differenzierung in eine Vielzahl von Zelllinien, einschließlich Knochen-, Knorpel-, Muskel- oder Fettzellen fähig sind, macht sie für Bereiche wie „Tissue Engineering“ oder die Gentherapie-Forschung (s. Kap. 1.3.2) besonders attraktiv ([51] S.235).

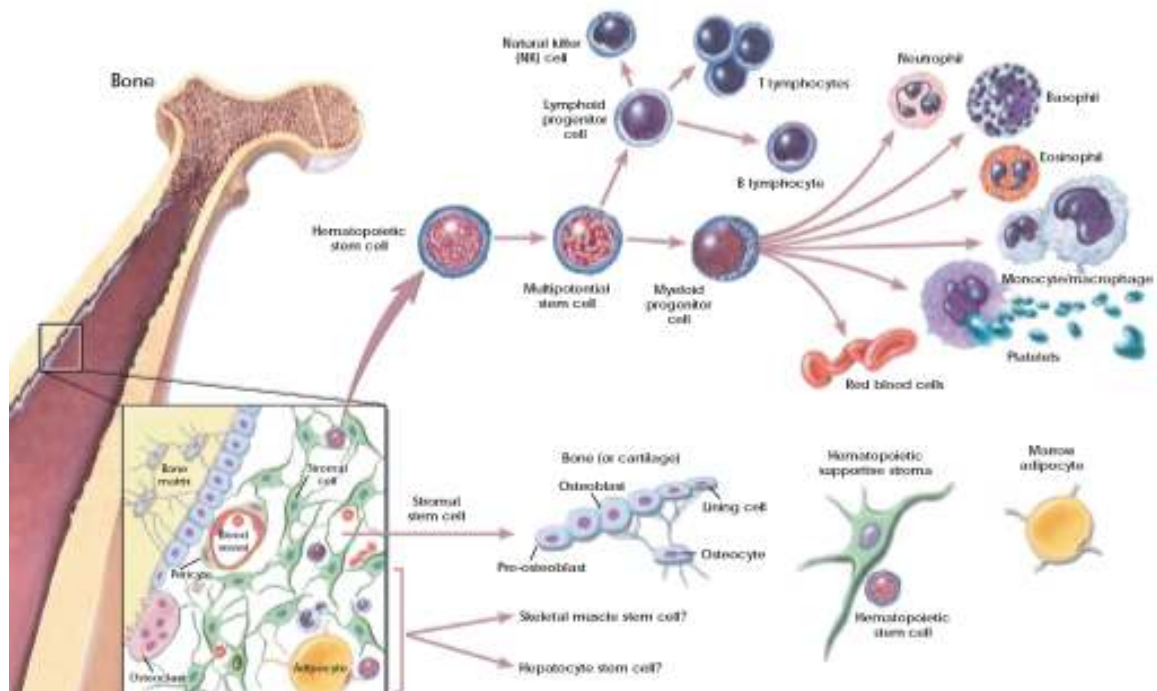


Abb. 5: Differenzierung hämatopoetischer und mesenchymaler Stammzellen. (3)

1.1.2.2 Hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) aus dem Knochenmark sind die gegenwärtig am besten charakterisierten Stammzellen. Fast alle experimentellen Strategien und Konzepte, die heutzutage auf Stammzellen angewendet werden, wurden zuerst für diese Zellen untersucht und entwickelt. Dies gründet sich unter anderem auf folgende kennzeichnende Merkmale: Hämatopoetische Stammzellen sind multipotent - eine einzelne Zelle kann bis zu zehn unterschiedliche reife Zelllinien hervorbringen - und sie besitzen eine ausgeprägte Proliferationskapazität ([15] S.430). Der Anteil an hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark wird auf etwa 0,05 – 0,5% der Knochenmarkzellen geschätzt. Die meisten dieser Zellen werden unter gewöhnlichen Bedingungen jedoch nicht aktiv ([39] S.187-8).

Auch im peripheren Blut können in sehr geringem Maße hämatopoetische Knochenmarkstammzellen nachgewiesen werden. Die Beobachtung, dass die Verwendung von Wachstums- und Stimulationsfaktoren wie GM-CSF oder G-CSF eine verstärkte Ausschüttung dieser Zellen aus dem Knochenmark bewirkt ([57] S.277), vereinfachte die Gewinnung von Stammzellen aus dem peripheren Blut zur Verwendung für Transplantationen. Heutzutage hat sich die Stammzellapherese neben Knochenmark- und Nabelschnurblutspende als gleichwertige Methode für die Stammzellgewinnung etabliert.

1.1.3 Stammzellen aus Nabelschnurblut

Nabelschnurblut ist Blut des fetalen Kreislaufs und reich an hämatopoetischen Stammzellen ([16] S.3830). Diese Zellen sind auch am Ende einer Schwangerschaft noch in großer Anzahl im fetalen Blutkreislauf vorhanden und können durch die postpartale Abnahme des in Umbilikalvene und Plazenta verbleibenden Blutes direkt nach der Geburt gewonnen werden. Trotz ihres zunehmenden Werts für Wissenschaft, Forschung und Therapie werden Nabelschnur und Nabelschnurblut bisher meist als nachgeburtliche biologische Abfallprodukte entsorgt.

Die Isolierung hämatopoetischer Nabelschnurblutzellen erfordert umfangreiche labortechnische Methoden, da sowohl Stamm- als auch Vorläuferzellen im Gegensatz zu reifen Zellen nicht morphologisch erkennbar sind und somit funktionelle Untersuchungen oder die Exprimierung bestimmter Oberflächenmarker, z.B. CD45, CD34 oder CD14, zur Identifikation herangezogen werden müssen ([115] S.297).

Der erste Schritt in der Aufarbeitung im Labor besteht in der Bestimmung der nukleären Zellpopulation (NCs). Nicht nur korreliert der Gehalt an NCs mit dem Transplantationserfolg nach Stammzelltransplantation ([55] S.162, [33] S.376), er ist auch einer der am besten geeigneten Parameter zur Einschätzung des Gehaltes an hämatopoetischen Vorläuferzellen und an CD34-positiven Zellen ([61] S.969). Im weiteren Verlauf der Aufreinigung von Nabelschnurblutproben erfolgt die Gewinnung der mononukleären Zellpopulation mit Hilfe von Zentrifugationsverfahren, immunmagnetischen Verfahren und der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie (s. Kap. 2.3). Jedoch sind nur etwa 1% ([28] S.295) der mononukleären Zellen auch als hämatopoetische Stammzellen zu bezeichnen, die als charakteristisches Merkmal das CD34-Oberflächenantigen, welches mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden kann ([54] S.1, [100] S.118), exprimieren. Diese Zellen werden als CD34-positive Zellen bezeichnet. Zellen, die den Oberflächenmarker nicht exprimieren oder die Fähigkeit dazu verloren haben, werden als CD34-negative Zellen bezeichnet. Das CD34-Antigen ist ein transmembranales Glykoprotein von 90-120 kD, das auch auf Gefäßendothelzellen vorkommt und dessen Funktion noch nicht abschließend geklärt ist. Es wird vermutet, dass das Molekül an der Regulation der Adhäsion an Stromazellen der Mikroumgebung beteiligt ist ([41] S.12243). Der genaue Phänotyp hämatopoetischer Stammzellen ist darüber hinaus aber noch ungenügend definiert.

Das Differenzierungspotential hämatopoetischer Vorläuferzellen ist durch die Koexpression oder die Abwesenheit unterschiedlicher Oberflächenantigene (u. a. AC133, CD38, CD45RA, CD61, CD71, CD90, CD117 und HLA-DR) gekennzeichnet, während mit zunehmender Reifung das CD34-Antigen verloren geht. Die hierarchische Struktur der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen und die Regulierung durch Einfluss von Wachstumsfaktoren, die für die Ausbildung der einzelnen Zelllinien notwendig sind, sind in Abb. 6 dargestellt.

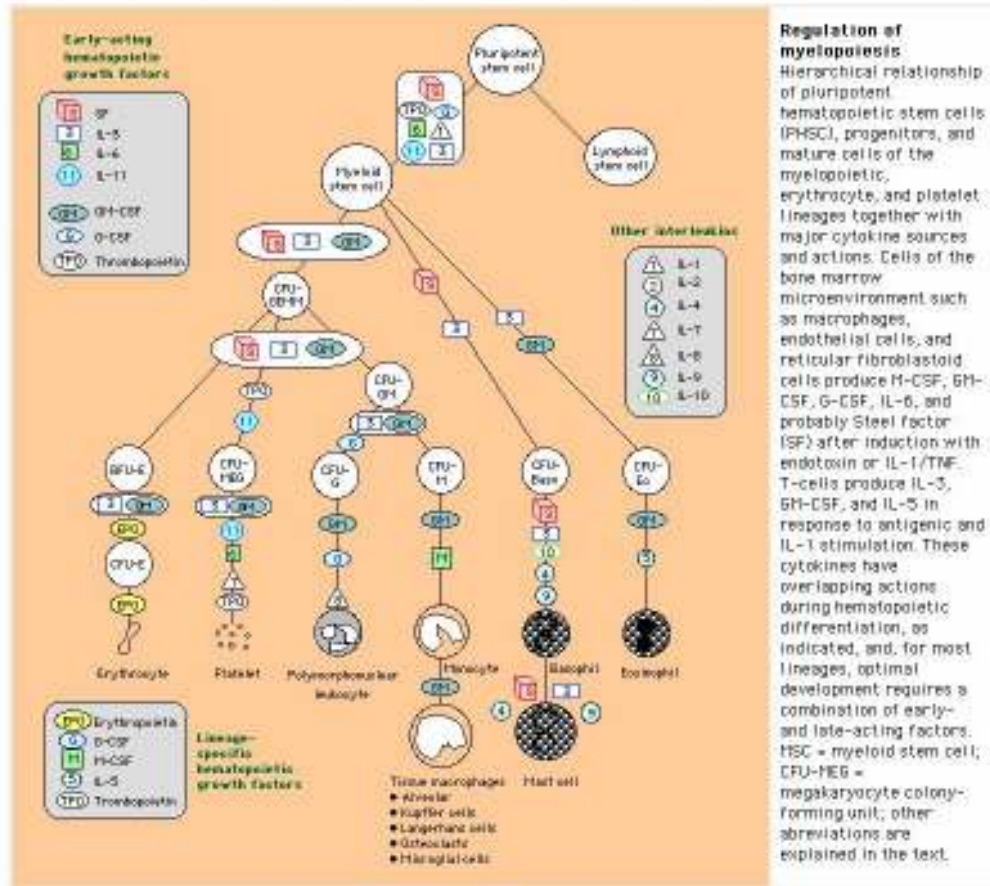


Abb. 6: Die Regulation der Hämatopoese. (8)

Vorläuferzellen bilden nach Immobilisation in semisolidem Medium sowie Stimulation durch Wachstumsfaktoren Kolonien aus reifen Zellen der verschiedenen Zelllinien. Sie werden deshalb oft als „Colony forming cells“ (CFCs) oder „Colony forming units“ (CFUs) zusammengefasst.

Myeloische und erythrozytäre Vorläuferzellen zeigen morphologisch unterschiedliche Kolonien von Zellen, die als „Colony forming unit-granulocyte macrophage“ (CFU-GM) und „Burst forming unit-erythroid“ (BFU-E) differenziert werden (s. Abb. 6).

Über die Präsenz mesenchymaler Stammzellen im Nabelschnurblut ist noch relativ wenig bekannt. Einzelne Untersuchungen konnten jedoch Zellen mit charakteristischen Oberflächenmerkmalen (überwiegend CD34- und CD45-negativ) und Adhäsionseigenschaften isolieren, die in vitro mesenchymale Zelllinien, z.B. Osteoblasten und Adipozyten, ausbilden ([25] S.241). Die bisherigen Ergebnisse lassen ein den mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark mindestens vergleichbares, teilweise sogar überlegenes Potential bezüglich Proliferation und Differenzierung vermuten ([12]).

1.2 Nutzungsmöglichkeiten und Einlagerung von Nabelschnurblut

Nabelschnurblut, das bisher meist als Abfallprodukt nach einer Geburt verworfen wurde, kann grundsätzlich für drei verschiedene Zwecke genutzt werden: Zur adulten Stammzellforschung oder zur Einlagerung in einer öffentlichen oder privaten Nabelschnurblutbank. Diese drei Einlagerungsmöglichkeiten ersetzen sich nicht gegenseitig, sondern weisen grundsätzliche Unterschiede auf.

Wie bereits beschrieben ist der Mangel an histokompatiblen Stammzellspendern der fundamentalste limitierende Faktor für eine erfolgreiche allogene Stammzelltransplantation, das ist eine Transplantation bei der – im Gegensatz zur autologen Stammzelltransplantation – Spender und Empfänger nicht identisch sind. Nur für ca. 40% der Patienten, die eine Stammzelltransplantation benötigen, kann ein HLA-identischer Spender gefunden werden.

Aufgrund der viel versprechenden Ergebnisse der ersten Nabelschnurbluttransfusionen begannen einige Zentren in aller Welt öffentliche Nabelschnurblutbanken aufzubauen ([34] S.96). Das größte Zentrum dieser Art entwickelte sich in New York, andere große Banken existieren in Düsseldorf, Mailand, Paris, Madrid, etc. und arbeiten eng zusammen (s. auch www.netcord.org Stand: 28.07.2007). Die dort aufbewahrten Stammzellproben werden ausschließlich für allogene Transplantationen verwendet. Durch öffentliche Nabelschnurblutbanken wird versucht, den Bedarf an Stammzellen für Patienten für die kein HLA-identischer verwandter Spender gefunden wurde - das sind etwa zwei Drittel aller auf Stammzelltransplantation angewiesener Patienten - sicherzustellen. Viele öffentliche Blutbanken zielen bei der Anwerbung von Spendern auf die Beteiligung ethnischer Minderheiten ab, da diese Gruppen im Knochenmarktransplantationsregister unterrepräsentiert sind, wobei die Inzidenz der durch Stammzelltransplantation therapierbaren Erkrankungen innerhalb dieser Minderheiten aber erhöht sein kann und sich somit die Bedarfsdeckung im Vergleich zur relativ homogen strukturierten genetischen HLA-Typisierung der nordeuropäischen Gesellschaft schwieriger gestaltet ([113] S.996).

Zusätzlich zu diesen weltweit zugänglichen und zum Teil staatlich geförderten Nabelschnurblutbanken für anonym gespendetes Nabelschnurblut entstand parallel zur Entwicklung der regenerativen Medizin in den letzten Jahren die Geschäftsidee, Nabelschnurblut für den Spender selbst zur Eigennutzung einzulagern. Diesem Zweck dienen die privaten Nabelschnurblutbanken. Sie bieten zukünftigen Eltern kommerziell auf privater Vertragsbasis die langfristige persönliche Aufbewahrung des Nabelschnurbluts ihres Kindes oder bestimmter Zellanteile davon an, um es zu einem späteren Zeitpunkt ggf. nutzen zu können. Nach deutschem Recht ist das Nabelschnurblut Eigentum des Kindes und wird von den Eltern nur treuhänderisch bis zu seiner Volljährigkeit verwaltet. Es ist zur Nutzung für den Bedarfsfall einer autologen Transplantation, also vom Spender auf den Empfänger zurück, oder für eine zurzeit noch relativ abstrakte Verwendung im Rahmen der regenerativen Medizin, gedacht. Gerichtete

Spenden, z.B. von einem gesunden Neugeborenen an ein bereits erkranktes Familienmitglied, z.B. ein älteres Geschwisterkind, sind in Deutschland rechtlich prinzipiell nicht verboten, die Induktion einer Schwangerschaft zu Transplantationszwecken und vorgeburtliche Testungen des Ungeborenen bezüglich einer Spendereignung jedoch schon ([108] Kap. 2.1). International werden gerichtete Spenden mit privat eingelagertem Nabelschnurblut aber wesentlich häufiger durchgeführt als autologe Nabelschnurbluttransplantationen ([48]). Aus wissenschaftlicher Sicht wird die private Einlagerung kontrovers diskutiert (vgl. [27]) und zum gegenwärtigen Zeitpunkt aufgrund geringer Kosteneffizienz sowie einem Mangel an aussagekräftigen wissenschaftlichen Daten staatlicherseits weder empfohlen noch durch die gesetzlichen Krankenkassen finanziert. Das stärkste Argument gegen diese Einlagerung besteht in der relativ geringen Wahrscheinlichkeit, dass die Stammzellen aus Nabelschnurblut jemals für den Spender oder ein Familienmitglied benötigt werden bzw. dann tatsächlich genutzt werden können. Das Konzept der privaten Nabelschnurblutbanken, für jedes Kind nach der Geburt eine Nabelschnurblutprobe einzulagern, wird somit in Anbetracht der hohen Einlagerungskosten und der niedrigen Wahrscheinlichkeit für den Bedarf einer autologen Spende, die auf etwa 1% oder weniger geschätzt wird ([80] S.476), vermutlich nicht der Regelfall werden.

Private Nabelschnurbanken stehen jedoch nicht in Konkurrenz zu öffentlichen Nabelschnurbanken, da sie aufgrund differierender Nutzungsabsichten des Nabelschnurblutes unterschiedliche Zielgruppen ansprechen. Untersuchungen der Arbeitsgruppe an der Frauenklinik der TU München konnten bestätigen, dass private Nabelschnurblutbanken, zumindest zum gegenwärtigen Zeitpunkt, die Probenanzahl für die wissenschaftliche Forschung nicht wesentlich einschränken ([47] S. 225).

1.3 Klinische Anwendung von Nabelschnurblutstammzellen

Das Interesse an Nabelschnurblut ist nicht auf die Grundlagenforschung beschränkt, sondern dehnt sich seit einigen Jahren zunehmend in Richtung klinische Anwendung aus. Man unterscheidet dabei die beiden oben beschriebenen Transplantationsformen, autolog und allogene, sowie die Anwendung im Bereich der Regenerativen Medizin.

1.3.1 Einsatzmöglichkeiten für die Transplantation

Die autologe und allogene Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen aus Knochenmark und nach Mobilisation auch aus peripherem Blut wird seit Jahrzehnten erfolgreich für die Behandlung von malignen Erkrankungen, einschließlich Leukämien, lymphoproliferativen Erkrankungen und Tumoren sowie nicht-malignen Störungen wie Erbkrankheiten und Autoimmunerkrankheiten eingesetzt. Während die Zahl der Stammzelltransplantationen stetig

steigt, besteht ein Mangel an Stammzellspendern. Deshalb haben alternative Quellen zur Gewinnung von Stammzellen eine große Bedeutung erlangt. Frühe Studien zeigten, dass die aus einer Nabelschnurblutprobe gewonnene Anzahl von Stammzellen für eine hämatopoetische Rekonstitution nach allogener Transplantation zumindest für Kinder und Jugendliche ausreichen und Nabelschnurblut somit als Alternativquelle neben Knochenmark und mobilisierten peripheren Blutstammzellen angesehen werden kann ([17] S.4675). Der Gehalt an Stammzellen, der für eine klinische Anwendung für die Transplantation bei postpartaler Gewinnung der Nabelschnurblutprobe angestrebt wird, liegt bei einer Anzahl von mindestens $1,2 \times 10^5$ CD34-positiven ([58] S.1819) bzw. 3×10^7 nukleären Zellen ([35] S.147) pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers. Seit der ersten Transplantation von Nabelschnurblut bei einem an Fanconi-Anämie erkrankten Kind im Jahre 1988 ([32]) stieg die Anzahl der durchgeführten Transplantationen, sowohl zwischen verwandten ([111]) als auch zwischen nicht verwandten Spendern und Empfängern ([81]) auf eine Zahl von über 5.800 Transplantationen zum gegenwärtigen Zeitpunkt (vgl. [43]). Die Untersuchungen bestätigten dabei die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit Knochenmarkstransplantationen.

Die Verwendung von Nabelschnurblut als Quelle für hämatopoetische Stammzellen zur Transplantation bietet im Vergleich zu Knochenmark einige Vorteile ([17] S.4674). Diese sind unter anderem die risikolose, nichtinvasive Abnahmemethode, die praktisch unlimitierte Anzahl von geeigneten Spendern, die niedrigere Inzidenz von Infektionskrankheiten bei Neugeborenen im Gegensatz zu Knochenmarkspendern und die schnellere Verfügbarkeit der Proben bei Bedarf. Mit am wichtigsten ist aber, dass schwere Graft-versus-Host-Reaktionen nach Transplantation mit Stammzellen aus Nabelschnurblut seltener auftreten ([79] S.1849). Der größte praktische Nachteil liegt im oft begrenzten Abnahmevolumen von Nabelschnurblutproben und daraus resultierend einer proportional nur für ein geringes Körpergewicht ausreichenden absoluten Zahl von Stammzellen. Obwohl die Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut im Vergleich zu Knochenmark eine größere proliferative Kapazität aufweisen ([24] S.3084), erreicht der durchschnittliche Zellgehalt der Proben in der Regel die oben genannten Mindestvoraussetzungen an Zellzahlen pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers nicht. Somit bleibt die Anwendung Erwachsenen zum gegenwärtigen Zeitpunkt in den meisten Fällen versagt und beschränkt sich größtenteils auf Kinder und Jugendliche. Die Forschung bemüht sich deshalb vermehrt darum, Möglichkeiten zur ex vivo Vermehrung von Nabelschnurblutstammzellen zu entwickeln.

Obwohl die Nutzung von Nabelschnurblut als autologe Transfusion für anämische Neugeborene oder für chirurgische Eingriffe während der ersten Lebensstage als Alternativmethode anerkannt ist ([45] S.14-5), gibt es nur wenige Untersuchungen zur Anwendung von Nabelschnurblutstammzellen für die autologe Transplantation. In Zukunft könnte die Transplantation von gentherapeutisch veränderten Nabelschnurblutstammzellen eine Behandlung von kongenitalen hämatopoetischen Erkrankungen ermöglichen ([17] S.4672-3).

1.3.2 Einsatz im Rahmen der Regenerativen Medizin

Die Regenerative Medizin ist eine neue interdisziplinäre Wissenschaft und beschäftigt sich seit einigen Jahren mit der Wiederherstellung von Organen und Organfunktionen im weitesten Sinne. Dazu gehören unter anderem die Entwicklung von Anti-Aging-Therapien, die Regeneration nach alters-, krankheits- oder unfallbedingter Organ- und Gewebstransplantation, die Möglichkeiten der Zell- und Gewebsregeneration bzw. des Zell- oder Gewebsersatzes, das Verständnis von immunologischen Wundheilungsprozessen, die Erforschung neuer Pharmakotherapien und Biomaterialien sowie die klinische Applikation von Stammzellen als Ersatz für durch Krankheit oder Verletzung zerstörtes Gewebe. Studien an Tiermodellen sowie erste experimentelle Therapieversuche an Menschen haben bereits die Wirksamkeit von embryonalen Stammzellen und daraus differenzierter Zellen bei der Behandlung zahlreicher degenerativer Erkrankungen wie Chorea Huntington, Muskeldystrophien, Diabetes oder kardiovaskulären Erkrankungen bestätigt ([42] S.747).

Ebenso zeigen mesenchymale Knochenmarksstammzellen ausreichendes Potential für Zell- oder Gewebsersatz. Ihre Applikation führte zu einer Beschleunigung der Heilungs- bzw. Erholungsprozesse bei einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen wie Schlaganfall ([18] S.1009), Rückenmarkkontusionsverletzungen ([19] S.3003), traumatischen Schädelverletzungen ([63] S.1200) und Morbus Parkinson ([59] S.70). Aufgrund ihrer Fähigkeit, sich in unterschiedliche mesenchymale Gewebe, einschließlich Knochen, Knorpel, Sehnen, Muskel- und Fettgewebe, auszudifferenzieren, sind MSCs aus dem Knochenmark wie auch aus dem Nabelschnurblut eine attraktive Quelle für Ansätze des „Tissue Engineering“ ([78] S.338). Hiermit wird ein interdisziplinäres Arbeitsgebiet beschrieben, das die Prinzipien und Methoden der Ingenieurwissenschaften mit denen der biomedizinischen Forschung kombiniert, um Verfahren zur Herstellung vitaler Ersatzgewebe aus autologem Zellmaterial, ggf. unter Verwendung semipermanenter resorbierbarer Gerüststrukturen, zu entwickeln ([96] S.446). In bestimmten Bereichen, z.B. dem Ersatz von Herzklappen, der Herstellung von Gefäßprothesen oder der Myokardregeneration bei kardiovaskulären Erkrankungen, werden die Methoden des „Tissue Engineering“ bereits erfolgreich klinisch angewendet.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung vorliegender Arbeit

Wie dargestellt, ist die Gewinnung einer maximalen relativen und absoluten Anzahl von Stammzellen aus dem Nabelschnurblut die unabdingbare Voraussetzung für ihre weitere Erforschung und vor allem für eine eventuelle spätere klinische Nutzung. Da sich das Nabelschnurblutvolumen nur begrenzt steigern lässt ohne dem Neugeborenen Blutvolumen vorzuenthalten, ist der biologische Einfluss der prä- und peripartalen Faktoren, insbesondere der stressassoziierten Parameter, auf die Anzahl der Stammzellen im Nabelschnurblut zunehmend in

den Fokus des Forschungsinteresses gerückt.

Die Nabelschnurpunktion zur Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen erfolgt wenige Momente nach der Geburt, der bis dahin größten Stresssituation für einen Fetus bzw. ein Neugeborenes. Fetaler Stress kann dabei im Vergleich zu adultem Stress offensichtlich kaum an Verhaltensmustern gemessen werden. Auch die unter experimentellen Bedingungen zum Teil schon ab der 18. Woche nachgewiesene hormonelle und die in der späten Phase der Schwangerschaft folgende zirkulatorische Stressantwort des Fetus im Sinne einer Zentralisierung des Blutflusses, die unter anderem in Zusammenhang mit Hypoxien ([31] S.1065-6), Blutverlust ([67] S.193) und reduzierter uteriner Blutversorgung ([49] S.312) beobachtet wurde, sind im klinischen Alltag schwer messbar und wenig praktikabel. Deshalb wird als Ersatz zur Einschätzung des fetalen Stresses, der sowohl als Langzeitstress während der Schwangerschaft als auch als akuter, aber kurzzeitiger Stress während der Geburt auftreten kann, eine Bewertung physiologischer Parameter herangezogen. So können z.B. die fetale Herzrate im CTG, der Apgar-Score oder der arterielle Nabelschnur-pH-Wert des Neugeborenen auf eine durchgemachte Hypoxie, eine nicht adäquate Anpassung, oder andere stresshafte Einflüsse hinweisen. In Anbetracht der Tatsache, dass akute Stresssituationen ([86] S.2778) und ischämische Zustände bei Erwachsenen eine verstärkte Mobilisierung und Ausschüttung von Stamm- oder Vorläuferzellen zur Folge haben ([103] S.437), wurde die Hypothese aufgestellt, dass verschiedene fetale, maternale, geburtsassoziierte und externe Faktoren einen Einfluss auf die Stammzellzahl im Nabelschnurblut haben könnten.

In den Vorarbeiten im Rahmen von STEMMAT, einem multizentrischen Projekt des Freistaates Bayern zur Forschung an adulten Stammzellen im Zeitraum von 2002 bis 2005 (vgl. [46]), war in den Laborergebnissen eine große Variation bezüglich der Zellzahl CD34-positiver Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut aufgefallen. Aufgrund der hohen Probenzahl innerhalb des Projekts bot sich die Gelegenheit, die oben aufgestellte Hypothese an einem großen Kollektiv zu überprüfen. Um die Ursache für die Varianz der relativen Stammzellzahlen zu finden und um die absolute Anzahl von CD34-positiven Zellen für eine spätere Anwendung zu optimieren, sollten in dieser Dissertation als einem Teilprojekt von STEMMAT verschiedene Faktoren – insbesondere jene, die auf fetalen Stress oder eine potentielle hypoxische Einwirkung hinweisen – in einer statistischen Analyse einzeln und in Kombination auf ihren prädiktiven Wert bezüglich der später im Nabelschnurblut gefundenen Zellzahl untersucht werden. Die gleiche Auswertung wurde für die Gesamtgruppe der mononukleären Zellen vorgenommen. Im Fall eines statistischen Zusammenhangs sollten die Ergebnisse mit den bisherigen Publikationen verglichen werden und – falls möglich – daraus Handlungsanweisungen zur Steigerung der Zellzahlen für eine effizientere postpartale Stammzellgewinnung aus Nabelschnurblut abgeleitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Das STEMMAT-Projekt

Vorliegende Arbeit ist ein Teilprojekt des STEMMAT-Forschungsprojekts. STEMMAT, ein Verbundprojekt zur Erforschung von adulten Stammzellen aus Nabelschnur und Nabelschnurblut, wurde im Jahre 2002 unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr.-Ing. Wintermantel, Direktor des Zentralinstituts für Medizintechnik der TU München in Garching, initiiert. Als gleichberechtigte Forschungspartner waren die III. Medizinische Klinik und die Frauenklinik der TU München am Klinikum rechts der Isar, der Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) in München, die Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg sowie als Industriepartner die Klimatechnik-Firma Binder aus Tuttlingen beteiligt.

Das STEMMAT-Projekt verfolgte verschiedene Schwerpunkte, darunter

- die Feststellung der Wertigkeit und des Potentials von Nabelschnurgewebe und Nabelschnurblut sowie Blutstammzellen für das „Tissue Engineering“ (**STEM CELL**),
- die Entwicklung einer Logistik von geeigneten Kryokonservierungstechniken für Nabelschnurgewebe, Nabelschnurblut und periphere Stammzellen aus dem Blut (**MATERIALS TECHNOLOGY**) und
- die vergleichende Analyse der Restvitalität nach verschiedenen Einfrierprozeduren zwischen den bisher bekannten Blutstammzellen und den Nabelschnurgewebezellen.

Am 22.01.03 wurde der Antrag zur Durchführung der STEMMAT-Studie von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München bewilligt. In drei weiteren Amendments wurde unter anderem auch die Datenerfassung und Auswertung für diese Dissertation bewilligt (vgl. Kap. 2.2.1).

Die Aufgabenverteilung erfolgte mit den Schwerpunkten wie in Abb. 7 dargestellt:

- Frauenklinik: Nabelschnur- und Nabelschnurblutprobenerfassung und Logistik
- III. Medizinische Klinik: Hämatopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut
- Blutspendedienst des BRK: Nabelschnurblutkryokonservierung
- HTG Regensburg: Eigenschaften von Nabelschnur und -gefäßen
- ZIMT: Nabelschnurstroma

Das STEMMAT-Forschungsprojekt lief von 2002 bis 2005 und wurde vollständig durch das Bayerische Staatsministerium für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz im Rahmen der Gesundheitsinitiative BAYERNAKTIV getragen. Mit der Förderung des Projektes sollte – aus

politischen Gründen – zielgerichtet die adulte Stammzellforschung als Gegengewicht zur embryonalen Stammzellforschung etabliert und unterstützt werden. Die Finanzierung lief im Herbst 2005 aus, die verschiedenen Forschungsprojekte und die Zusammenarbeit zwischen den Forschungspartnern werden seitdem aus eigenen Mitteln der Projektpartner fortgesetzt. Die Auswertung und Publikation der Ergebnisse der einzelnen Forschungsgruppen geht unabhängig davon weiter.

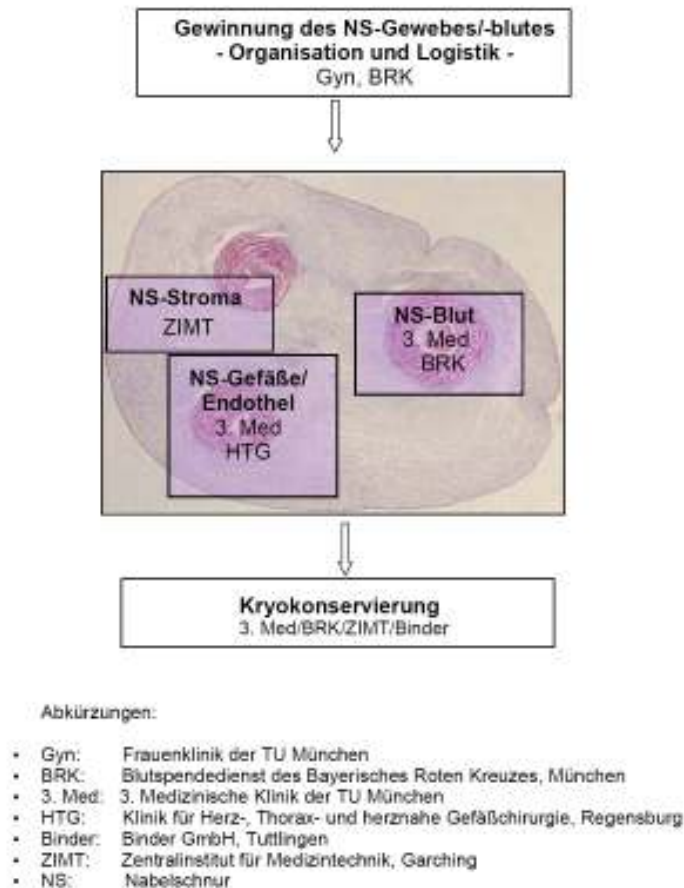


Abb. 7: Schematische Aufgabenverteilung im STEMMAT-Verbund (dargestellt am Querschnitt durch eine Nabelschnur)

2.2 Probengewinnung

2.2.1 Rechtliche Grundlagen

Für die rechtsgültige Einwilligung der werdenden Mutter erfolgte die Aufklärung nach dem „Informed Consent“-Modell (in Kap. 2.5.1 näher beschrieben), denn auch bei biologischen Abfallprodukten wie Nabelschnur und Nabelschnurblut besteht ein grundsätzliches

Eigentumsrecht des Patienten bzw. dessen Eltern. Zusätzlich muss bei allen Forschungsprojekten mit Patientenbeteiligung auch die Einwilligung der lokalen Ethikkommission vorliegen. Das initiale Ethikvotum der TU München vom 28.01.03 wurde im Laufe des Projektes durch drei Amendments – Amendment Nr. 1 über die Datenerfassung für dieses Teilprojekt, bewilligt am 30.07.03, Amendment Nr. 2 vom 08.10.03 über die zusätzliche Probensammlung von Plazenta und Eihaut und Amendment Nr. 3 über die Weitergabe von Biomaterial und Zellen an wissenschaftlich arbeitende Institutionen, bewilligt am 11.06.04 – erweitert. Die Vorgaben für die Patientenforschung aus der Helsinki-Deklaration in ihrer aktuellen Version von der WMA Generalversammlung in Tokio 2004 wurden ebenfalls eingehalten (vgl. [104]).

2.2.2 Abnahmetechnik

Für die Abnahme des Nabelschnurblutes wurden während der ersten Monate des Auswertungszeitraumes (31.07.03 – 16.02.04) geschlossene sterile Beutelsysteme (MACO Pharma International GmbH, Langen) mit 21 ml Blutstabilisatorlösung (CPD) verwendet. Danach stellte man aus Kostengründen auf ein qualitativ gleichwertiges, aber einfacheres und wesentlich kostengünstigeres System (Blutabnahmebeutel 1-BB-150-CPD-NP; Gerätezentrale für Bluttransfusion des Österreichischen Roten Kreuzes, Eugendorf, Österreich) um.



Zusammensetzung Blutstabilisatorlösung CPD:

Natriumphosphat 2,51 g/l

Natriumcitrat 26,3 g/l

Glucose 25,5 g/l

Zitronensäure 3,27 g/l

Abb. 8: Anfangs verwendetes Nabelschnurblutabnahmesystem der Fa. MACO.

Die Abnahme des Nabelschnurblutes erfolgte durch geschulte Hebammen unmittelbar nach Abnabelung des Neugeborenen und in der Regel sowohl bei Sectios als auch bei vaginalen Entbindungen bei noch ungeborener Plazenta, da die stärkere natürliche Kompression in utero zu einem größeren gewonnenen Probenvolumen führt. Der Zeitpunkt der Abnabelung entsprach jedoch stets dem individuellen Geburtsverlauf und wurde nicht unter dem Gesichtspunkt, das Probenvolumen zu vergrößern, modifiziert. Unter sterilen Bedingungen wurde die Nabelschnur auf einer Länge von mehreren Zentimetern und im ganzen Umfang zweifach mit Sprühdessinfektionsmittel desinfiziert, die Einwirkzeit abgewartet und die Nabelschnurvene

punktiert. Das Beutelsystem wurde während des gesamten Vorganges unterhalb des Arbeitsniveaus gelagert und die Abnahme erst nach Stagnation des Blutflusses beendet. Der Schlauch des Blutbeutels wurde abgeklemmt, die Nadel sachgerecht entfernt und die Blutprobe, nach Beschriftung mit Geburtsdatum und Uhrzeit sowie einer fortlaufenden Nummer zur Identifikation, bei Raumtemperatur gelagert.



Abb. 9: Blutbeutel nach erfolgter Abnahme mit Beschriftung.

2.2.3 Lagerung und Verteilung der Proben

Als zentraler Lager- und Sammelort wurde der Kreißsaal der Frauenklinik der TU München festgelegt. Dort wurden die Informations-, Aufklärungs- und Einwilligungsbögen (s. Anhang) vorgehalten und die Nabelschnurblutproben nach erfolgter Abnahme bei Raumtemperatur bis zum Weitertransport an oder die Abholung durch die jeweiligen Forschungspartner gelagert.

Entsprechend des Forschungsbedarfs und der individuellen Laborkapazitäten der Projektpartner wurde ein Plan zur zeitlichen Verteilung der Nabelschnurblutproben entwickelt. Die Verarbeitung der Nabelschnurblutproben erfolgte in zwei verschiedenen Labors in München. Proben aus dem Zeitraum von Dienstag ca. 18 Uhr bis Sonntag 8 Uhr gingen an das Labor der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar, die Blutproben des restlichen Zeitraums erhielt das Labor des Blutspendedienstes des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) in München (vgl. Abb. 10).

Der Transport zum Labor des Blutspendedienstes erfolgte jeweils Montag und Dienstag abends durch Mitarbeiter der Frauenklinik in kältegeschützten Tragebeuteln. Das Labor der III. Medizinischen Klinik holte die ihnen zugeteilten Proben entsprechend dem Verteilungsplan im Tagesverlauf nach Bedarf aus dem Kreißsaal ab.

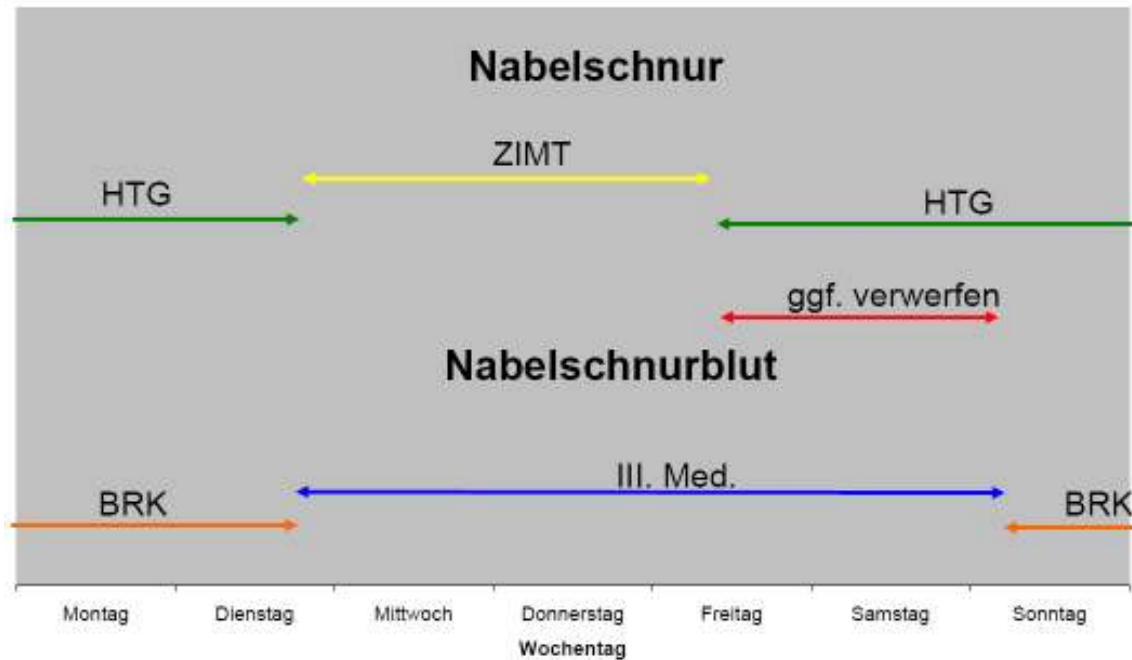


Abb. 10: Zeitlicher Wochenverteilungsplan von Nabelschnur und Nabelschnurblutproben an die beteiligten Forschungspartner.

2.3 Probenverarbeitung

2.3.1 Grundlagen der Labormethodik

Im Folgenden werden einige Labormethoden näher erläutert, um das Verständnis der zur Identifikation und Quantifizierung von mononukleären Zellen (MNCs) und CD34-positiven Zellen durchgeführten notwendigen Schritte zu erleichtern.

2.3.1.1 Dichtegradientenzentrifugation

Obwohl angenommen wird, dass Nabelschnurblut verhältnismäßig mehr primitive hämatopoetische Vorläuferzellen enthält als Knochenmark, wird vermutet, dass eine erhebliche Anzahl dieser Zellen bei der Aufarbeitung im Rahmen der Vorbereitung zur Kryokonservierung verloren gehen ([16] S.3830-1). So wurden mit den anfänglich verwendeten und ursprünglich für die Aufarbeitung von Knochenmark entwickelten Gradientenseparationsverfahren nur unzureichende Ergebnisse, sowohl in Bezug auf den Anteil der gewonnenen Vorläuferzellen als auch in Bezug auf eine vollständige Erythrozytenlyse, erreicht ([72] S.671). Dies wurde auf die Unterschiede in Erythrozytendichte, -stabilität, Oberflächenbeschaffenheit der Erythrozyten und die unterschiedliche Differenzierungs- und Selbsterneuerungskapazität der Nabelschnurvorläuferzellen unter den für Knochenmarkzellen entwickelten Bedingungen zurückgeführt ([105] S.103).

Mit der Etablierung von Nabelschnurbanken gewann dieses Problem an Bedeutung. Man begann effizientere Separationsmethoden zu entwickeln, welche eine Volumenreduktion der Nabelschnurblutproben und damit eine Senkung der Einlagerungskosten erlauben. Darüber hinaus galt es, ein adäquates Verfahren zur Erythrozytenlyse zu entwickeln. Die Verunreinigung der Probe durch Erythrozyten war und ist ein Hauptproblem und damit der zwingende Grund zur Aufbereitung von Nabelschnurblut vor jeder Verarbeitung und Einlagerung. Im Labor erschwert sie die Bestimmung der mononukleären Zellen und reduziert damit den Anteil an Vorläuferzellen in der Probe, in der Praxis kann eine Injektion größerer Mengen Erythrozyten oder DMSO dem Patienten durch anfallende Hämolyseprodukte und durch die Toxizität von DMSO schaden. Außerdem verringert die Ausfällung der roten Blutkörperchen die Gefahr einer ABO-Antigen Unverträglichkeitsreaktion ([3] S.538). Verschiedenste Methoden wurden im Laufe der Jahre etabliert und verglichen (z.B. [26], [40], [74]) und neue Verfahren mit modifizierten Medien, Materialien oder Abläufen entwickelt ([4]), auf deren detaillierte Ausführung hier nicht näher eingegangen werden kann. Ein Konsens zur Vereinheitlichung und internationalen Standardisierung der Dichtegradientenzentrifugation zur Aufbereitung von Nabelschnurblut steht allerdings noch aus.

2.3.1.2 FACS-Analyse

Dieses Verfahren zur Zellisolierung hat sich in den letzten Jahren zu einem Standardverfahren in vielen Gebieten der Labormedizin etabliert und eignet sich unter anderem zur schnellen, exakten und verlässlich reproduzierbaren Bestimmung von CD34-positiven Zellen. Mitte der 1990er Jahre entwickelte die International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) ein Protokoll, das eine einheitliche durchflusszytometrische Bestimmung von CD34-positiven Zellen ermöglichen und etablieren sollte. Die Verarbeitungsabläufe in den beiden an dieser Untersuchung beteiligten Labors orientierten sich weitgehend an den im Folgenden kurz beschriebenen Richtlinien des ISHAGE-Protokolls (vgl. [102]).

Um eine kostengünstige und einfach durchführbare Methode zu garantieren, empfiehlt das Protokoll ein Verfahren, das auf einer schon 1994 von Sutherland et al. ([101]) beschriebenen Zweifachfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD34 und CD45 sowie den spezifischen Lichtstreuungseigenschaften der Zellen beruht. Die vorwärts gerichtete Lichtstreuung (forward scatter, FS) ist mit der Größe der Zellen assoziiert, die seitliche Lichtstreuung (sideward scatter, SS) sagt etwas über die Granularität der Zellen aus. Um die selten vorkommenden CD34-positiven Zellen zu identifizieren ist es außerdem von Vorteil, die Antikörper mit einem stark fluoreszierendem Konjugat, z.B. Phycoerythrin (PE), zu koppeln. CD45-Antikörper werden als zusätzliche Parameter zur Isolation der CD34-positiven Zellpopulation verwendet. Primitive Blasten exprimieren charakteristischerweise CD45 in geringem bis mittelgradigen Ausmaß. Vor allem in Kombination mit der seitlichen Lichtstreuung ist die CD45-Expression ein Merkmal, das

sich zur Bestimmung von normalen und leukämischen Blastenzellpopulationen verwenden lässt. Außerdem ist die CD45-Färbung ein Indikator für die Effektivität der Erythrozytenlyse und ermöglicht es, Leukozyten von z.B. durch Thrombozytenaggregate oder anderen Verunreinigungen hervorgerufenen unerwünschten Effekten zu unterscheiden.

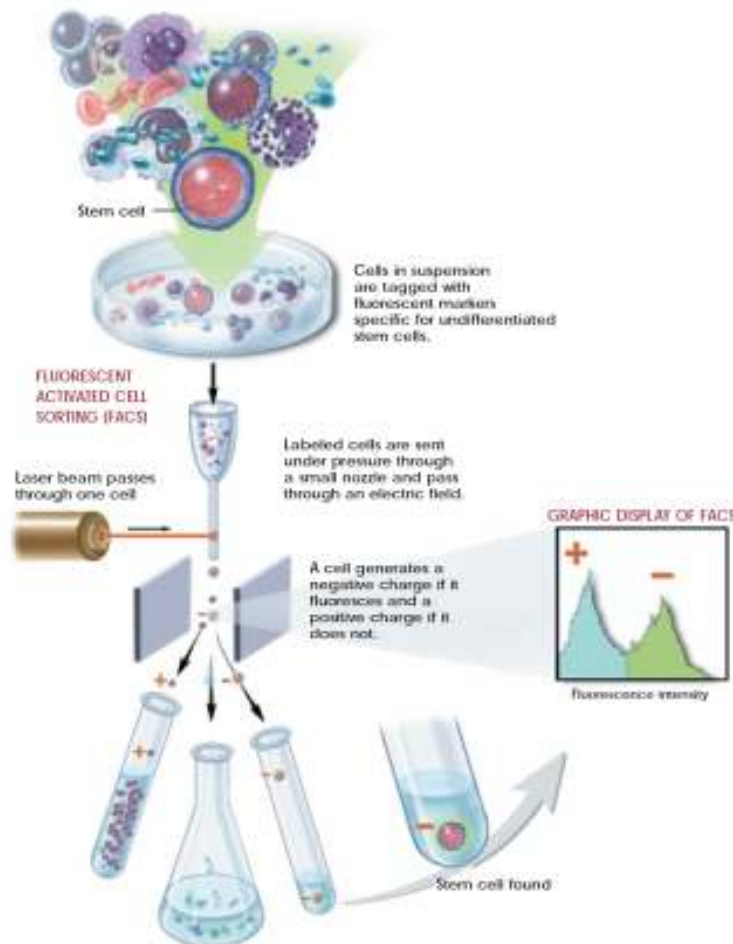


Abb. 11: Prinzip der FACS-Analyse. (2)

Um unspezifische Färbefeffekte und damit falsch positive Ergebnisse erkennen und vermeiden zu können, empfiehlt das Protokoll eine Isotypkontrolle, d.h. eine Färbung mit einem PE-konjugierten Antikörper gegen ein irrelevantes Antigen, optimalerweise kombiniert mit CD45-FITC. Eine zusätzliche Färbung mit 7-AAD oder Propidiumiodid, um in einem ersten optionalen Analyseschritt lebendige Zellen von toten Zellen zu separieren, schreibt das Protokoll (aus Kostengründen) nicht vor, erachtet diese aber als sinnvoll, da die Zellpopulationen nicht allein aufgrund von Lichtstreuungseigenschaften unterscheidbar sind.

Die so genannte „Gating“-Strategie beschreibt das Aufeinanderfolgen bestimmter Analysemethoden mit schrittweisem Aus- bzw. Eingrenzen (= *gating*) der unerwünschten oder

gewünschten Zellpopulationen und besteht im Fall der CD34-Zellisolation (außer dem eben erwähnten optionalen Schritt) aus vier hintereinander geschalteten Analysen.

Im ersten Schritt wird die CD45-Färbung mit der seitlichen Lichtstreuung in Zusammenhang gebracht (CD45-FITC vs. SS), wodurch die CD45-positiven Leukozyten separiert und von Erythrozyten, Thrombozyten oder Zelldebris abgegrenzt werden können. Die Zellen aus diesem Gate werden bezüglich ihrer CD34-Färbung analysiert (CD34-PE vs. SS), anschließend die CD34-positiven Zellen erneut aufgrund der charakteristischerweise in dem für hämatopoetische Stammzellen spezifischen mittleren, auch CD45^{dim} genannten, Bereich liegenden CD45-Färbung (CD45-FITC vs. SS) eingegrenzt. Im letzten Schritt basiert die Analyse allein auf den Lichtstreuungseigenschaften der Zellen (FS vs. SS) und isoliert die gewünschte Zellpopulation geringer Granularität und niedriger bis mittlerer Größe.

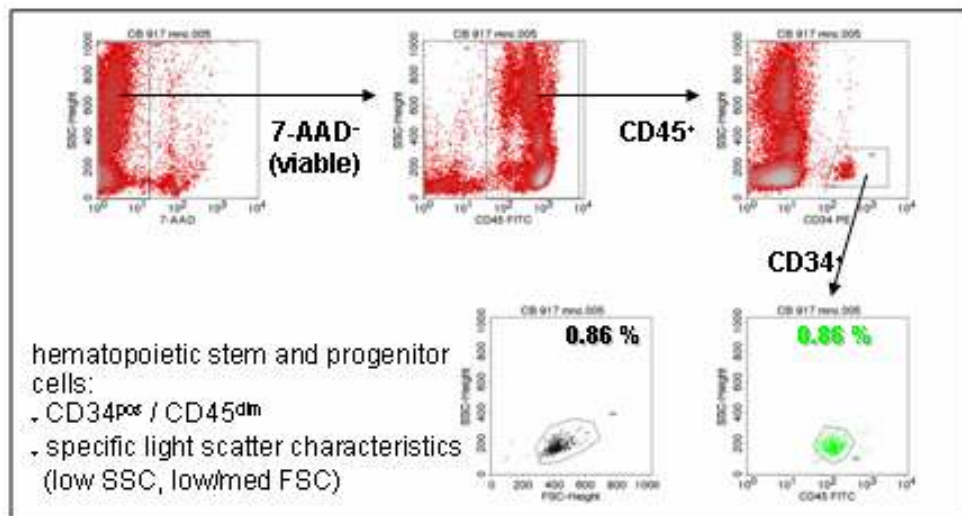


Abb. 12: „Gating“-Strategie zur Bestimmung der CD34-positiven Zellen. (4)

2.3.1.3 MACS-Zellisolation

Zur Separation der CD34-positiven Zellen wurde in wenigen Fällen ein magnetisches Zellisolationsverfahren verwendet. Dabei wird die zu isolierende Zellpopulation mit hochspezifischen Antikörpern markiert, an die magnetische Partikel, so genannte MicroBeads, gekoppelt sind. Diese haben in etwa eine Größe von 50 nm und beeinträchtigen weder die Lebensdauer und Vermehrungsfähigkeit der Zellen noch eine anschließende Verarbeitung, sei es die weitere Zellseparation mittels FACS-Analyse, andere analytische Verfahren wie Durchflusszytometrie und Immunoassays oder das Anlegen von Zellkulturen.

Enthält die Zielzellpopulation ein für sie spezifisches Antigen (in unserem Fall der CD34-Rezeptor) bietet sich zur Markierung das so genannte direkte Labeling, bei dem die spezifischen Antikörper und die magnetischen Partikel von vornherein miteinander verbunden sind, an. Dadurch werden

die gewünschten Zellen als positive Zellfraktion in der Säule festgehalten. Diese positive Selektion reduziert die Anzahl der notwendigen Waschvorgänge und damit unnötigen Zellverlust.

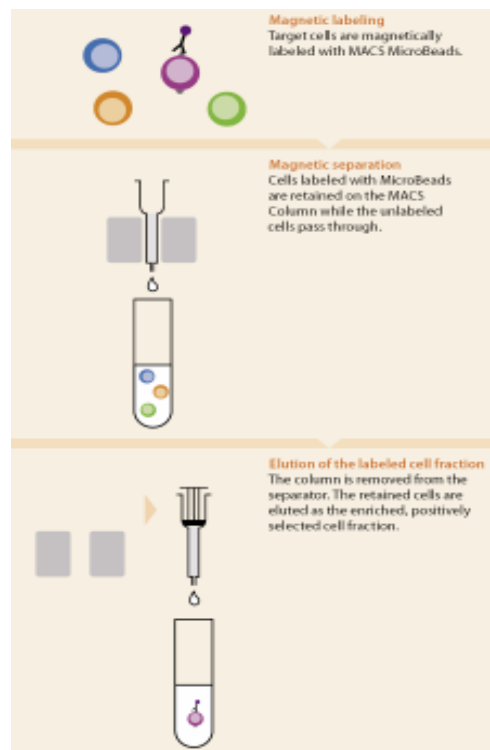


Abb. 13: MACS Zellseparation. (5)

2.3.2 Protokoll zur Zellzahlbestimmung im Labor des Blutspendedienstes

2.3.2.1 Bestimmung des Gehalts an mononukleären Zellen

Das Nabelschnurblut wurde mittels eines sterilen Anstechdorns (IMF, Lüdenscheid) aus dem Abnahmebeutel entnommen, zu je 25 ml auf sterile 50 ml-Röhrchen (Röhre 50 ml, 114x28mm, PP; Sarstedt, Nürmbrecht) verteilt und im Verhältnis 2:1 mit RPMI (RPMI 1640 Medium (1x), with 2 g/l NaHCO₃, w/o L-Glutamine, tested for endotoxin; Biochrom, Berlin) verdünnt. Anschließend wurde eine Probe von 2 ml für bakteriologische Untersuchungen (Cryoröhrchen 2 ml; Nalgene, Rochester, New York, USA) und zwei Proben von je 1 ml für eine erste FACS-Analyse (FACS-Röhrchen mit Rundboden, Polystyrol 6 ml; BD Falcon, Erembodegem, Belgien) sowie für die automatische Zellzählung mit CellDyn (Celldyn 3500; Abott, Wiesbaden) entnommen.

In ein weiteres 50 ml-Röhrchen wurden ca. 22 ml Ficoll (Biocoll, 1,077 g/ml; Biochrom, Berlin) vorgelegt und mit einer serologischen Pipette (serologische Pipette 5 ml/10 ml; Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag / serologische Pipette 25 ml; VWR, Ismaning) ca. 22 ml der verdünnten Nabelschnurblutprobe darüber geschichtet. Danach erfolgte die Separation mittels Zentrifugation

(Zentrifuge Rotanta 460 R; Hettich, Tuttlingen - Programm 1: 30 Minuten bei 400 \bar{g}).

Die durch die Gradientenzentrifugation erhaltene Zellschicht an der Interphase zwischen Ficoll und Plasma wurde mit einer Einmal-Transferpipette (3 ml Transferpipette; Falcon Becton Dickinson Labware, Le Pont De Claix, Frankreich) abgenommen und in ein frisches 50 ml-Röhrchen überführt. Das geschätzte Volumen und die Farbe der Zellschicht waren für laborinterne Zwecke zu dokumentieren.

Zur Verdünnung des Ficoll wurden mindestens drei Äquivalenzvolumina RPMI zugegeben und die Probe für 10 Minuten bei 800 \bar{g} und Raumtemperatur (Rotanta 460 R - Programm 2) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, alle Zellpellets einer Nabelschnurblutprobe nach Resuspension in RPMI in einem 50 ml-Röhrchen vereinigt und mit RPMI auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Daran schloss sich ein identischer Zentrifugationsschritt an, der Überstand wurde verworfen.

Abhängig davon, mit welchem Anteil der ursprünglichen Nabelschnurblutprobe weitergearbeitet werden sollte, wurde das verbleibende Zellpellet in bis zu 10 ml RPMI (10 ml für die komplette Nabelschnurblutprobe) aufgenommen. Nach Färbung mit im Verhältnis 1:10 verdünnter Türks Lösung (100%; Merck, Darmstadt) erfolgt die Zellzählung manuell in einer Neubauer Zählkammer (Optik Labor, bezogen über VWR, Ismaning).



Abb. 14: Abpipettieren der Zellschicht der Interphase nach Gradientenzentrifugation.

2.3.2.2 Bestimmung des Gehalts an CD34-positiven Zellen mittels FACS-Analyse

Monoklonale Antikörper (alle BD, Heidelberg) wurden im Rahmen einer Standardfärbung zur Bestimmung von hämatopoetischen Stammzellen nach folgendem Schema in FACS-Röhrchen (Röhrchen mit Rundboden, s.o.) vorgelegt:

Isotypkontrolle:	5 µl CD45-FITC
	2,5 µl IgG1-PE
	2,5 µl PBS/2% FCS (w/o Ca and Mg; Biochrom AG, Berlin)
	5 µl 7-AAD (BD, Heidelberg)
Probe 1:	5 µl CD45-FITC
	5 µl CD34-PE
	5 µl 7-AAD
Probe 2:	5 µl CD45-FITC
	5 µl CD34-PE
	5 µl 7-AAD

Jede Probe wurde mit 1×10^6 zu färbenden Zellen versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde zur Erythrozytenlyse in zwei Schritten je 1 ml Ammoniumchloridlösung (IOTest 3 Lysing Solution 10x Concentrate; Beckman Coulter, Krefeld - laborinterne 1:10 Verdünnung mit H₂O) zugegeben und die Proben erneut für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml PBS/2% FCS erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 \bar{g} und Raumtemperatur (Rotanta 460 R - Programm 3 FACS Färbung), der Überstand wurde dekantiert, das Zellsediment aufgerüttelt und in zwei Schritten mit je 2 ml PBS/2% FCS resuspendiert. Anschließend wurde die Probe erneut zentrifugiert (5 Minuten, 300 \bar{g} , Raumtemperatur) und durchflusszytometrisch analysiert (Facsgerät FacsCalibur; BD, Heidelberg). Das Gating erfolgte anhand oben beschriebenen Protokolls (vgl. Kap 2.3.1.2 und Abb. 12).

Als Zielwert wurde der Mittelwert der beiden Proben definiert. War die Isotypkontrolle ungleich Null, wurde dieser Wert, der eine unspezifische Färbung anzeigt, vom Ergebnis abgezogen. Rechnerisch ergaben sich der prozentuale Anteil von CD34^{pos}/CD45^{dim} Zellen bezogen einerseits auf CD45-positive Zellen, andererseits auf mononukleäre Zellen, außerdem der Gehalt pro Milliliter Gesamtprobe bzw. nach Abzug des Volumens der Blutstabilisatorlösung pro Milliliter Nabelschnurblut.

2.3.3 Protokoll zur Zellzahlbestimmung im Labor der III. Medizinischen Klinik

2.3.3.1 Bestimmung des Gehalts an mononukleären Zellen

Zur Volumenbestimmung wurde die Blutprobe mittels eines Anstechdorns (BenjaMix; Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) und einer sterilen 50 ml-Spritze (Luer-Lock; Fresenius AG, Bad Homburg) in Portionen von je 20 ml in sterile 50 ml-Röhrchen (Blue Max 50 ml Polypropylene Conical Tube; BD, Heidelberg) umverteilt. Im Anschluss erfolgte eine 1:1

Verdünnung mit D-PBS ohne Calciumchlorid und Magnesiumchlorid (Gibco/Invitrogen AG, Karlsruhe) und die Separation der Blutzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation für 15 Minuten bei 600 \bar{g} (Zentrifuge Megafuge 3.0 RS; Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) über Ficoll mit einer Dichte von 1,077 g/ml (Biocoll Separation Solution; Biochrom AG, Berlin). Nach Abnehmen der Interphase mittels steriler Pipette (Costar Stripette 25 ml; Corning GmbH, Wiesbaden) und einer erneuten Verdünnung mit D-PBS im Verhältnis 7:3 in einem neuen 50 ml-Röhrchen, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei 250 \bar{g}). Der Überstand wurde abgesaugt (Costar Stripette 2 ml; Corning GmbH, Wiesbaden), das Zellsediment aufgerüttelt (MS1 Mini Shaker; IKA, Staufen) und ca. 1 ml Ammoniumchlorid Solution (CellSystems, St. Katharinen) pro 10^8 Zellen zur Induktion der Erythrozytenlyse zugegeben.

Nach Inkubation im Kühlschrank (Siemens Elektrogeräte GmbH, München) bei 4°C für 5 bis 10 Minuten und einem weiteren Waschvorgang – zentrifugieren für 5 Minuten bei 250 \bar{g} , absaugen des Überstandes, aufrütteln des Zellsediments – wurden die Zellen mit laborintern hergestelltem HF/2+ Puffer auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt.

Zusammensetzung HF/2+ Puffer:

860 ml Aqua Spüllösung (DeltaSelect GmbH, Dreieich)

100 ml HBSS 10x (Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

20 ml FCS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach)

10 ml HEPES 1M (Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

10 ml Penicillin-Streptomycin (Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Von dieser Suspension wurden 20 μ l abpipettiert (Eppendorf Pipetten 10 – 100 μ l und 50 – 200 μ l; Eppendorf AG, Hamburg) und mit 180 μ l HF/2+ Puffer in eine 96-Well-Rundbodenplatte (Nunc GmbH, Wiesbaden) überführt, weitere 20 μ l davon 1:1 mit Türks Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) gefärbt und anschließend die mononukleären Zellen manuell mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die verbleibenden in HF/2+ Puffer suspendierten Zellen werden nochmals zentrifugiert (5 Minuten bei 250 \bar{g}) und der weiteren Verarbeitung zur Bestimmung der CD34-positiven Zellen zugeführt.

2.3.3.2 Bestimmung des Gehalts an CD34-positiven Zellen mittels FACS-Analyse

Je 1×10^6 Zellen wurden auf FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nürnbrecht) verteilt und pro Röhrchen je 1 ml FACS-Puffer, bestehend aus 495 ml D-PBS und 5 ml Albumin-Lösung 5 NDS N (DRK-Blutspendedienst), zugegeben. Nach einem Waschvorgang (5 Minuten bei 250 \bar{g}), Verwerfen des Überstandes und Resuspension in 1 ml FACS-Puffer erfolgte die Markierung der Zellen durch Zugabe von monoklonalen Antikörpern nach folgendem Schema:

Probe 1:	10 µl CD45-FITC (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
	10 µl CD34-PE (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
	1 µl PI (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
Probe 2:	10 µl CD45-FITC (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
	10 µl AC133/2-PE (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach)
	1 µl PI (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
Kontrolle 1:	Leerkontrolle
Kontrolle 2:	10 µl CD45-PE (Immunotech/Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Kontrolle 3:	10 µl CD45-FITC (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Kontrolle 4:	1 µl PI (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
Kontrolle 5:	10 µl IgG1-FITC (Immunotech/Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
	10 µl IgG1-PE (Immunotech/Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
	1 µl PI (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Anmerkung: Aufgrund der schnell abnehmenden Stabilität von PI erfolgte dessen Zugabe zu Proben 1 und 2 sowie Kontrollen 4 und 5 erst nach dem letzten Waschschrift.

Anschließend wurden die Proben für 10-15 Minuten im Kùhlschank (4°C) inkubiert. Nach erneutem Waschen der Proben – Zentrifugation für 5 Minuten bei 250 g, Abkippen des Überstandes und Aufnehmen des Zellpellets in 1 ml FACS-Puffer – erfolgte die Analyse auf dem FACS-Gerät EPICS XL (Beckman Coulter GmbH, Krefeld).

Nachdem in den ersten beiden Analysen – FS vs. PI und CD45-FITC vs. SS – die lebenden von den bereits abgestorbenen Zellen separiert und CD45-negative Zellen von CD45-positiven abgegrenzt wurden, folgten die drei weiteren Analyseschritte – CD34-PE vs. SS, CD45-FITC vs. SS und SS vs. FS – in welchen die in der Probe enthaltene CD34-positive Zellfraktion isoliert und quantifiziert wurde. Somit ergaben sich rechnerisch der prozentuale Anteil der CD34-positiven Zellen insgesamt, in Bezug auf CD45-positive und CD45-negative Zellen und der relative Gehalt an CD34-positiven Zellen pro Milliliter Gesamtprobe bzw. nach Abzug des Volumens der Blutstabilisatorlösung pro Milliliter Nabelschnurblut.

2.3.3.3 Zellisolierung der CD34-positiven Zellen mittels MACS

Bei einem kleinen Prozentsatz von 4,1% (n=30) der Proben erfolgte vor Durchführung der FACS-Analyse eine Aufreinigung mittels des magnetischen Zellseparationsverfahrens MACS. Dafür wurden das Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Large Scale), LS Separation Columns sowie VarioMACS™ bzw. QuadroMACS™ als Magneten zur Separation (alles Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) verwendet.

Pro 10⁸ Zellen wurden je 300 µl HF/2+ Puffer, 100 µl FcR Blocking Reagenz und 100 µl CD34

MicroBeads zugegeben, die Suspension 30 Minuten im Kühlschrank (4°C) inkubiert und nach Zugabe von 30 ml HF/2+ Puffer abzentrifugiert (5 Minuten bei 250 g). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit je 1 ml HF/2+ Puffer pro 10⁸ Zellen versetzt. Vor Beginn der Separation war die Probe, um Klumpenbildung zu vermeiden, zu filtern (30 µm Syringe Filcons; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) und die Säule mit 3 ml HF/2+ Puffer zu equilibrieren. Die Zellsuspension wurde auf die Säule pipettiert und anschließend dreimal mit je 1 ml HF/2+ Puffer nachgespült. Danach erfolgte die Entfernung der Säule aus dem Separator und deren Platzierung auf einer Auffangtube (14 ml Polypropylene Round-Bottom Tube; BD, Heidelberg), in der die CD34-positiven Zellen nun durch Spülen mit 5 ml Puffer aufgefangen werden konnten. Um die Reinheit der CD34-positiven Zellfraktion zu erhöhen, wurden die eben beschriebenen Vorgänge mit einer frischen Säule wiederholt.

20 µl der positiven Säule wurden mit 20 µl Trypanblau Lösung (Trypan Blue Stain 0,4%; Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gefärbt und die CD34-positiven Zellen manuell mittels Neubauer Zählkammer und Handzähluhr ausgezählt.

2.4 Untersuchte Parameter

Abgeleitet aus der im Kapitel 1.4 aufgestellten Hypothese wurden verschiedene Kriterien, die nachgewiesenermaßen oder potentiell einen Einfluss auf den peripartalen Stress eines Neugeborenen haben oder haben könnten bzw. mit der Varianz von Stammzellen im Nabelschnurblut im Zusammenhang stehen könnten, identifiziert und als zu untersuchende Einflussfaktoren festgelegt:

- Geschlecht des Kindes
- Geburtsgewicht des Kindes
- Gestationsalter
- Arterieller Nabelschnur-pH-Wert
- Apgar-Score
- Entbindungsmodus
- Geburtslage des Kindes
- Nikotinabusus der Mutter während der Schwangerschaft
- Cortisonmedikation der Mutter während der Schwangerschaft
- pH-Wert der fetalen Mikroblooduntersuchung (falls vorgenommen)
- Zeitintervall von der Abnahme bis zur Verarbeitung der Probe

Darüber hinaus war die Erfassung verschiedener anderer Kriterien erwogen worden, konnte aber unter anderem aufgrund nicht kontinuierlicher, weil nicht zur Routine gehörender

Dokumentation, ungenauer Erueirbarkeit, möglicher subjektiver Verfälschung oder schwieriger Interpretierbarkeit nicht durchgeführt werden. Hierunter fielen z.B. die Geburtsdauer ab Beginn der Wehentätigkeit, die präpartalen Aufzeichnungen der fetalen Herzrate (CTG), maternales Fieber, maternaler Hämoglobinwert, Entzündungszeichen wie erhöhtes CRP (C-reaktives Protein) oder Leukozytenzahlen sowie der zeitliche Abstand zwischen Blasensprung und Geburt.

2.4.1 Geschlecht und Geburtsgewicht des Kindes

Im Rahmen der obligatorischen Erstuntersuchung im Kreißsaal durch die Hebammen werden Geschlecht und Geburtsgewicht des Neugeborenen festgestellt und dokumentiert. Durch Vergleich mit den Perzentilwertetabellen der Geburtsgewichte männlicher und weiblicher Neugeborener bezogen auf die Schwangerschaftsdauer ([110] S.553-4) kann entschieden werden, ob das Neugeborene zwischen der 10. und 90. Perzentile liegt und somit als „appropriate for gestational age“ (AGA) bezeichnet wird, oder ob es unterhalb der 10. Perzentile als „small for gestational age“ (SGA), bzw. oberhalb der 90. Perzentile liegend als „large for gestational age“ (LGA) einzuordnen ist. Unabhängig davon wird ebenso das absolute Gewicht in Betracht gezogen. Dabei bezeichnet man Kinder mit einem Geburtsgewicht von kleiner 2750 g (unterhalb der 10. Perzentile liegend) als mikrosom, Kinder mit einem Geburtsgewicht von mehr als 4020 g (oberhalb der 90. Perzentile) als makrosom ([110] S.552).

2.4.2 Gestationsalter

Das Gestationsalter wird bei regelmäßigem Zyklus vom die Schwangerschaft feststellenden Facharzt rechnerisch ermittelt oder mittels des so genannten Frühultraschalls in der zehnten bis zwölften Schwangerschaftswoche anhand von Vergleichskurven der Scheitel-Steiß-Länge festgelegt. Der voraussichtliche Entbindungstermin wird im Mutterpass dokumentiert. Die Schwangerschaftsdauer beträgt durchschnittlich 267 Tage post conceptionem bzw. 281 Tage post menstruationem. Bei unklarem Konzeptionszeitpunkt oder unregelmäßigem Zyklus dient der Frühultraschall zur Berechnung des Geburtstermins. Vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche entbundene Kinder werden nach Definition der WHO als Frühgeborene, nach der vollendeten 41. Schwangerschaftswoche geborene Kinder als Übertragungen bezeichnet ([118] S.1422).

2.4.3 Arterieller Nabelschnur-pH-Wert

Als Kontrollparameter für den Säure-Basen-Status des Kindes und zur Quantifizierung der während Wehentätigkeit und Geburt durchgemachten Hypoxie eines Neugeborenen wird in Deutschland routinemäßig der pH-Wert des Bluts aus einer Nabelschnurarterie direkt nach der

Geburt bestimmt und dokumentiert. Der pH-Wert korreliert positiv innerhalb des Referenzwertbereiches mit der Sauerstoffsättigung der fetalen Erythrozyten und eignet sich damit als Parameter für den vor und während der Geburt erlittenen fetalen Stress. In Anlehnung an die Klassifikation nach Saling wurde die Einordnung wie in Tab. 1 beschrieben vorgenommen ([97] S.281).

Tab. 1: Referenzbereiche für den postpartalen pH-Wert aus der Nabelschnurarterie.

	pH-Wert
Optimale Azidität	$\geq 7,30$
Noch normale Azidität	7,20 – 7,29
Leichte Azidose	7,10 – 7,19
Mittelgradige Azidose	7,00 – 7,09
Schwere Azidose	$< 7,00$

2.4.4 Apgar-Score

Dieser von Virginia Apgar entwickelte Vitalitätsindex ermöglicht das Feststellen und Einordnen von eventuellen Anpassungsschwierigkeiten beim Neugeborenen. Dazu werden zu drei Zeitpunkten – eine, fünf und zehn Minuten post partum – die fünf Kriterien Atmung, Hautfarbe, Muskeltonus, Herzfrequenz und Reflexe bewertet und je Kriterium null bis zwei Punkte vergeben, wobei zwei Punkte den Normalzustand darstellen, ein Punkt eine leichte Störung und null Punkte eine schwere Anpassungsstörung bedeuten (s. Tab. 2). Ein Apgar-Score von mehr als 7 von 10 möglichen Punkten gilt als physiologisch, Werte zwischen 3 und 7 gelten als leichte, Werte unterhalb von 3 als schwere Anpassungsstörung des Neugeborenen ([5] S.267).

Der statistischen Auswertung wurden in der vorliegenden Arbeit, wie in der Originalarbeit von Virginia Apgar empfohlen ([5] S.261), die Werte des 1-Minuten Apgar-Scores zugrunde gelegt; diese zeigten auch die breiteste Spannweite auf.

Tab. 2: Das Apgar-Schema.

Apgar-Score		0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte
A	Atmung	keine	unregelmäßig, flach	regelmäßig, Kind schreit
P	Puls	kein Puls	unter 100/min	über 100/min
G	Grundtonus	schlaff	leichte Beugung der Extremitäten	aktive Bewegung
A	Aussehen	blau	Stamm rosig, Extremitäten blau	gesamter Körper rosig
R	Reflexe	keine	Grimassieren	kräftiges Schreien

2.4.5 Entbindungsmodus

Für diese Untersuchung wurden die Entbindungsmodi in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt. Die normale spontane Vaginalgeburt wurde von den beiden assistierten vaginalen Entbindungen Forceps (=Zangengeburt) und Vakuumextraktion (=Saugglockengeburt) sowie von den operativen Entbindungen, der primären oder sekundären Sectio caesarea (=Kaiserschnitt), unterschieden. Bei mehreren angewandten Methoden während einer Entbindung wurde der dann tatsächlich zur Geburt führende Modus gewertet.

Die auf den Fetus einwirkenden Stressoren differieren je nach Geburtsmodus. So wird z.B. angenommen, dass der Fetus bei einem elektiven Kaiserschnitt weniger Stress ausgesetzt ist als bei einer spontanen Vaginalgeburt oder mehr noch bei den operativen vaginalen Geburten wie Vakuumextraktion und Zangengeburt ([109] S.443).

2.4.6 Geburtslage

Die Lage beschreibt das Verhältnis der Längsachse des Kindes zur Längsachse der Mutter (bzw. des Uterus). Bildet der Kopf den vorangehenden Kindsteil, spricht man von Schädellage, stellt der Steiß den vorangehenden Kindsteil dar, handelt es sich um eine Beckenendlage. Eine Schädellage liegt in rund 96% aller Geburten vor und ist somit die bei weitem überwiegende Geburtslage. Eine Beckenendlage ist dagegen selten und liegt nur in knapp 4% aller Schwangerschaften zur Geburt vor. Aufgrund eines erhöhten fetalen wie maternalen Risikos für das Auftreten von Komplikationen während vaginaler Entbindungen aus Beckenendlage, wird der überwiegende Teil der Kinder heutzutage von vornherein oder ggf. nach einem missglückten äußeren Wendungsversuch per Kaiserschnitt entbunden.

2.4.7 Maternaler Nikotinabusus

Rauchen während der Schwangerschaft führt zu verringertem Sauerstoffpartialdruck im mütterlichen Kreislauf durch Verdrängung der Sauerstoffmoleküle vom Hämoglobin und einer Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve. Diese resultiert, bei einer gegebenen pO_2 Differenz zwischen maternalem und fetalem Blutkreislauf, aufgrund der höheren Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff und der damit eingeschränkten Abgabe der O_2 -Moleküle konsekutiv in einer schlechteren intrauterinen Versorgung des Fetus. Nikotinabusus in der Schwangerschaft beeinträchtigt aufgrund vermehrter Freisetzung von Katecholaminen im maternalen Kreislauf die Blutversorgung über die Plazenta, setzt das Kind somit wiederholt und unmittelbar hypoxischen Zuständen aus und reduziert des Weiteren das Geburtsgewicht um durchschnittlich 150g ([53] S.708-9). Deshalb werden im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen die Patientinnen mittels eines standardisierten Anamneseblattes zu ihrem Nikotinabusus während der Schwangerschaft befragt

und zur Nikotinabstinenz in der Schwangerschaft angehalten.

Da eine objektive quantitative Bewertung und ein Korrelationsversuch mit der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten unter diesen Bedingungen grundsätzlich nicht möglich ist, zumal das Suchtverhalten durch einen Süchtigen in der Regel nicht objektiv beurteilt wird und die Anzahl der tatsächlich gerauchten Zigaretten in Negierung bzw. Verheimlichung der Sucht im Sinne einer Verzerrung regelmäßig unterschätzt wird, wurde in dieser Untersuchung trotz dadurch angestiegener Unschärfe nur das Merkmal Nikotinabusus während der Schwangerschaft ja/nein ausgewertet.

2.4.8 Maternale Cortisonmedikation

Die Stressantwort des Fetus auf interne oder externe Stressreize ist unter anderem mit einer erhöhten Ausschüttung von Glukokortikoiden verbunden. Diese aktivieren über eine Kaskade von Enzym- und Zellpopulationsveränderungen verschiedene Wachstumsfaktoren, die die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu fördern imstande sind (vgl. ausführlicher Kap. 4.1.11). Somit schien es interessant, zu untersuchen, ob eine externe Zuführung von Cortisonpräparaten über den maternalen Kreislauf in ähnlicher Weise den Zellzahlgehalt im Nabelschnurblut beeinflussen kann.

Eine regelmäßige Cortisonmedikation der Patientinnen (Asthmasprays etc.) wurde ebenfalls auf oben erwähntem Anamneseblatt dokumentiert. Verabreichung von Cortison i.v., z.B. bei HELLP-Syndromen, oder i.m. zur Förderung der Lungenreife des Kindes als Prävention oder bei sich abzeichnender vorzeitiger Geburt im Rahmen eines stationären Krankenhausaufenthaltes wurden in der Kurve der Patientin notiert.

2.4.9 Mikroblutuntersuchung

Diese von Saling eingeführte direkte Blutabnahme am fetalen Skalp ermöglicht die Blutgasanalyse von arteriovenösem Mischblut des Kindes während der Austreibungsphase. Sie dient vor allem dazu, bei vorliegendem suspektem CTG als zusätzliche diagnostische Maßnahme eine tatsächliche Hypoxämie des Kindes zu identifizieren und somit die Indikation für eine operative Entbindung zu erhärten oder bei physiologischen Werten unnötige operative Entbindungen zu vermeiden. Für die einzelnen Phasen der Geburt existieren verschiedene Normwerte, dabei ist die Gültigkeit und Aussagekraft der pH-Werte zeitlich nur auf den Moment der Abnahme begrenzt. Werte über 7,24 sind als physiologisch anzusehen, Handlungsbedarf besteht bei einem pH unter 7,20. Im dazwischen liegenden Bereich sollte bei Risikogeburten die sofortige Entbindung angestrebt, ansonsten in zeitnahen Abständen die Blutgasanalyse wiederholt werden ([84] S.229). Im Falle mehrerer aufeinanderfolgender pH-Wert-Bestimmungen ging der niedrigste Wert in unsere Auswertung mit ein.

2.4.10 Verarbeitungsintervall

Die im Nabelschnurblut bei der Geburt vorhandenen und abgenommenen Stammzellen sind lebende Zellen. Nabelschnurblut wurde innerhalb des STEMMAT-Projektes bei Raumtemperatur gelagert, da dies bessere Verarbeitungsbedingungen für das Nabelschnurblut gewährleistet als eine Lagerung im Kühlschrank. Dabei kann grundsätzlich aber die Zeitdauer der Lagerung auch einen Einfluss auf die relative und absolute Anzahl der im Nabelschnurblut vorhandenen Stammzellen haben, die sich im Blutbeutel – auch bei Raumtemperatur – prinzipiell noch weiter vermehren können. Die Zeit, die zwischen der Abnahme der Nabelschnurblutprobe und ihrer Verarbeitung vergeht, wird im Folgenden als Verarbeitungsintervall bezeichnet. Sie hängt einerseits von der zeitlichen Aufteilung der Proben zwischen den beiden Labors, z.B. durch längere Lagerung bei Wochenendabnahmen (s. Kap. 2.2.3), aber auch von den spezifischen Transport- und Personalkapazitäten sowie den Verarbeitungsprotokollen der beiden Labors ab. Um einen möglichen Zeiteffekt auf die Zellzahlen zu berücksichtigen, wurde der Zeitraum bis zur Verarbeitung ausgewertet und mit den Zellzahlen korreliert. In den meisten der bisherigen Untersuchungen wurden die Blutproben innerhalb eines vorher fest definierten Zeitraumes (meist 24 Stunden) verarbeitet. Alle bis dahin nicht prozessierten Proben wurden von der Verarbeitung oder der Auswertung ausgeschlossen. Da ein repräsentativer Prozentsatz an erst nach mehr als zwei Tagen verarbeiteten Proben für diese Auswertung zur Verfügung stand, bot dies erstmalig die Voraussetzung, die Veränderungen der Zellzahlen nach dieser Zeit zu beobachten. Die Zeiteinteilung in „nach 24 Stunden“ und „nach 60 Stunden“ ergab sich aus dem praktischen Prozedere und der statistischen Häufigkeitsverteilung.

2.5 Datenerhebung

2.5.1 Patientenaufklärung

Die Teilnahme an der wissenschaftlichen Nabelschnurblut- und Nabelschnurspende für STEMMAT erfolgte, wie international üblich, anhand des „Informed Consent“-Modells, das eine vollständige Informiertheit der Patientin einer rechtlich bindenden Einwilligung zur Voraussetzung macht. Die initiale Information und Aufklärung der werdenden Mutter über eine Teilnahmemöglichkeit zur postpartalen wissenschaftlichen Nabelschnurblutspende geschah gezielt ab der 34. Schwangerschaftswoche in der Schwangerenambulanz bzw. im Kreißaal der Frauenklinik der TU München. Die beteiligten Ärzte oder die Hebammen des Kreißaals informierten jede Patientin, die sich zur Geburt anmeldete, über die Teilnahmemöglichkeit an der Studie, deren Zielsetzung, die Verfahrensabläufe und mögliche Vor- und Nachteile umfassend und objektiv anhand von drei Informations-, Aufklärungs- und Einwilligungsbögen (s. Anhang) sowie ggf. in einem zusätzlichen persönlichen Gespräch. Bei der Geburt musste die schriftliche Einwilligung der werdenden Mutter

vorliegen (s. Anhang). Obwohl die Nabelschnur wie auch das Nabelschnurblut als Teil des Kindes gelten, über das eigentlich beide Elternteile gemeinsam treuhänderisch für das Neugeborene verfügen, wurde aus Vereinfachungsgründen zur wissenschaftlichen Spende in Abstimmung mit der Ethikkommission der TU München nur die Unterschrift der werdenden Mutter zur Voraussetzung gemacht, da es sich bei Nabelschnur und Nabelschnurblut des Neugeborenen um Abfallprodukte der Geburt handelt, die im Regelfall bisher entsorgt wurden.

Ausschlusskriterien für die Teilnahme am STEMMAT-Projekt waren nicht ausreichende Deutschkenntnisse für eine rechtlich gültige Einwilligung oder Minderjährigkeit der werdenden Mutter. Des Weiteren wurde, trotz vorliegender Einwilligung, in den Fällen auf eine Nabelschnur- und Nabelschnurblutspende verzichtet, in denen durch eine notfallmäßige oder kompliziert verlaufende Geburt, z.B. bei Notkaiserschnitten, Tot- oder Fehlgeburten oder kindlichen Fehlbildungen der Fokus auf der Abwendung von Gefahr für maternales oder fetales Leben lag.

2.5.2 Datenquellen

Als primäre Datenquelle dieser Untersuchung diente das Geburtenbuch der Frauenklinik am Klinikum Rechts der Isar. Alle wichtigen die Geburt betreffenden Daten (Entbindungsdatum und -uhrzeit, Name und Adresse der Mutter, Geschlecht, Geburtsgewicht, Größe und Kopfumfang des Kindes, Entbindungsmodus und Kindslage, Schwangerschaftsalter, Apgar-Scores und der arterielle Nabelschnur-pH-Wert) sowie besondere Vorkommnisse während des Geburtsverlaufes, z.B. ein Hinweis auf eine vorgenommene Mikroblooduntersuchung, werden darin von den Hebammen zeitnah zur Entbindung festgehalten. Jeder Patientin wird eine fortlaufende Geburtenbuchnummer zugeordnet, die Eintragungen erfolgen in chronologischer Reihenfolge nach Entbindungsdatum und -uhrzeit. Jährlich wird ein neues Geburtenbuch begonnen.

Zusätzlich wurden die Patientenakten als Datenquelle herangezogen. Diese sind während des gesamten stationären Aufenthaltes im Arztzimmer der Wöchnerinnenstation zugänglich, nach Entlassung und Fertigstellung der Arztbriefe werden sie chronologisch nach Geburtsdatum der Mutter und getrennt nach Privat- und Kassenpatientinnen im Archiv der Frauenklinik aufbewahrt. Neben den Anamnesebögen, die unter anderem Informationen über Nikotinabusus und eine eventuelle regelmäßige Cortisonmedikation der Mutter während der Schwangerschaft enthalten, finden sich in der Patientenakte die handschriftlichen Aufzeichnungen der Hebammen und Ärzte zum Geburtsverlauf, die Dokumentation der Laboruntersuchungen (arterieller Nabelschnur-pH-Wert und – falls vorgenommen – pH-Wert der Mikroblooduntersuchung), das Dokumentationsblatt einer Erstuntersuchung durch den Pädiater mit Informationen zu Größe, Geburtsgewicht und Apgar-Scores des Neugeborenen sowie die Patientenkurven, in denen unter anderem alle verabreichten Medikamente verzeichnet werden.

Das Intervall bis zur Verarbeitung der Proben wurde in den beiden Labors zusammen mit den

Probenvolumina sowie den weiteren Ergebnissen der Zellzahlbestimmung in einer Excel-Datentabelle dokumentiert und in regelmäßigen Abständen per E-Mail an die Forschungspartner weitergegeben.

2.5.3 Dokumentation

Die Dokumentation der Daten erfolgte während des Auswertungszeitraums vom 31.07.03 bis zum 15.04.05 auf einem PC Notebook (Acer Computer GmbH, Ahrensburg) unter Verwendung des Programms Microsoft Excel Office 2003 in einer umfassenden Datentabelle. Der im Vergleich zum STEMMAT-Projekt spätere Beginn dieser Datenerfassung war dadurch bedingt, dass das erste Amendment zum Ethikvotum, das die Studie als Teilprojekt genehmigte, von Seiten der Ethikkommission der TU München erst am 30.07.03 vorlag.

Die Daten der Proben wurden nicht personenbezogen in einer Excel Datei dokumentiert und abgespeichert. Da jede Nabelschnur- und Nabelschnurblutprobe mit einer fortlaufenden STEMMAT-Nummer und dem Beginn des Verarbeitungsintervalls erfasst wurde, der mit Geburtsdatum und -uhrzeit identisch ist, war es möglich, anhand dieser Daten den zugehörigen Eintrag im Geburtenbuch zu identifizieren. Da personenbezogene Informationen für die Datenauswertung unerheblich waren, erfolgte die gesamte Evaluation mit der Ethikkommission abgestimmt anonym.

Für die Parameter Datum und Uhrzeit der Probenabnahme, Geschlecht, Geburtsgewicht, Geburtmodus und -lage des Kindes, Gestationsalter, Apgar-Score und arterieller Nabelschnur-pH-Wert galt das Geburtenbuch als primäre Quelle. Informationen zum Nikotinabusus der Mutter während der Schwangerschaft sowie zu einer ggf. durchgeführten Cortisonmedikation während der Schwangerschaft wurden primär aus dem Anamneseblatt bzw. den Krankenblättern der Patientenakte entnommen. Die Ergebnisse einer eventuellen Mikroblooduntersuchung (MBU) wurden ebenfalls der Patientenakte entnommen.

In dem Fall, dass eine Eintragung im Geburtenbuch nicht vollständig war, wurden die handschriftlichen Aufzeichnungen zum Geburtsverlauf in der Patientenakte herangezogen; waren die Parameter auch dort nicht festgehalten, wurde das Gestationsalter nach dem auf dem Anamnesebogen vermerkten, voraussichtlichen Geburtstermin ermittelt. Geburtsdatum, -uhrzeit, Geschlecht, Geburtsgewicht, Nabelschnur-pH-Wert und die Apgar-Scores waren in solchen Fällen auf dem Dokumentationsblatt zur Erstuntersuchung des Neugeborenen notiert.

Die STEMMAT-Datentabelle der Proben- und Geburtsangaben wurde durch die Ergebnisse zur Volumen- und Zellzahlbestimmung der beiden Labors ergänzt.

2.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS 12.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Dazu wurden alle Daten der oben erwähnten Excel-Tabelle, sofern nicht bereits in passendem Format eingegeben, in numerische Variablen umkodiert und in das Statistik-Programm SPSS übertragen.

2.6.1 Ziel- und Einflussgrößen

Als Zielgrößen wurden der Gehalt an mononukleären Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut und der Gehalt an CD34-positiven Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut (Bestimmung mittels FACS in beiden Labors) festgelegt.

Die Einflussgrößen umfassen folgende Parameter:

- Geschlecht des Kindes in zwei Merkmalsausprägungen (männlich / weiblich)
- absolutes Gewicht des Neugeborenen in drei Merkmalsausprägungen (kleiner als 2750 g / 2750 - 4020 g / größer als 4020 g)
- Geburtsgewicht im Verhältnis zum Schwangerschaftsalter (small for gestational age / appropriate for gestational age / large for gestational age)
- Schwangerschaftsalter in drei Merkmalsausprägungen (Frühgeborenes / Reifgeborenes / Übertragenes)
- arterieller Nabelschnur-pH-Wert in den fünf Merkmalsausprägungen nach Saling (s. Abschnitt 2.4.3)
- niedrigster pH-Wert der Mikroblutuntersuchung (falls vorgenommen) in drei Merkmalsausprägungen (pathologisch <7,2 / präpathologisch 7,2-7,24 / physiologisch >7,24)
- Apgar-Wert nach einer, fünf und zehn Minuten (physiologisch ≥ 8 / pathologisch < 8)
- Geburtsmodus (spontan vaginale Geburt / Vakuumextraktion / Forceps / primäre Sectio / sekundäre Sectio)
- Geburtslage in zwei Merkmalsausprägungen (Schädellage / Beckenendlage)
- verabreichtes Cortisonpräparat (keine Cortisongabe / Celestan i.m. / Cortisonpräparat i.v. / Cortisonspray)
- Nikotinabusus der Mutter während der Schwangerschaft (Nichtraucherin / Raucherin)
- auswertendes Labor (Blutspendedienst des BRK / III. Medizinische Klinik)
- Verarbeitungsintervall in drei Merkmalsausprägungen (weniger als 24h / 24 - 60h / mehr als 60h)

2.6.2 Deskriptive Statistik

Die deskriptive Statistik beschränkte sich für die nominalverteilten Daten (Geschlecht, Geburtsgewicht in Abhängigkeit vom Schwangerschaftsalter, Geburtsmodus und -lage, Nikotinabusus, Cortisonmedikation und auswertendes Labor) auf die Häufigkeitsverteilungen. Für diskrete und quantitativ-diskrete Variablen wurden dabei die Häufigkeiten für jede Merkmalsausprägung angegeben. Bei den stetigen Variablen wurden die einzelnen Merkmalsausprägungen zur Angabe der Häufigkeitsverteilung in die in Kap. 2.6.1 aufgeführten Klassen zusammengefasst. Für die ordinalverteilten Daten (Apgar-Score) wurde zusätzlich der Median angegeben. Von Verwendung des Mittelwertes, wie sie bei Apgar-Werten in anderen Studien praktiziert wird, wurde hier bewusst abgesehen. Das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung wurden sowohl für die intervallverteilten (arterieller Nabelschnur-pH-Wert und pH-Wert der Mikroblutuntersuchung), als auch für die rationalverteilten Daten (absolutes Gewicht des Kindes, Schwangerschaftsalter und Verarbeitungsintervall) berechnet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in der Regel auf zwei Dezimalstellen, Gewichtsangaben zu vollen Gramm gerundet.

2.6.3 Mittelwertvergleich und Lagetests

Des Weiteren wurden die mittleren Zellkonzentrationen für mononukleäre und CD34-positive Zellen in den verschiedenen Merkmalsklassen untersucht. Ergaben sich hierbei Unterschiede, wurde mittels eines statistischen Lagetests festgestellt, ob das Ergebnis als zufällig bedingt oder als statistisch signifikant anzusehen ist. Das Signifikanzniveau dafür wurde mit $\alpha < 0,05$ veranschlagt. Somit gilt ein Unterschied zwischen zu vergleichenden Datenkontingenten dann als signifikant, wenn der errechnete p-Wert, also die Wahrscheinlichkeit für eine zufallsbedingte Ursache, weniger als 5% beträgt. Alle p-Werte wurden auf drei Dezimalstellen gerundet. Die Bezeichnung statistischer Trend wurde für das Intervall $0,05 < \alpha < 0,1$ definiert.

Da das Datenkontingent – nach Überprüfung durch den Komolgorov-Smirnov-Test – keiner Normalverteilung folgte, wurden zum Stichprobenvergleich nicht-parametrische Tests für zwei (Mann-Whitney U) oder mehrere unabhängige Variablen (Kruskal-Wallis H) herangezogen. War bei Variablen mit mehr als zwei Merkmalsausprägungen mittels des Kruskal-Wallis-Tests für mehrere unabhängige Stichproben ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Datenkontingenten festzustellen, wurde anschließend zusätzlich ein Paarvergleich mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt.

Aufgrund vorhandener Verschiedenheiten in den Protokollen zur Probenverarbeitung der beiden Forschungslabors, wurde zur Vollständigkeit und im Sinne einer internen Qualitätskontrolle neben einer Gesamtauswertung auch eine vergleichende Auswertung der Ergebnisse beider Labors durchgeführt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Grafiken und Diagramme zeigen, sofern nicht anders angegeben, Fehlerbalken mit dem arithmetischen Mittelwert und das 95%-Konfidenzintervall.

2.6.4 Bivariate Korrelationsanalyse

Zur Überprüfung, ob ein Zusammenhang zwischen zwei mindestens ordinalskalierten Variablen besteht, kann der Korrelationskoeffizient r berechnet werden. Das Vorzeichen des Koeffizienten gibt die Art des Zusammenhangs an: gegensinnig bei Werten < 0 , gleichsinnig bei Werten > 0 . Der Betrag des Korrelationskoeffizienten sagt etwas über die Stärke des Zusammenhangs aus. Je näher der Wert an $+1$ oder -1 liegt, desto stärker der Zusammenhang. Die Interpretation von Korrelationskoeffizienten und deren Bedeutung wird nach dem Prinzip *cum hoc ergo propter hoc* (lat. „zugleich, also deswegen“) häufig überschätzt. Ein empirischer Koeffizient, dessen Betrag größer als 0 ist, besagt jedoch lediglich, dass eine Beziehung zwischen den Variablen besteht. Darüber hinaus gibt er keine Information, ob diese Beziehung kausalen Charakter hat, worauf ein eventuell bestehender Zusammenhang zurückzuführen sein könnte und welche Schlussfolgerungen gezogen werden können.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Anzahl mononukleärer bzw. CD34-positiver Zellen und den ordinal- und intervallskalierten Einflussfaktoren wurde in dieser Auswertung aufgrund der nicht vorliegenden Normalverteilung, sofern nicht anders erwähnt, der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Beim Auftreten von Ausreißern wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Kendall bevorzugt. Der Parameter pH-Wert der Mikroblutuntersuchung wurde aufgrund relativ niedriger Fallzahlen ($n=183$) nicht in die Korrelationsanalyse miteinbezogen. Die Rangkorrelationskoeffizienten wurden auf drei Dezimalstellen gerundet.

2.6.5 Multivariate Regressionsanalyse

Zur Unterstützung der Ergebnisse aus den Mittelwertvergleichen und der Korrelationsanalyse wurde die multiple lineare Regression für die zulässigen Parameter untersucht. Während die Korrelationsrechnung die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen ermittelt, dient die Regressionsanalyse dazu, die Art des Zusammenhangs aufzudecken bzw. Möglichkeiten an die Hand zu geben, den Wert einer abhängigen Variablen aus den Werten mehrerer unabhängiger Variablen vorherzusagen. Das Bestimmtheitsmaß gibt dabei an, wie stark die Varianz einer Variablen durch die Varianz einer anderen Variablen bestimmt wird. Es ist somit ein Maß für die Güte der Anpassung durch die Regressionsgerade und liegt immer zwischen 0 und 1.

Da für die Regressionsanalyse eine Normalverteilung der Daten Voraussetzung ist, wurden die Zielgrößen unserer Untersuchung, also die Konzentrationen an mononukleären und CD34-positiven Zellen, logarithmiert. Als Einflussgrößen wurden jeweils alle im Mittelwertvergleich

signifikanten Parameter miteinbezogen, sofern sie intervallskaliert oder nominalskaliert, aber dichotom, ausgeprägt waren. Der pH-Wert der Mikroblutuntersuchung konnte nicht mit aufgenommen werden, da die Auswertung sonst auf die 183 Fälle, in denen dieser Parameter erhoben wurde, beschränkt worden wäre. Die Berechnung erfolgte mit der Einschlussmethode; p-Werte und Bestimmtheitsmaße wurden auf drei Dezimalstellen gerundet.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Angaben zur Probenzahl

3.1.1 Rekrutierung

Im Auswertungszeitraum vom 31.07.03 bis zum 15.04.05 verzeichnete die Frauenklinik des Klinikums Rechts der Isar 1.508 Entbindungen, davon 1.435 Einlingsgeburten, 72 Zwillingsgeburten und eine Drillingsgeburt mit insgesamt 1.582 entbundenen Kindern. 1.176 Frauen (78,0%) erklärten sich zur wissenschaftlichen Nabelschnurblutspende für STEMMAT bereit. Es wurde eine Nabelschnurblutabnahme bei 1.192 Neugeborenen durchgeführt.

Während der Jahresübergänge 2003/2004 und 2004/2005 wurden aus organisatorischen Gründen – ca. zweiwöchige Laborferien über die Feiertage – Sammelpausen eingelegt, in denen keine Nabelschnurblutproben abgenommen und verarbeitet wurden. Daraus erklärt sich der Abfall der monatlichen Rekrutierungsraten auf durchschnittlich nur 34 Proben in den Dezembermonaten gegenüber durchschnittlich 60 Proben in den übrigen Monaten.

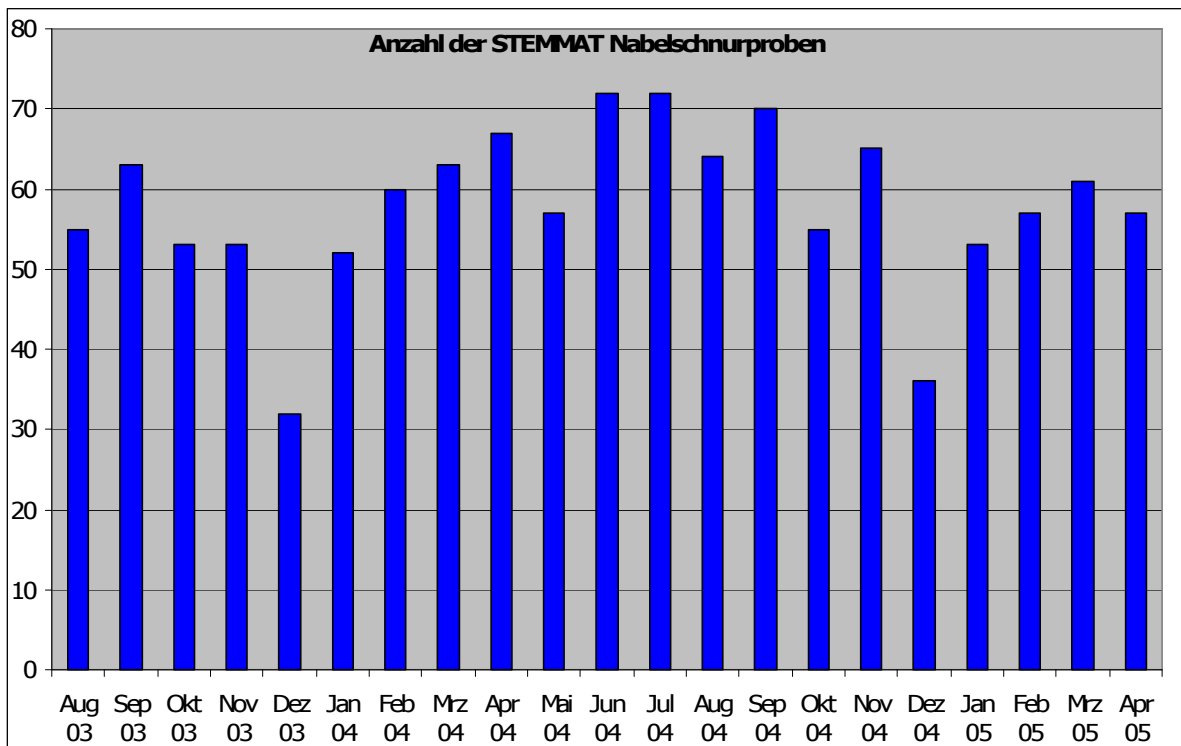


Abb. 15: Monatliche Rekrutierungsraten im STEMMAT Projekt im Sammelzeitraum 01.08.03-30.04.05.

125 Fälle (10,5 % der insgesamt betrachteten 1.192 Kinder) konnten in diese Auswertung nicht mit einbezogen werden. Dies lag nicht an systematischen Ausschlusskriterien, sondern betraf Neugeborene, bei denen aufgrund ihres problematischen Geburtsverlaufs eine Nabelschnurblutabnahme nicht im Vordergrund stand oder technisch nicht möglich war, z.B. reanimationspflichtige und totgeborene Kinder oder auch Neugeborene, bei denen für das STEMMAT-Projekt nur die Nabelschnur aber kein Nabelschnurblut abgenommen wurde, da die Nabelschnur z.B. vor der Abnahme ausgeblutet, abgerissen oder kollabiert war. Auch Gründe wie bakterielle Kontamination der Blutproben, ein präpartaler Nachweis infektiöser Krankheiten wie Hepatitis B oder HIV (Ausschluss von der Laborverarbeitung aus Arbeitssicherheitsgründen) oder eine mangelnde Verarbeitungsmöglichkeit durch die Laborpartner, z.B. wegen Krankheit oder Abwesenheit der zuständigen Labormitarbeiter, führten dazu, dass Proben verworfen werden mussten. Zuletzt waren auch bei Nabelschnurblutproben, die aufgrund des geringen Volumens von nur wenigen Millilitern nicht individuell auswertbar waren und die deshalb nur gepoolt verarbeitet oder verworfen wurden, keine individuellen Rückschlüsse auf die in dieser Auswertung genannten Kriterien möglich.

3.1.2 Probenzahlen

Aufgrund der Verteilung der Proben nach oben erläuterten zeitlichen Schema an die beiden Forschungslabors ergibt sich ein Anteil von 31,7% (n=338) der Nabelschnurblutproben für das Labor des Blutspendedienstes; das Labor der III. Medizinischen Klinik erhielt 68,3% (n=729) der Proben zur Verarbeitung.

Das Labor des Blutspendedienstes verarbeitete 230 der erhaltenen 338 Proben (68,0%) bezüglich der Parameter Gehalt an mononukleären Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut und Gehalt an CD34-positiven Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut. 108 Proben wurden zum Ziel der Entwicklung standardisierter Kryokonservierungsprotokolle ohne vorangehende Zellzählung in der Kryokonservierung verwendet.

Im Labor der III. Medizinischen Klinik wurde bei 649 Proben (89,0% aller erhaltenen Proben) der Gehalt an mononukleären Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut und bei 233 Proben (32,0%) die Konzentration von CD34-positiven Zellen bestimmt. 217 der letztgenannten Proben (93,1%) wurden bezüglich des Gehalts an CD34-positiven Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut per FACS-Analyse untersucht und 30 Proben (12,9%) per MACS Zellseparationsverfahren. Da bei 14 Proben (6,0%) beide Methoden angewendet wurden, ergibt sich die Gesamtzahl von 233. Um eine einheitliche Methodengrundlage zu gewährleisten, wurden für die weitere statistische Auswertung ausschließlich die Proben, die mittels FACS analysiert wurden, herangezogen.

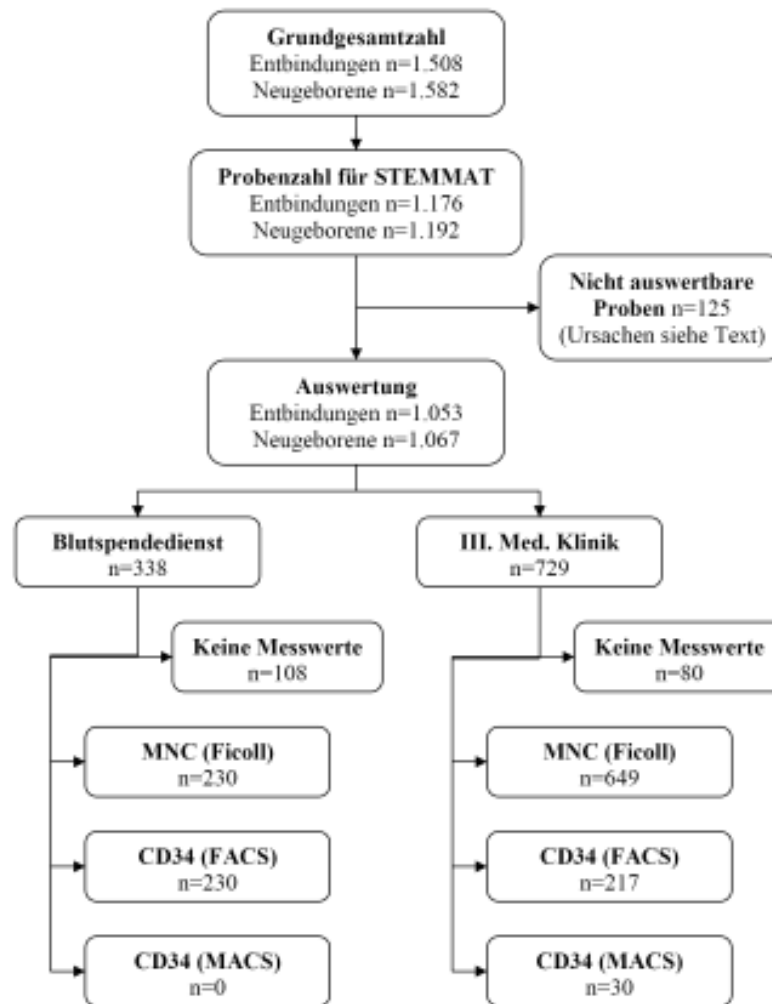


Abb. 16: Probenzahlen und Verteilung auf Forschungslabors.

3.2 Zellzahlgehalt der Nabelschnurblutproben

Betrachtet man die Ergebnisse beider Labors, beträgt der Gehalt an mononukleären Zellen im Mittel $6,56 \pm 3,82 \times 10^6$ / ml Nabelschnurblut ($n=879$), der mittlere Gehalt an CD34-positiven Zellen liegt nach Bestimmung mittels FACS-Analyse bei $2,57 \pm 2,31 \times 10^4$ / ml ($n=447$), nach MACS Zellseparation bei $1,95 \pm 1,24 \times 10^4$ / ml ($n=30$). Der Median liegt mit einem Wert von $5,6 \times 10^4$ / ml für den Gehalt an mononukleären Zellen, und Werten von $1,99 \times 10^4$ / ml für den Gehalt an CD34-positiven Zellen nach FACS bzw. $1,75 \times 10^4$ / ml für die Bestimmung mit MACS durchwegs unterhalb der arithmetischen Mittelwerte, was auf Ausreißer im Datenkontingent nach oben hinweist.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen für die einzelnen Labors sowie das Minimum und das Maximum als Streuungswerte der jeweiligen Variablen können aus Tab. 3 entnommen werden.

Tab. 3: Mittelwerte und Streuungsmaße der Stammzellkonzentrationen im Nabelschnurblut.

Zellzahlen (gesamt)		N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abw.
MNC x 10 ⁶ / ml (Ficoll)		879	0,70	37,90	6,56	3,82
CD34 ⁺ x 10 ⁴ / ml (FACS)		447	0,03	16,61	2,57	2,31
CD34 ⁺ x 10 ⁴ / ml (MACS)		30	0,49	6,52	1,95	1,24
(nach Labor getrennt)						
BSD	MNC x 10 ⁶ / ml (Ficoll)	230	1,80	12,40	5,12	2,09
	CD34 ⁺ x 10 ⁴ / ml (FACS)	230	0,24	16,61	2,92	2,21
	CD34 ⁺ x 10 ⁴ / ml (MACS)	0				
III. Med	MNC x 10 ⁶ / ml (Ficoll)	649	0,70	37,90	7,07	4,16
	CD34 ⁺ x 10 ⁴ / ml (FACS)	217	0,03	14,45	2,19	2,35
	CD34 ⁺ x 10 ⁴ / ml (MACS)	30	0,49	6,52	1,95	1,24

3.3 Zusammenhang von Evaluationsfaktoren und Stammzellgehalt

3.3.1 Geschlecht

Die in die Auswertung mit einbezogenen Proben stammen in 45,7% (n=488) von Kindern weiblichen und in 54,3% (n=579) der Fälle von Neugeborenen männlichen Geschlechts. Mittelwerte und Standardabweichungen für den Zellzahlgehalt an MNCs und CD34-positiven Zellen von Knaben und Mädchen sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Mittelwerte und Standardabweichung für männliche/weibliche Neugeborene.

Geschlecht		MNC x 10 ⁶ / ml (Ficoll)	CD34 ⁺ x 10 ⁴ / ml (FACS)
männlich	Mittelwert	6,54	2,68
	Std. Abw.	4,06	2,31
	N	467	251
weiblich	Mittelwert	6,59	2,42
	Std. Abw.	3,54	2,30
	N	412	196
Insgesamt	Mittelwert	6,56	2,57
	Std. Abw.	3,82	2,31
	N	879	447

Die Unterschiede zeigen sich sowohl in der Gesamtauswertung als auch in der nach Labors getrennten Auswertung als statistisch nicht signifikant (MNC: $p=0,248$; CD34⁺: $p=0,129$).

3.3.2 Geburtsmodus

Die Verteilung der Geburtsmodi ist Tab. 5 zu entnehmen. Daraus ergeben sich die prozentualen Anteile von 66,3% ($n=707$) vaginalen Geburten und 33,7% ($n=360$) Kaiserschnitten.

Tab. 5: Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Geburtsmodi.

Geburtsmodus	Häufigkeit	Prozent
Spontangeburt	645	60,4
Vakuumextraktion	55	5,2
Forceps	7	0,7
Primäre Sectio	159	14,9
Sekundäre Sectio	201	18,8
Gesamt	1.067	100,0

Im Mittelwertsvergleich finden sich die höchsten Zellzahlen bei den assistierten vaginalen Entbindungen – Vakuumextraktionen und Zangenentbindungen – sowie den Spontangeburt. Die operativen Entbindungen – Kaiserschnitte –, ob geplant oder notfallmäßig durchgeführt, weisen erniedrigte Mittelwerte auf (s. Tab. 6). Damit errechnet sich ein mittlerer mononukleärer Zellgehalt von $6,87 \pm 3,97 \times 10^6 / \text{ml}$ ($n=603$) und ein CD34-positiver Zellgehalt von $2,65 \pm 2,47 \times 10^4 / \text{ml}$ ($n=302$) für die vaginalen Entbindungen gegenüber einem mononukleären Zellgehalt von $5,90 \pm 3,40 \times 10^6 / \text{ml}$ ($n=276$) und einem CD34-positiven Zellgehalt von $2,39 \pm 1,92 \times 10^4 / \text{ml}$ ($n=145$) auf Seiten der Sectiones.

Bezüglich aller fünf Geburtsmodi ist für den Gehalt an mononukleären Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut ein signifikanter Unterschied ($p<0,001$) festzustellen, die Unterschiede zwischen dem durchschnittlichen Gehalt an CD34-positiven Zellen stellten sich als nicht signifikant ($p=0,600$) heraus.

Im Vergleich untereinander ergeben sich weder zwischen den drei vaginalen Entbindungen ($p=0,248$) noch zwischen den beiden operativen Entbindungen ($p=0,444$) statistisch signifikante Unterschiede, jedoch zeigen Spontangeburt sowohl gegenüber primären Sectiones ($p=0,001$) als auch gegenüber sekundären Sectiones ($p=0,007$) signifikant höhere Mittelwerte. Ebenso waren bei Vakuumextraktionen die Mittelwerte gegenüber geplanten ($p<0,001$) und notfallmäßigen Kaiserschnitten ($p=0,002$) signifikant erhöht (vgl. Abb. 17).

Daraus folgt bei der zusammenfassenden Gegenüberstellung von vaginalen Entbindungsmodi (Spontangeburt, Vakuumextraktionen und Zangengeburt) und operativen Entbindungsarten (primäre und sekundäre Sectiones) ein signifikant ($p < 0,001$) erhöhter Gehalt an mononukleären Zellen auf Seiten der vaginal entbundenen Neugeborenen, der trotz Assoziation mit dem Geburtsgewicht auch in der multivariaten Analyse statistisch signifikant bleibt ($p = 0,005$; $R^2 = 0,122$)

Tab. 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzahlkonzentrationen für die verschiedenen Geburtsmodi.

Geburtsmodi		MNC x 10⁶ / ml (nach Ficoll)	CD34⁺ x 10⁴ / ml (FACS)
Spontangeburt	Mittelwert	6,81	2,60
	Std. Abw.	3,95	2,39
	N	551	278
VE	Mittelwert	7,54	3,36
	Std. Abw.	4,38	3,38
	N	45	20
Forceps	Mittelwert	6,83	2,94
	Std. Abw.	2,82	2,62
	N	7	4
Prim. Sectio	Mittelwert	5,82	2,50
	Std. Abw.	3,41	1,78
	N	123	62
Sek. Sectio	Mittelwert	5,97	2,31
	Std. Abw.	3,40	2,02
	N	153	83
Insgesamt	Mittelwert	6,56	2,57
	Std. Abw.	3,82	2,31
	N	879	447

Analog der Gesamtauswertung kann bei beiden Labors im Vergleich aller fünf Geburtsmodi ein statistisch signifikanter Unterschied (BSD: $p < 0,001$; III. Med.: $p = 0,028$) bezüglich des Gehalts an mononukleären Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut festgestellt werden. Ebenso basiert dieses Ergebnis auf dem statistisch signifikanten Unterschied (BSD: $p < 0,001$; III. Med.: $p = 0,002$) zwischen vaginal und operativ entbundenen Neugeborenen, mit höheren Zellzahlen auf Seiten der vaginal entbundenen Kinder.

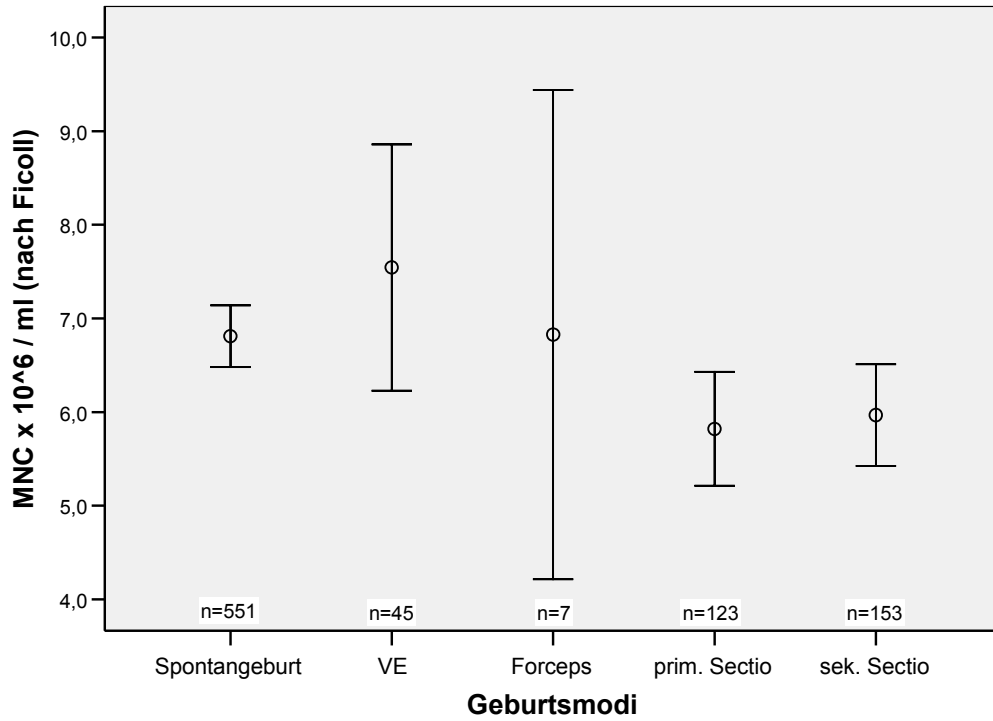


Abb. 17: Konzentration der mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom Entbindungsmodus (in Gesamtauswertung).

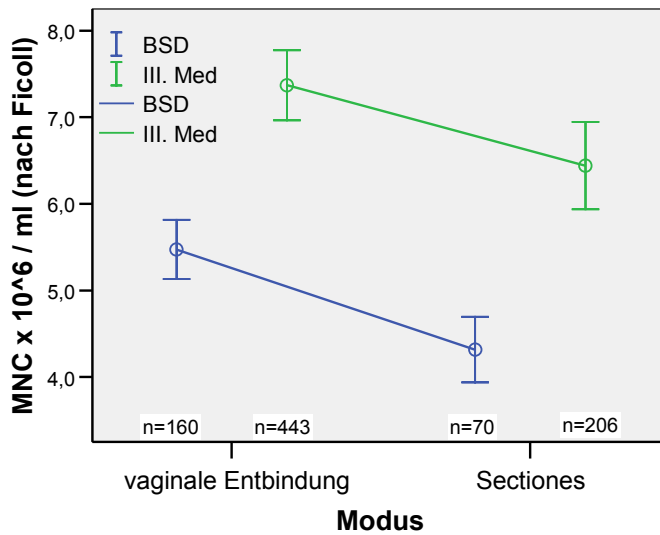


Abb. 18: Konzentration der mononukleären Zellen bei vaginal und per Kaiserschnitt entbundenen Kindern (in nach Labors getrennter Auswertung).

3.3.3 Geburtslage des Neugeborenen

Insgesamt wurden im Auswertungszeitraum 1.018 Kinder (95,4%) aus Schädellage, 49 Kinder (4,6%) aus Beckenendlage geboren. Von Letzteren wurden 48 Kinder per Sectio, lediglich ein Kind spontan vaginal entbunden. Aufgrund der geringen Fallzahl von nur einer vaginal entbundenen Beckenendlage ist eine statistische Auswertung bezüglich des Zusammenhangs von Geburtslage und Zellzahlgehalt im Nabelschnurblut beim vaginalen Entbindungsmodus nicht möglich und sinnvoll. Auch bei den Schnittentbindungen lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen in Schädel- oder Beckenendlage geborenen Kindern feststellen ($p=0,414$ für mononukleäre, $p=0,568$ für CD34-positive Zellen).

Tab. 7: Aufteilung der Lagetypen bei den verschiedenen Geburtsmodi.

		Geburtslage		Gesamt
		Schädellage	Beckenendlage	
Modus	Vaginale Entbindung	706	1	707
	Sectiones	312	48	360
Gesamt		1.018	49	1.067

3.3.4 Geburtsgewicht des Neugeborenen

Das absolute Geburtsgewicht liegt in 82,7% der Fälle ($n=882$) im normosomen Bereich, 103 Kinder (9,7%) wurden mit einem Geburtsgewicht kleiner 2750 g, 82 Kinder (7,7%) mit einem Geburtsgewicht über 4020 g geboren. In Abhängigkeit vom Schwangerschaftsalter werden 8,3% ($n=89$) der Neugeborenen als „small for gestational age“, 82,2% ($n=877$) als „appropriate for gestational age“ und 9,5% ($n=101$) als „large for gestational age“ beurteilt. Der Mittelwert des absoluten Geburtsgewichtes liegt bei 3343 ± 492 g ($n=1.067$), bei einem minimalen Geburtsgewicht von 1335 g und einem Maximum von 4730 g. Mittelwerte und Streuungsmaße für die Zellkonzentrationen sind aus Tab. 8 zu entnehmen.

In der Gesamtauswertung lassen sich weder für die Einteilung nach absolutem Geburtsgewicht (MNC: $p=0,079$; CD34⁺: $p=0,967$) noch für die bezüglich des Schwangerschaftsalters adaptierte Einteilung (MNC: $p=0,751$; CD34⁺: $p=0,295$) statistisch signifikante Unterschiede nachweisen. Beim Vergleich der einzelnen Gruppen unterscheiden sich die mikrosomen Neugeborenen signifikant ($p=0,033$) von den normosomen bezüglich der Konzentration an mononukleären Zellen, mit niedrigeren Zellzahlen auf Seiten der Kinder mit geringerem Gewicht.

Auf Seiten des Labors des Blutspendedienstes findet sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,001$) für den Gehalt an mononukleären Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut. Dabei unterscheiden sich die niedrigen Mittelwerte mikrosomer Neugeborener signifikant von

normosomen ($p < 0,001$) und makrosomen ($p = 0,005$) Kindern.

Die Unterschiede für die an das Schwangerschaftsalter angepasste Einteilung sind auch bei der pro Labor getrennt betrachteten Auswertung nicht signifikant.

Tab. 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzahlkonzentrationen für die unterschiedlichen Gewichtsklassen.

Geburtsgewicht		MNC x 10 ⁶ / ml (Ficoll)	CD34 ⁺ x 10 ⁴ / ml (FACS)
mikrosom (<2750g)	Mittelwert	5,93	2,44
	Std. Abw.	3,31	1,86
	N	78	40
normosom (2750-4020g)	Mittelwert	6,63	2,56
	Std. Abw.	3,76	2,33
	N	732	368
makrosom (>4020g)	Mittelwert	6,58	2,72
	Std. Abw.	4,88	2,52
	N	69	39
Angepasst an SSW			
Small for gestational age	Mittelwert	6,81	2,20
	Std. Abw.	3,65	2,11
	N	70	39
Appropriate for gestational age	Mittelwert	6,48	2,62
	Std. Abw.	3,62	2,39
	N	723	365
Large for gestational age	Mittelwert	7,04	2,42
	Std. Abw.	5,34	1,69
	N	86	43
Insgesamt	Mittelwert	6,56	2,57
	Std. Abw.	3,82	2,31
	N	879	447

Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit äußerst niedriger Korrelation für den Gehalt an mononukleären Zellen ($r = 0,092$, $p = 0,006$) und den Gehalt an CD34-positiven Zellen ($r = 0,142$, $p = 0,003$), der sich nach getrennter Auswertung sowohl im Datenkontingent der III. Medizinischen Klinik für mononukleäre Zellen ($r = 0,104$, $p = 0,008$) als auch im Labor des Blutspendedienstes für beide Zellpopulationen (MNCs: $r = 0,145$, $p = 0,028$; CD34⁺: $r = 0,195$,

$p=0,003$) nachweisen lässt.

In der multivariaten Analyse zeigt das Geburtsgewicht keinen signifikanten Einfluss mehr auf die Konzentration der mononukleären Zellen ($p=0,133$; $R^2=0,138$).

3.3.5 Schwangerschaftsalter

Der überwiegende Anteil der Neugeborenen von 93,3% ($n=996$) wurde im Zeitraum zwischen der jeweils vollendeten 37. und 41. Schwangerschaftswoche entbunden. 67 Frühgeborene (vor der 37. SSW entbundene) sowie vier übertragene (nach der 41. SSW entbundene) Kinder wurden in die Auswertung eingeschlossen, was einem prozentualen Anteil von 6,3% bzw. 0,4% entspricht.

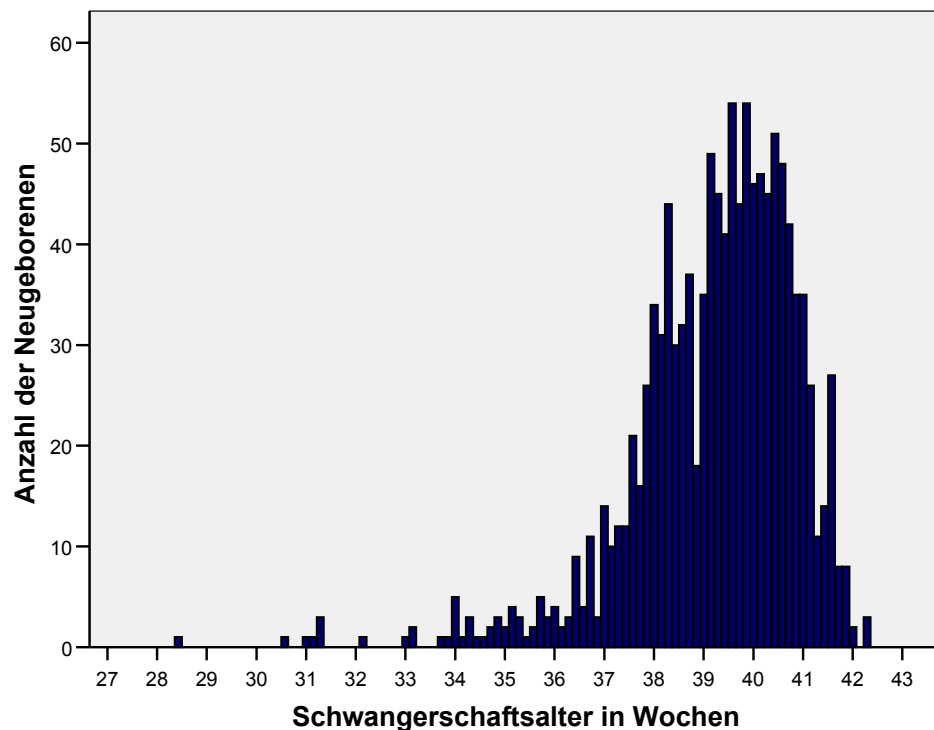


Abb. 19: Histogramm zur Häufigkeitsverteilung des Parameters Schwangerschaftsalter.

Der Mittelwert liegt bei $39,27 \pm 1,59$ Schwangerschaftswochen ($n=1.067$), der Median bei 39 Wochen und 4 Tagen. Die früheste Entbindung in dieser Auswertung erfolgte bei 28 Wochen und 3 Tagen, die späteste mit 42 Wochen und 2 Tagen. Mittelwerte und Standardabweichungen für den Stammzellgehalt in Abhängigkeit des Schwangerschaftsalters sind aus Tab. 9 ersichtlich.

Tab. 9: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzahlkonzentrationen bei frühgeborenen, reifgeborenen und übertragenen Kindern.

Schwangerschaftswochen		MNC x 10 ⁶ / ml (Ficoll)	CD34 ⁺ x 10 ⁴ / ml (FACS)
Frühgeborene	Mittelwert	5,69	3,24
	Std. Abw.	3,55	2,62
	N	47	25
Reifgeborene	Mittelwert	6,62	2,53
	Std. Abw.	3,84	2,29
	N	828	420
Übertragene	Mittelwert	5,35	2,52
	Std. Abw.	3,35	2,02
	N	4	2
Insgesamt	Mittelwert	6,56	2,57
	Std. Abw.	3,82	2,31
	N	879	447

Diese Unterschiede erweisen sich bezogen auf die mononukleären Zellzahlen als signifikant ($p=0,041$), der Zellgehalt der CD34-positiven Zellen unterscheidet sich dagegen nicht signifikant ($p=0,169$). Das Resultat ergibt sich allein aus dem signifikanten Unterschied ($p=0,016$) zwischen Frühgeborenen und Reifgeborenen mit einem erniedrigten Mittelwert auf Seiten der frühgeborenen Kinder.

Für das Labor des Blutspendedienstes kann, wie in der Gesamtauswertung, ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,026$) für den Gehalt an mononukleären Zellen festgestellt werden, der sich aus den im Vergleich von früh- und reifgeborenen Kindern signifikant niedrigeren Mittelwerten ($p=0,009$) auf Seiten der frühgeborenen Kinder ergibt.

Da das Datenkontingent bezüglich des Schwangerschaftsalters starke Ausreißer erkennen lässt, wird in diesem Fall der Rangkorrelationskoeffizient nach Kendall verwendet. Dieser zeigt eine schwache, aber signifikante positive Korrelation ($r=0,102$, $p<0,001$) für den Gehalt an mononukleären Zellen und eine sehr schwache negative Korrelation für den Gehalt an CD34-positiven Zellen ($r=-0,063$, $p=0,049$). Die Auswertung seitens des Labors der III. Medizinischen Klinik zeigt ähnliche Ergebnisse (MNC: $r=0,111$, $p<0,001$; CD34⁺: $r=-0,115$, $p=0,013$), das Labor des Blutspendedienstes erkennt einen signifikanten Zusammenhang lediglich für den Gehalt an mononukleären Zellen ($r=0,113$, $p=0,012$).

In der multivariaten Analyse zeigt sich das Schwangerschaftsalter durch die Parameter absolutes Gewicht und Nikotinabusus überlagert.

3.3.6 Apgar-Score des Neugeborenen

Die Häufigkeitsverteilung der Apgar-Werte kann aus Tab. 10 entnommen werden. Der Median beträgt für den nach 1 und 5 Minuten erhobenen Apgar-Score jeweils 9, für den nach 10 Minuten erhobenen Wert ergibt sich ein Median von 10. Der 1-Minuten-Wert liegt in 177 Fällen (16,6%), der 5-Minuten-Wert in 26 Fällen (2,4%) und der 10-Minuten-Wert in nur sechs Fällen (0,6%) unterhalb von 8.

Tab. 10: Häufigkeitsverteilung der Apgar-Werte nach einer, fünf und zehn Minuten.

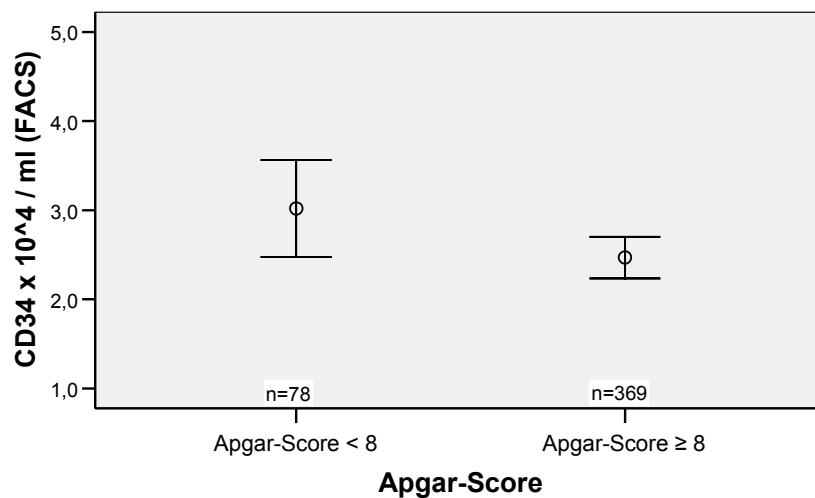
Apgar (nach 1 min)	Häufigkeit	Prozent
2	4	0,4
3	3	0,3
4	8	0,7
5	17	1,6
6	22	2,1
7	123	11,5
8	299	28,0
9	560	52,5
10	31	2,9
Gesamt	1.067	100,0
Apgar (nach 5 min)	Häufigkeit	Prozent
5	3	0,3
6	6	0,6
7	17	1,6
8	145	13,6
9	528	49,5
10	368	34,5
Gesamt	1.067	100,0
Apgar (nach 10 min)	Häufigkeit	Prozent
6	1	0,1
7	5	0,5
8	38	3,6
9	344	32,2
10	679	63,6
Gesamt	1.067	100,0

Tab. 11: Mittelwerte und Standardabweichungen unterschieden nach Apgar-Score.

Apgar-Score		MNC x 10 ⁶ / ml (Ficoll)	CD34 x 10 ⁴ / ml (FACS)
Apgar < 8	Mittelwert	6,76	3,02
	Std. Abw.	3,63	2,41
	N	142	78
Apgar ≥ 8	Mittelwert	6,53	2,47
	Std. Abw.	3,86	2,27
	N	737	369
Insgesamt	Mittelwert	6,56	2,57
	Std. Abw.	3,82	2,31
	N	879	447

Kinder mit Apgar-Scores kleiner 8 weisen höhere Mittelwerte für mononukleäre und CD34-positive Zellzahlen auf als Kinder mit physiologischen Apgar-Werten (s. Tab. 11).

Dieser Unterschied erweist sich für den Gehalt an CD34-positiven Zellen als statistisch signifikant ($p=0,028$). In der getrennten Auswertung kann seitens des Labors des Blutspendedienstes diese Beobachtung bestätigt werden ($p=0,002$).

**Abb. 20: Konzentration der CD34-positiven Zellen in Abhängigkeit vom Apgar-Score.**

Eine statistisch signifikante aber geringe negative Korrelation lässt sich für den nach einer Minute ($r=-0,112$, $p=0,018$) und für den nach zehn Minuten ($r=-0,106$, $p=0,025$) erhobenen Apgar-Score und den Gehalt an CD34-positiven Zellen feststellen. In der getrennten Auswertung findet sich auf Seiten des Labors des Blutspendedienstes ebenso eine geringe aber signifikante

Korrelation zwischen dem CD34-Zellgehalt und den nach einer Minute erhobenen Apgar-Werten ($r=-0,191$; $p=0,004$). In der multiplen Regressionsanalyse verliert der Apgar-Score seinen signifikanten Einfluss ($p=0,632$; $R^2=0,041$), was auf eine Überlagerung durch Assoziation mit dem Nabelschnur-pH-Wert hinweist.

3.3.7 Arterieller Nabelschnur-pH-Wert

Von insgesamt 1.061 Neugeborenen (99,4%) konnte der pH-Wert aus einer aus der Nabelschnurarterie gewonnenen Blutprobe bestimmt werden, in den fehlenden sechs Fällen (0,6%) war die Bestimmung aufgrund labortechnischer Gründe nicht möglich. 84,9% der Kinder ($n=901$) wurden mit einem physiologischen pH-Wert von 7,2 oder größer geboren, 13,7% ($n=145$) zeigten eine leichte Azidose mit pH-Werten zwischen 7,19 und 7,1 und 1,4% ($n=15$) eine mittelgradige bis schwere Azidose mit pH-Werten unterhalb 7,1.

Tab. 12: Häufigkeitsverteilung des Nabelschnur-pH-Werts in Klassen.

Arterieller Nabelschnur-pH-Wert	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Schwere Azidose (<7,0)	1	0,1	0,1
Mittelgradige Azidose (7,0 - 7,09)	14	1,3	1,3
Leichte Azidose (7,1 - 7,19)	145	13,6	13,7
Noch normale Azidität (7,2 - 7,29)	506	47,4	47,7
Optimale Azidität (>7,29)	395	37,0	37,2
Gesamt	1.061	99,4	100,0
Fehlend	6	0,6	
Gesamt	1.067	100,0	

Der Mittelwert liegt bei $7,27 \pm 0,08$ ($n=1.061$) mit einem Minimum von 6,99 und einem Maximum von 7,51. Für die untersuchten Zellkonzentrationen zeigen sich zunehmende Mittelwerte bei abnehmendem pH-Werten (s. Tab. 13 bzw. Abb. 21 und Abb. 22).

Dieser Unterschied ist für die Konzentration mononukleärer ($p<0,001$) und CD34-positiver Zellen ($p=0,001$) statistisch signifikant. Bezüglich der mononukleären Zellen zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede sowohl zwischen nicht azidotischen Kindern und Kindern mit leichter Azidose ($p<0,001$), als auch zwischen nicht azidotischen Kindern und Kindern mit mittelgradiger und schwerer Azidose ($p=0,009$). Für die Konzentration der CD34-positiven Zellen können analog signifikante Unterschiede zwischen Neugeborenen mit physiologischem pH-Wert im Vergleich zu leicht azidotischen ($p=0,002$) sowie zu mittelgradig und schwer azidotischen Kindern ($p=0,032$) gefunden werden. Zwischen den beiden Azidosegruppen besteht kein signifikanter Unterschied.

Tab. 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzahlkonzentrationen in den unterschiedlichen pH-Wert-Klassen.

Arterieller Nabelschnur-pH-Wert		MNC x 10 ⁶ / ml (Ficoll)	CD34 ⁺ x 10 ⁴ / ml (FACS)
Keine Azidose ($\geq 7,2$)	Mittelwert	6,27	2,39
	Std. Abw.	3,56	2,15
	N	741	379
Leichte Azidose (7,1-7,19)	Mittelwert	8,14	3,55
	Std. Abw.	4,78	2,93
	N	122	62
Schwere bis mittelgradige Azidose ($< 7,1$)	Mittelwert	8,67	4,44
	Std. Abw.	4,48	2,00
	N	12	4
Insgesamt	Mittelwert	6,57	2,57
	Std. Abw.	3,82	2,31
	N	875	445

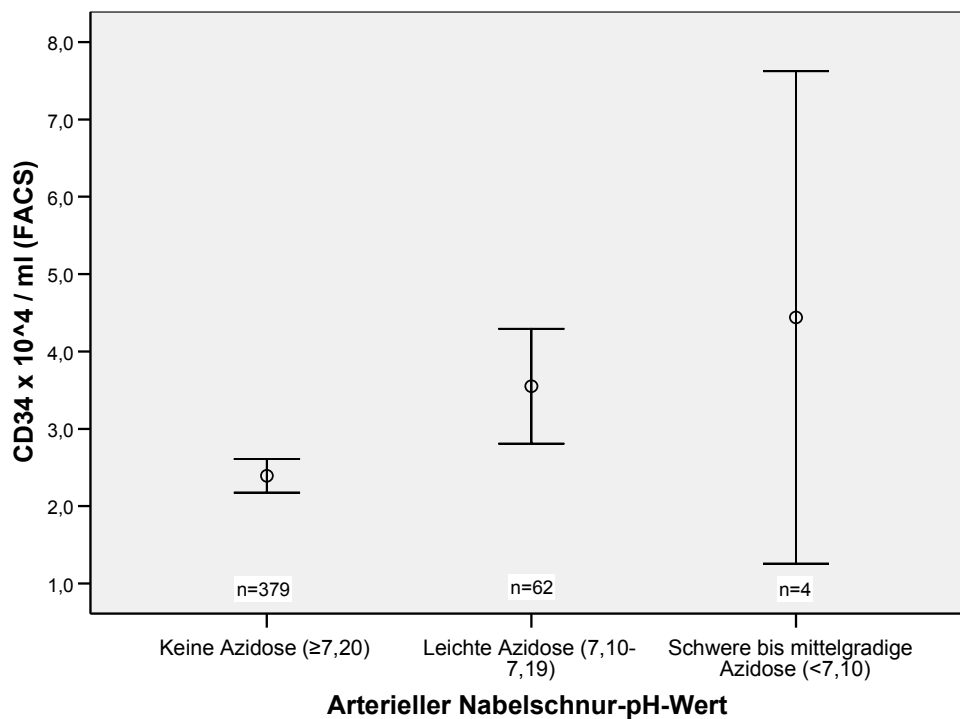


Abb. 21: Konzentration der CD34-positiven Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

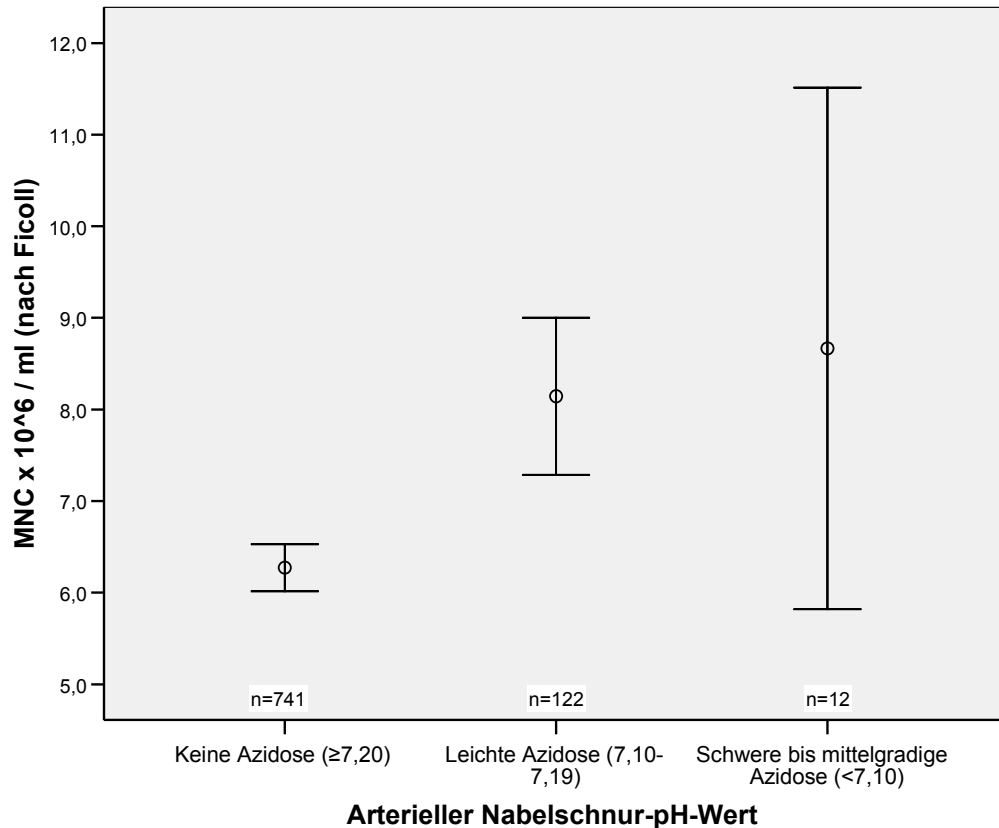


Abb. 22: Zellkonzentration der mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

In der getrennten Auswertung können beide Labors statistisch signifikante Unterschiede bezüglich des Gehalts an mononukleären Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut für die drei Untergruppen bestätigen (III. Med.: $p < 0,001$; BSD: $p = 0,007$). Bezüglich des Gehalts an CD34-positiven Zellen wird auf Seiten des Labors des Blutspendedienstes ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,002$), auf Seiten des Labors der III. Medizinischen Klinik ein statistischer Trend ($p = 0,072$) festgestellt. Grundsätzlich gilt auch hier, dass die Mittelwerte der Zellzahlen mit abnehmendem pH-Wert ansteigen.

Dabei finden sich für den Gehalt an mononukleären Zellen in beiden Labors statistisch signifikante oder grenzwertig signifikante Unterschiede für Kinder mit physiologischen pH-Werten gegenüber Kindern mit leichter Azidose (BSD: $p = 0,023$; III. Med.: $p < 0,001$) sowie gegenüber Kindern mit mittelschwerer bis schwerer Azidose (BSD: $p = 0,021$; III. Med.: $p = 0,063$). Dies ist in Abb. 23 dargestellt. Auch die Mittelwerte der CD34-positiven Zellen zeigen bei leichter (BSD: $p = 0,002$; III. Med.: $p = 0,072$) und mittelgradig bis schwerer Azidose (BSD: $p = 0,054$) eine Zunahme (nicht gesondert graphisch dargestellt). Zwischen den beiden Azidosegruppen kann in keinem Fall ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden.

In der Gesamtauswertung kann eine geringe, aber hochsignifikante ($p < 0,001$) Korrelation sowohl für den Gehalt an mononukleären Zellen ($r = -0,190$), als auch für den Gehalt an CD34-positiven Zellen ($r = -0,167$) ermittelt werden. Dieses Ergebnis kann seitens beider Labors für die Konzentration an mononukleären Zellen (III. Med.: $r = -0,192$, $p < 0,001$; BSD: $r = -0,212$, $p = 0,001$) sowie durch das Labor des Blutspendedienstes für den CD34-Zellgehalt ($r = -0,208$, $p = 0,001$) bestätigt werden. Damit wird der bereits im Mittelwertsvergleich erkannte gegensinnige Zusammenhang von pH-Wert und Stammzellgehalt im Nabelschnurblut verdeutlicht. Auch in der multivariaten Regressionsanalyse bleibt der arterielle Nabelschnur-pH-Wert ein hochsignifikanter Einflussfaktor (MNC: $p < 0,001$, $R^2 = 0,138$; CD34⁺: $p = 0,002$, $R^2 = 0,041$) und zeigt sich nicht durch andere Parameter überlagert.

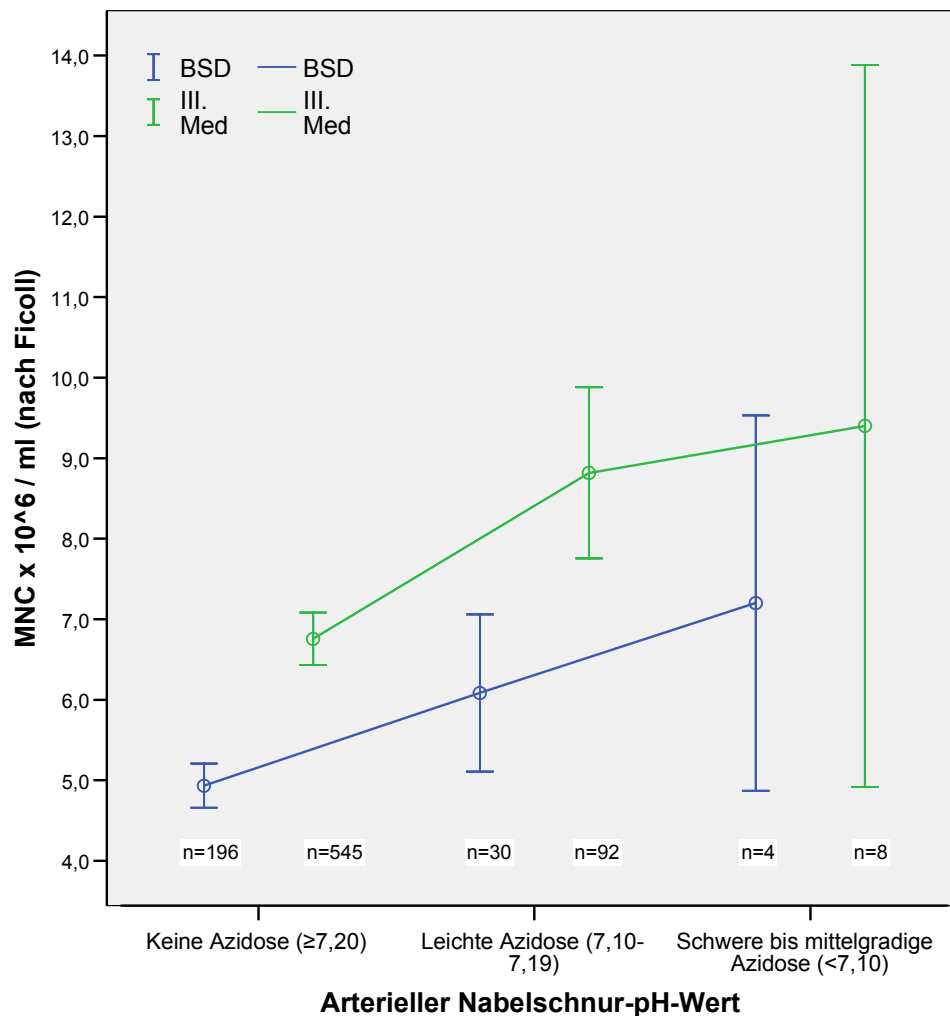


Abb. 23: Konzentration der mononukleären Zellen für die unterschiedlichen pH-Wert-Klassen (in nach Labors getrennter Auswertung).

3.3.8 pH-Wert der Mikroblutuntersuchung

Bei 183 der ausgewerteten Geburten wurde vom Geburtshelfer eine Punktion des fetalen Skalps mit Blutgasanalyse des pH-Werts durchgeführt. In 80,3% (n=147) liegt das Ergebnis im physiologischen Bereich über einem pH-Wert von 7,24. 13,1% (n=24) der Fälle bewegen sich im präpathologischen Bereich und ein pathologischer pH-Wert von <7,2 wird bei 6,6% (n=12) der Proben festgestellt. Der Mittelwert beträgt $7,30 \pm 0,06$ (n=183) bei einem Minimum von 7,11 und einem Maximum von 7,49. Neugeborene mit pathologischem pH-Wert in der Mikroblutuntersuchung weisen höhere Mittelwerte für mononukleäre Zellen und CD34-positive Zellen auf als Kinder mit präpathologischem oder physiologischem pH-Wert.

Tab. 14: Mittelwerte und Standardabweichungen unterschieden nach pH-Wert der Mikroblutuntersuchung.

pH-Wert der Mikroblutuntersuchung		MNC x 10 ⁶ / ml (Ficoll)	CD34 ⁺ x 10 ⁴ / ml (FACS)
pathologisch (<7,2)	Mittelwert	7,49	4,79
	Std. Abw.	2,96	5,29
	N	10	7
präpathologisch (7,2 - 7,24)	Mittelwert	7,02	2,50
	Std. Abw.	4,45	1,08
	N	17	9
physiologisch (>7,24)	Mittelwert	6,99	2,19
	Std. Abw.	4,33	1,87
	N	124	61
Insgesamt	Mittelwert	7,03	2,46
	Std. Abw.	4,24	2,38
	N	151	77

In der Gesamtauswertung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,680$ für mononukleäre Zellen, $p=0,300$ für CD34-positive Zellen). Bei getrennter Auswertung kann auf Seiten des Labors des Blutspendedienstes ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen sowohl für den Gehalt an mononukleären Zellen ($p=0,026$) als auch an CD34-positiven Zellen ($p=0,034$) festgestellt werden, der sich auf die signifikant erhöhten Mittelwerte an mononukleären ($p=0,017$) und CD34-positiven Zellen ($p=0,004$) von Kindern mit einem pathologischen pH-Wert gegenüber Kindern mit einem physiologischen pH-Wert begründet (vgl. Tab. 14). Damit wird der aus der Grafik erkennbare gegensinnige Zusammenhang des pH-Werts der Mikroblutuntersuchung und des Stammzellgehalts bestätigt.

3.3.9 Maternaler Nikotinabusus

Bei 949 Patientinnen (88,9%) wurde im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen dokumentiert, ob während der Schwangerschaft ein maternaler Nikotinabusus vorlag. Bei 11,1% (n=118) der werdenden Mütter gab es keine Angabe. Der Anteil der Raucherinnen betrug 13,0% (n=123), der Anteil der Nichtraucherinnen 87,0 % (n=826).

Tab. 15: Mittelwerte und Standardabweichung der Zellzahlkonzentrationen für Raucherinnen und Nichtraucherinnen.

Nikotinabusus		MNC x 10 ⁶ / ml (Ficoll)	CD34 x 10 ⁴ / ml (FACS)
Kein Nikotinabusus	Mittelwert	6,66	2,63
	Std. Abw.	3,93	2,37
	N	683	344
Nikotinabusus	Mittelwert	5,86	1,83
	Std. Abw.	3,03	1,81
	N	102	62
Insgesamt	Mittelwert	6,55	2,51
	Std. Abw.	3,84	2,31
	N	785	406

Bezüglich des Zellzahlgehalts liegen die Mittelwerte der Kinder rauchender Mütter für mononukleäre und für CD34-positive Zellen unterhalb der durchschnittlichen Mittelwerte der Kinder von Nichtraucherinnen. Dieser Unterschied ist mit $p=0,042$ für den Gehalt an mononukleären sowie $p=0,004$ für den Gehalt an CD34-positiven Zellen statistisch signifikant (s. Abb. 24 und Abb. 25).

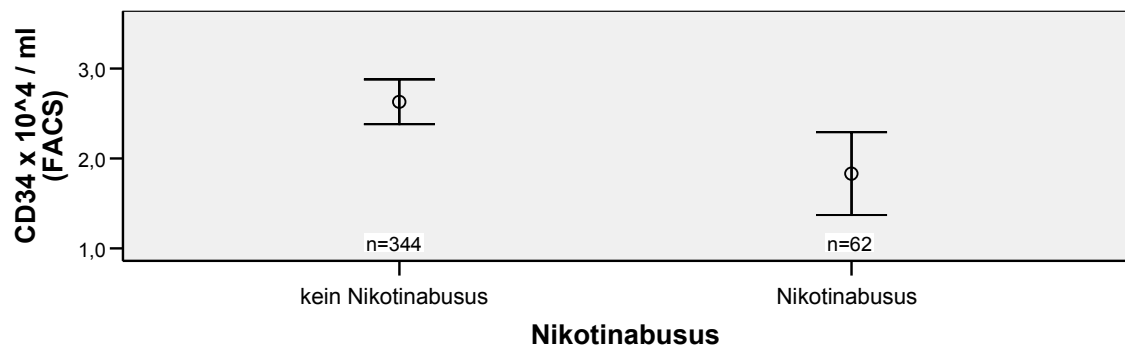


Abb. 24: Konzentration der CD34-positiven Zellen in Abhängigkeit vom maternalen Nikotinabusus.

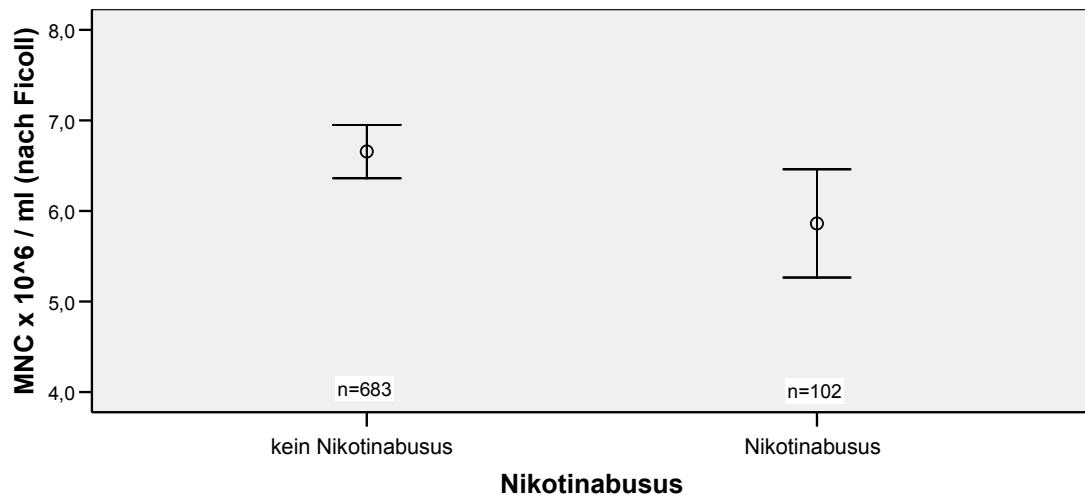


Abb. 25: Zellkonzentration der mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom maternalen Nikotinabusus.

In der getrennt betrachteten Auswertung pro Labor kann das Ergebnis, dass Kinder von in der Schwangerschaft rauchenden Müttern einen signifikant erniedrigten Gehalt an mononukleären Zellen und CD34-positiven Zellen aufweisen als Kinder nichtrauchender Mütter, von Seiten des Labors des Blutspendedienstes bestätigt werden (MNC: $p=0,029$; $CD34^+$: $p=0,001$).

Auch die multivariate Regressionsanalyse bekräftigt, vor allem nach Ausgleich der starken Assoziation mit den Parametern Geburtsgewicht und Schwangerschaftsalter, den signifikanten Einfluss des Rauchens während der Schwangerschaft auf die Konzentrationen der mononukleären Zellen ($p=0,022$; $R^2=0,122$) und der CD34-positiven Zellen ($p=0,015$; $R^2=0,041$) im Nabelschnurblut.

3.3.10 Maternale Cortisonmedikation

5,8% ($n=62$) aller Patientinnen bekamen im Laufe ihrer Schwangerschaft einmalig oder regelmäßig Cortisonpräparate verabreicht.

51 dieser Patientinnen (4,8%) erhielten Celestan (Betamethason) 12 mg i.m., zweimal im Abstand von 24 Stunden, zur Förderung der Lungenreife des Neugeborenen. Sieben Patientinnen (0,7%) wurde ein i.v. Cortisonpräparat verabreicht, eine Patientin (0,1%) erhielt sowohl Celestan als auch ein intravenöses Cortisonpräparat und drei Patientinnen (0,3%) wurden aufgrund einer bekannten Asthmaerkrankung mit Cortisonspray behandelt.

Mittelwerte und Standardabweichungen für den Zellgehalt an mononukleären Zellen und CD34-positiven Zellen für die beiden Untergruppen sind in Tab. 16 zu finden. Diese Unterschiede sind jedoch sowohl in der Gesamtauswertung als auch in der nach Labor getrennten Auswertung statistisch nicht signifikant.

Tab. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen für Mütter mit/ohne Cortisonmedikation.

Cortisongabe ja/nein		MNC x 10 ⁶ / ml (Ficoll)	CD34 x 10 ⁴ / ml (FACS)
Kein Cortison	Mittelwert	6,61	2,55
	Std. Abw.	3,89	2,28
	N	829	419
Cortisongabe	Mittelwert	5,73	2,77
	Std. Abw.	2,33	2,65
	N	50	28
Insgesamt	Mittelwert	6,56	2,57
	Std. Abw.	3,82	2,31
	N	879	447

3.3.11 Intervall bis zur Verarbeitung der Blutprobe

Bei insgesamt 938 Proben wurde die Anzahl der Stunden, die zwischen Probengewinnung und Probenverarbeitung verstrichen waren, dokumentiert. 59,7% (n=560) der Proben konnten innerhalb von 24 Stunden verarbeitet werden, bei 31,9% (n=299) lag der Wert zwischen 24 und 60 Stunden, 8,4% (n=79) wiesen ein Verarbeitungsintervall von mehr als 60 Stunden auf. Mittelwerte und Streuungsmaße des Verarbeitungsintervalls sind aus Tab. 17 zu entnehmen.

Tab. 17: Mittelwerte und Streuungsmaße des Verarbeitungsintervalls.

Verarbeitungsintervall		N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abw.
Gesamt		938	1	120	25,62	20,43
Labor	BSD	230	4	66	24,94	9,76
	III. Med	708	1	120	25,84	22,85

Eine getrennte Auswertung ergibt einen Anteil von 63,3% (n=448) von innerhalb der ersten 24 Stunden verarbeiteten Proben für das Labor der III. Medizinischen Klinik, 25,7% (n=182) wurden im Zeitraum zwischen 24 und 60 Stunden und 11,0% (n=78) nach Überschreitung von 60 Stunden verarbeitet.

Letzteres begründet sich auf das zeitliche Verteilungsschema, wonach das Labor der III. Medizinischen Klinik die über die Wochenenden gesammelten Proben erhielt (vgl. Abb. 10). Dem Labor des Blutspendedienstes stand, wohl vor allem standorttechnisch bedingt, ein etwas geringerer Anteil von 48,7% (n=112) innerhalb der ersten 24 Stunden zur Verarbeitung zur

Verfügung; mehr als die Hälfte der Proben, 50,9% (n=117), wurden im Zeitraum zwischen 24 und 60 Stunden, nur eine Probe (0,4%) nach mehr als 60 Stunden verarbeitet.

Die Mittelwerte des Stammzellgehalts nehmen sowohl für die mononukleären als auch für die CD34-positiven Zellen mit längerem Intervall bis zur Verarbeitung zu (vgl. Tab. 18).

Tab. 18: Mittelwerte und Standardabweichung abhängig vom Verarbeitungsintervall.

Verarbeitungsintervall		MNC x 10⁶ / ml (nach Ficoll)	CD34 x 10⁴ / ml (FACS)
< 24 h	Mittelwert	6,12	2,51
	Std. Abw.	3,85	2,36
	N	542	272
24 - 60 h	Mittelwert	7,03	2,59
	Std. Abw.	3,62	2,03
	N	277	158
> 60 h	Mittelwert	8,62	3,21
	Std. Abw.	3,81	3,56
	N	55	17
Insgesamt	Mittelwert	6,57	2,57
	Std. Abw.	3,83	2,31
	N	874	447

Bezüglich des Gehalts an mononukleären Zellen unterscheiden sich die drei Untergruppen statistisch signifikant ($p < 0,001$). So weisen die erst nach 60 Stunden verarbeiteten Proben signifikant höhere Mittelwerte auf als diejenigen, die innerhalb 24 Stunden ($p < 0,001$) verarbeitet wurden. Gleiches gilt für die Proben mit einem Verarbeitungsintervall zwischen 24 und 60 Stunden ($p < 0,001$). Letztgenannte Proben zeigen signifikant höhere Mittelwerte ($p = 0,003$) gegenüber den innerhalb 24 Stunden verarbeiteten Proben (vgl. Abb. 26).

Von beiden Labors wird der statistisch signifikante Unterschied zwischen den innerhalb 24 Stunden und den nach diesem Zeitraum verarbeiteten Proben bestätigt (BSD: $p = 0,011$; III. Med.: $p < 0,001$). Der in der Gesamtauswertung nachgewiesene weitere Anstieg der Zellzahlen nach mehr als 60 Stunden ist in der nach Labors getrennten Auswertung nicht mehr erkennbar bzw. nicht mehr statistisch signifikant (vgl. Abb. 27).

In der Gesamtauswertung zeigt sich eine positive Korrelation für den Gehalt mononukleärer Zellen ($r = 0,227$, $p < 0,001$) und den Gehalt CD34-positiver Zellen ($r = 0,102$, $p = 0,31$). Bezüglich der mononukleären Zellkonzentration können beide Labors diese Beobachtung bestätigen (BSD: $r = 0,230$, $p < 0,001$; III. Med.: $r = 0,304$, $p < 0,001$). Auch in der multivariaten Analyse bleibt das Verarbeitungsintervall ein hochsignifikanter Einflussfaktor ($p < 0,001$; $R^2 = 0,138$).

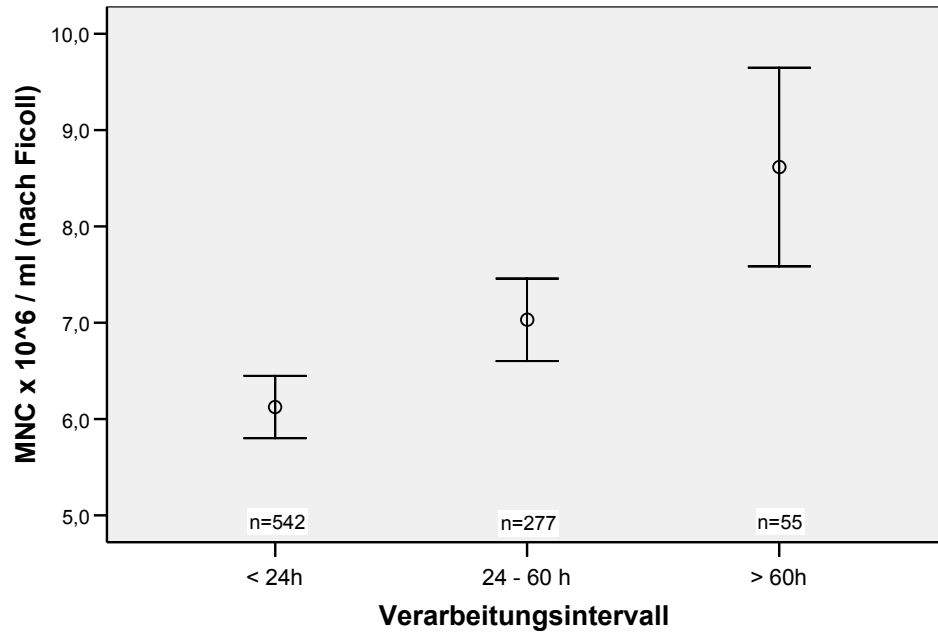


Abb. 26: Konzentration der mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom Verarbeitungsintervall (Gesamtauswertung).

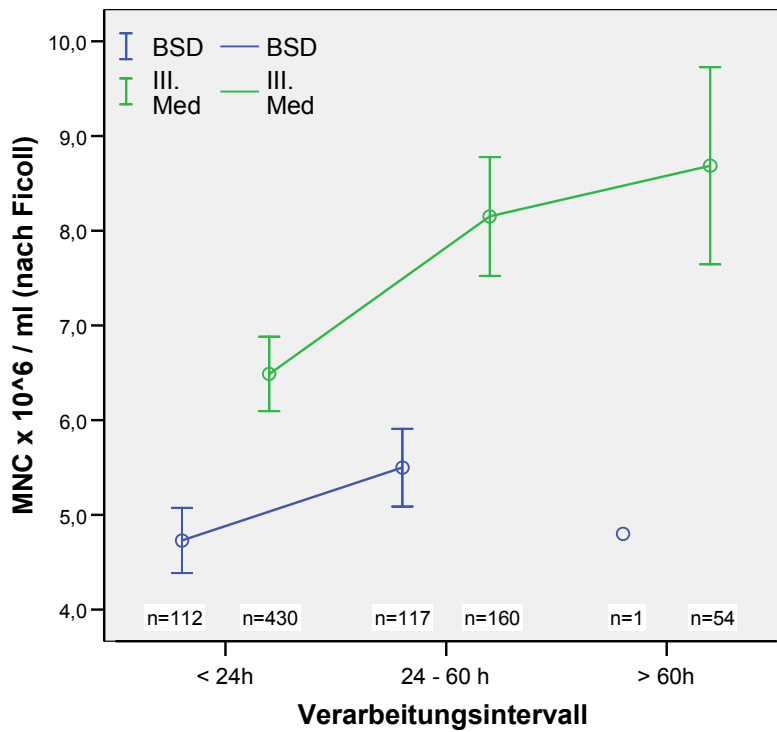


Abb. 27: Konzentration der mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom Verarbeitungsintervall (in nach Labors getrennter Auswertung).

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine Übersicht aller untersuchten Parameter sowie die Ergebnisse zu deren Einfluss auf den Stammzellgehalt im Nabelschnurblut der Neugeborenen wird in Tab. 19 aufgelistet.

Tab. 19: Einflussnahme der untersuchten Parameter auf den Stammzellgehalt.

Variable	MNC / ml	CD34 ⁺ / ml	Stammzellgehalt
Art. Nabelschnur-pH-Wert	p < 0,001	p = 0,001	zunehmend mit abnehmendem pH
Nikotinabusus	p = 0,004	p = 0,042	Nichtraucherinnen > Raucherinnen
Schwangerschaftsalter	p = 0,041	p= n. s.	Reifgeborene > Frühgeborene
Geburtsmodus	p < 0,001	p= n. s.	vaginale > operative Entbindungen
Verarbeitungsintervall	p < 0,001	p= n. s.	zunehmend mit zunehmenden Verarbeitungsintervall
Apgar-Score	p= n. s.	p = 0,028	Apgar kleiner 8 > Apgar 8 und größer
MBU pH-Wert (BSD)	p = 0,017	p = 0,004	pathologisch > physiologisch
Absolutes Gewicht (BSD)	p = 0,001	p= n. s.	mikrosom < makrosom / mikrosom < normosom
Gewicht bzgl. SSA	p= n. s.	p= n. s.	kein Zusammenhang
Geschlecht	p= n. s.	p= n. s.	kein Zusammenhang
Cortisonmedikation	p= n. s.	p= n. s.	kein Zusammenhang
Geburtslage	Fallzahl zu gering		

4 Diskussion

4.1 Bewertung der Ergebnisse und Einordnung in die Literatur

Der Einfluss verschiedener perinataler Faktoren auf den Zellgehalt im Nabelschnurblut Neugeborener konnte durch unsere Untersuchung zumindest für einige Variablen aufgezeigt bzw. bestätigt werden. Inwieweit sich hierbei Parallelen oder Widersprüche zu den Arbeiten anderer Forscher ergaben und welche Vorgänge und Pathomechanismen unseren Ergebnissen vermutlich zugrunde liegen, soll hier im Folgenden diskutiert werden.

4.1.1 Zellzahlen und Zellkonzentration

Die Zellzahlkonzentrationen für mononukleäre Zellen in dieser Studie waren mit den Ergebnissen ähnlich angelegter Untersuchungen vergleichbar oder lagen überwiegend leicht über deren Mittelwerten ([76] Tab. 2). Der Zellzahlgehalt wird jedoch meistens als absolute Anzahl pro Blutprobe ([13] Tab. 2) oder pro Transplantationseinheit ([89] Tab. I(a)) und nicht als Konzentration pro Milliliter angegeben.

Die Ergebnisse für den Gehalt bzw. die Konzentration von CD34-positiven Zellen variieren weitaus stärker im Gegensatz zu den MNCs (vgl. [117] Tab. II), was durch die verschiedenen existierenden Protokolle zur Zellzahlbestimmung erklärbar ist. Auch hier erschwert die überwiegende Angabe von absoluten Zellzahlen im Gegensatz zu Konzentrationen den Vergleich. Zur korrekten Interpretierbarkeit der Forschungsergebnisse wäre eine internationale Standardisierung der Methodik zwingende Voraussetzung. So stellen Untersuchungen, die ein unserer Studie vergleichbares Protokoll verwendeten, ähnliche ([7] Tab. 1) oder nur minimal höhere Mittelwerte ([71] Tab. 2, [9] Tab. 2) bezüglich der CD34-positiven Zellzahlen fest. Aus der Zellzahlkonzentration in unserer Studie (vgl. Kap. 3.2) kann man schließen, dass bei empfohlener Zelldosis von mindestens $1,2 \times 10^5$ CD34-positiven Zellen ([58] S.1819) pro Kilogramm Körpergewicht die absoluten Zellzahlen pro Nabelschnurblutprobe nur zur Transplantation für einen Empfänger mit äußerst geringem Körpergewicht (maximal ca. 20 kg) ausreichen würden. Analog zur Handhabung bei Knochenmarktransplantationen wird das hämatopoetische Potential von Nabelschnurblutproben meist anhand der Gesamtzahl von nukleären Zellen (TNCs) pro Probe eingeschätzt. Die Relation von nukleären Zellen des Spenders zum Körpergewicht des Empfängers ergibt die Zelldosis, welche eng mit dem Erfolg der Transplantation, insbesondere mit der Geschwindigkeit des Engraftments und der Überlebensrate, korreliert ([33] S.374-6). Im Moment wird eine minimale Zelldosis von 3×10^7 nukleären Zellen ([35] S.147) pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers empfohlen. Dass der Aussagewert des TNC-Gehaltes nur einer von wenigen Faktoren ist bzw. von der Assoziation mit dem Gehalt an koloniebildenden Vorläuferzellen (CFCs) überlagert wird, zeigten u. a. Migliaccio et al. ([68] S.2721). Wagner et al.

konzentrierten sich mehr auf den Gehalt an CD34-positiven Zellen. Sie stellten einen Zusammenhang zwischen der transplantierten CD34-Zelldosis und höheren Überlebensraten, einer höheren Engraftmentwahrscheinlichkeit und niedrigerem therapieassoziierten Frühversterben fest ([112]). Die Zahl der CD34-positiven Zellen wird aufgrund der funktionellen Heterogenität der hämatopoetischen Stammzellen und der Schwierigkeiten bei der Standardisierung der Gewinnungstechnik im Vergleich oft als wenig aussagekräftiger Parameter beurteilt. Die Anzahl mononukleärer Zellen kann hingegen – trotz geringerer Selektivität – besser mit anderen Parametern korreliert werden, da ein Standard für deren Gewinnung bereits etabliert ist ([76] S.853). Auch in den an unserer Untersuchung beteiligten Labors, die sich vorrangig mit Zellkolonien hämatopoetischer Vorläuferzellen befassten, wurde deshalb standardmäßig der Gehalt an mononukleären Zellen anstelle des TNC-Gehalts bestimmt. Dass diese beiden Parameter aber hochsignifikant zusammenhängen, zeigten u. a. Prat et al. ([76] S.853) in ihrer Studie.

Im Allgemeinen korrelieren die Zellzahlen und Zellkonzentrationen im Nabelschnurblut sowohl eng miteinander, als auch mit dem erzielten Probenvolumen. Der am häufigsten bestätigte Zusammenhang besteht zwischen Probenvolumen und TNC-Zahlen ([13], [22], [76], [11], [71] und [94]) sowie zwischen CD34-Zellzahlen und CFU-GM ([13], [11], [71] und [94]). Aber auch der Gehalt an nukleären Zellen lässt auf die Zellzahlen an CD34-positiven Zellen und CFU-GM schließen ([29] und [94]). In unserer Untersuchung korrelierten die Zellkonzentrationen an mononukleären Zellen entsprechend hochsignifikant mit der Konzentration an CD34-positiven Zellen ($p < 0,001$).

Die Qualität einer Nabelschnurblutprobe hängt somit maßgeblich von ihrem Gehalt an nukleären Zellen (TNCs), koloniebildenden Zellen (CFCs) und CD34-positiven Zellen ab. Jeder dieser Parameter bietet Vor- und Nachteile, so ist der TNC-Gehalt einfach zu bestimmen, allerdings relativ ungenau als Prädiktor, die CFC-Assays sind überaus exakt, aber aufwändig, langwierig und kostspielig und der Gehalt an CD34-positiven Zellen kann erst aussagekräftig für Studien herangezogen werden, wenn ein Standard in der Methodik zur Bestimmung der Zellzahlen einen Vergleich zwischen verschiedenen Labors, Forschergruppen und Nabelschnurblutbanken möglich macht.

4.1.2 Geschlecht

Trotz repräsentativer Häufigkeitsverteilung konnte in unserer Untersuchung kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Zellzahlen in Abhängigkeit vom Geschlecht des Neugeborenen festgestellt werden. Auch in der bisher veröffentlichten Literatur lassen sich nur wenige einschlägige Ergebnisse finden. Zwar berichten mehrere Untersuchungen übereinstimmend bei Mädchen eine signifikant erhöhte Zahl von TNCs ([71], [10], [93]), eine

mögliche Erklärung findet sich aber weder in diesen Studien, noch anderweitig in der gegenwärtigen Literatur. M-Reboredo et al. ([70]) widerlegen diese Aussage in ihrer Studie. In den meisten der genannten Arbeiten sowie bei Ballen et al. ([13]), die außerdem signifikant erniedrigte Zahlen von CFU-GM bei Mädchen berichten, wurde kein statistisch signifikanter Unterschied im CD34-Zellgehalt zwischen den Geschlechtern festgestellt; andere Forschergruppen hingegen fanden höhere CD34-positive Zellzahlen bzw. -konzentrationen ([9] S.617, [94] S.243, [29] S.1806) im Nabelschnurblut männlicher Neugeborener. Der Unterschied blieb in zwei dieser Studien ([9] und [29]) auch nach Anpassung an Geburtsgewicht und Geburtsmodus in einer Multivarianzanalyse statistisch signifikant. Das bei Prat et al. berichtete erhöhte Probenvolumen bei Knaben ([76] S.854) ist aber wohl am ehesten auf die Korrelation mit einem erhöhten Geburtsgewicht (auch in unserer Studie signifikant nachzuweisen) zurückzuführen. Die aktuelle Datenlage lässt folglich keinen Rückschluss auf eine Empfehlung zur Einbeziehung, besseren Eignung oder zum Ausschluss von Nabelschnurblutspenden aufgrund des Geschlechts des Neugeborenen zu.

4.1.3 Geburtsmodus

Den Ergebnissen dieser Untersuchung nach hat der Geburtsmodus signifikanten Einfluss auf die Konzentration der mononukleären Zellen im Nabelschnurblut (vgl. Kap. 3.3.2). In Anlehnung an die aktuelle Literatur wurden trotz der ursprünglichen Einteilung in fünf verschiedene Geburtsmodi, primär die vaginalen Entbindungen den operativen Entbindungen per Kaiserschnitt entgegengestellt. Hierbei wiesen die vaginal entbundenen Kinder einen signifikant erhöhten Zellgehalt an mononukleären Zellen auf; bezüglich der CD34-positiven Zellkonzentration konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Da – im Gegensatz zu den meisten bisher veröffentlichten Arbeiten – weder der Geburtsmodus noch das Schwangerschaftsalter (in Abhängigkeit dessen natürlich der Entbindungsmodus variiert) ein Ausschlusskriterium für unsere Studie darstellte, repräsentieren unsere Ergebnisse in etwa die reguläre Häufigkeitsverteilung der Geburtsmodi im Patientinnenkollektiv einer Universitätsklinik. Diese Verteilung weicht zum Teil stark von anderen Untersuchungen mit selektivem Einschluss der Patientinnen nach Geburtsmodus ab; überwiegend wurden dort nur reif geborene Kinder und unkomplizierte Geburten, im Falle von Sectios also auch nur elektive Kaiserschnitte, in die Auswertungen miteinbezogen. Somit sind die Voraussetzungen für eine generelle Vergleichbarkeit nur begrenzt gegeben.

Der wohl eindeutigste Konsens, der zum gegenwärtigen Zeitpunkt besteht, ist das bei Schnittentbindungen festgestellte signifikant erhöhte Volumen der Nabelschnurblutproben. Dies kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Einer der Hauptfaktoren, die zu einem erhöhten Probenvolumen beitragen, ist die Schwerkraft. Grisar et al. beschrieben, dass das

Sammelvolumen allein durch eine Lagerung des Neugeborenen auf dem Bauch der Mutter erhöht werden kann ([37] S.1241). Bei Schnittentbindungen wird das Neugeborene in der Regel höher gelagert als die Plazenta, eine naheliegende Erklärung für das teilweise festgestellte erhöhte Probenvolumen bei Kaiserschnitten (vgl. [50], [64] und [10]). Eine gezielte Nutzung dieses Phänomens zur Erhöhung des Nabelschnurblutprobenvolumens widerspricht unseres Erachtens jedoch dem ärztlichen Leitprinzip *nil nocere*, da davon ausgegangen werden muss, dass dabei dem Neugeborenen willentlich Blutvolumen vorenthalten wird. Auch der bei Yamada et al. beschriebene signifikante Unterschied zwischen vaginal und per Sectio entbundenen Kindern lässt sich analog eher auf das Abnabelungsprozedere zurückführen, das bei Kaiserschnitten eine Abnabelung des an den Beinen hochgehaltenen Neugeborenen innerhalb von fünf Sekunden nach Geburt vorsah, während bei spontan vaginalen Entbindungen die Kinder 20 cm unterhalb des Introitus gelagert und erst nach 30 Sekunden abgenabelt wurden ([117] S.831). Darüber hinaus tragen die – durch manuelle Lösung der Plazenta – bei Schnittentbindungen oft verkürzte Zeit zwischen Geburt des Kindes und Geburt der Plazenta und die dadurch reduzierte Bildung von Blutkoageln zu dem beobachteten Effekt bei ([50] S.508 und [64] S.1175). Die meisten der genannten Studien lassen außer dem erhöhten Volumen keine weiteren signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellpopulationen ([10] S.192, [64] S.1175) oder lediglich eine auf den Volumenunterschied zurückzuführende Erhöhung der absoluten Zellzahlen ([117] S.831) erkennen. Allerdings gibt es auch mehrere Untersuchungen, die einen erhöhten Gehalt an nukleären Zellen auf Seiten der vaginal entbundenen Neugeborenen beschreiben ([9] Table 3, [69] S.691, [107] S.492). Solves et al. stellten keinen signifikanten Unterschied zwischen vaginal oder per Kaiserschnitt entbundenen Kindern fest, allerdings waren bei assistiert vaginalen Geburten die TNCs signifikant erhöht ([93] S.109).

Unsere Ergebnisse werden durch die Studie von Dimitriou et al. ([21] S.383) bestätigt. Auch Nikischin et al. fanden eine statistisch signifikante Leukozytose mit Linksverschiebung in Richtung unreifer Vorläuferzellen im Nabelschnurblut von vakuumextrahierten Neugeborenen und spontan geborenen Kindern gegenüber per Kaiserschnitt entbundenen Säuglingen ([73] S.105). Shlebak et al. beschrieben sowohl vermehrte CFU-GM, als auch ein erhöhtes Produktivitätspotential von sekundären CFU-GM Kolonien ([89] S.1170) bei spontan vaginal entbundenen Kindern.

Lim et al. ([62] S.1146) berichteten einen erhöhten Zellgehalt von nukleären Zellen, Granulozyten, CD34-positiven Zellen und anderen hämatopoetischen Vorläuferzellen bei assistierten Geburten, wozu in diesem Fall primäre und sekundäre Kaiserschnitte, die operativ vaginalen Geburten (Vakuumextraktion und Forcepsextraktion) sowie Entbindungen aus Steißlage gezählt wurden. Diese Beobachtung könnte aber auf der durch das Einschlusskriterium „unkomplizierte Geburt“ wohl teilweise verzerrten Häufigkeitsverteilung der Geburtsmodi der niederländischen Studie beruhen, die mit einem prozentualen Anteil von nur 1,5% elektiven Kaiserschnitten, aber einem Anteil von 14% Vakuumextraktionen wohl außerhalb des

repräsentativen Bereiches liegen dürfte. Das könnte auch erklären, warum diese Korrelation in der Multivarianzanalyse nicht bestätigt werden konnte. Darüber hinaus berichten weitere Untersuchungen den von uns festgestellten, statistisch nicht signifikanten Unterschied zwischen Spontangeburt und Schnittentbindungen für CD34-positive Zellen ([9] Tab. 2 und 5, [117] Tab. 2 und [95] Tab. 2).

Stärkeren Einfluss als der Geburtsmodus nimmt vermutlich die Dauer der verschiedenen Geburtsphasen, was Lim et al. bereits mit einer anderen Studie belegt hatten. Dabei untersuchten sie einen möglichen Zusammenhang zwischen Geburtsmodus bzw. der Stressantwort während der Geburt und der Ausschüttung von Leukozyten und hämatopoetischen Vorläuferzellen im Nabelschnurblut, wobei analog höhere Zellzahlen bei Geburten mit langer Eröffnungs- und Austreibungsphase sowie bei den vaginal operativ assistierten gegenüber den spontan vaginalen Geburten festzustellen waren ([60] S.554).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der bisher veröffentlichten Untersuchungen zu widersprüchlich erscheinen, um die Aussagekraft des Parameters Geburtsmodus auf den Stammzellgehalt im Nabelschnurblut adäquat beurteilen zu können. Einige Indizien weisen aber darauf hin, dass das Abnahmeprozedere, inklusive der Lagerung des Kindes und der zeitliche Ablauf der Entbindungen einen größeren Einfluss darstellen als der Modus an sich. Diese Abläufe könnten, ohne dem Kind oder der Mutter Schaden zuzufügen, so modifiziert werden, dass ein höheres Volumen der Nabelschnurblutproben erzielt werden kann. Ein Ausschluss von spendebereiten Patientinnen sollte aber nicht bezüglich des Geburtsmodus getroffen werden, da trotz des erhöhten Volumens bei Proben von operativ entbundenen Neugeborenen, der bei vaginalen Geburten festgestellte höhere Gehalt an Leukozyten den insgesamt pro Probe enthaltenen Gehalt an nukleären Zellen wohl wieder ausgleicht ([64] S.1175, [7] S.225 und [95] S.212).

4.1.4 Lage des Neugeborenen

Die Häufigkeitsverteilung der Geburtslage in unserer Studie entspricht dem allgemeinen Vorkommen und ist repräsentativ für die Grundgesamtheit. Allerdings wird der Parameter Geburtslage durch die starke Assoziation mit dem Entbindungsmodus in der statistischen Auswertung überlagert. Eine vaginale Geburt aus Beckenendlage ist meist mit einer langen Austreibungsphase sowie mit einer großen Stressbelastung des Feten verbunden. Aufgrund der relativ höheren Komplikationsrate, die bei vaginalen Entbindungen aus Beckenendlage zu beobachten ist, wird heutzutage deshalb die überwiegende Mehrheit der sich bei Geburtstermin in Beckenendlage befindlichen Feten per Kaiserschnitt entbunden. Auch bei Frühgeborenen, in deren Kollektiv eine Beckenendlage häufiger vorkommt, ist der vorrangige Entbindungsmodus die Schnittentbindung. So verzeichneten wir in unserer Untersuchung nur eine vaginale Geburt aus

Beckenendlage, gegenüber 48 per Sectio aus dieser Lage entbundenen Kindern. In der Literatur finden sich keine Hinweise darauf, dass der bei Kaiserschnitten auf den Feten einwirkende Stress ausschlaggebend mit der Lage des Kindes assoziiert wäre. So ergaben sich weder bei den Spontangeburt noch bei den Schnittentbindungen signifikante Ergebnisse bezüglich des Zellgehaltes (vgl. Kap. 3.3.3). Somit lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt der Faktor Geburtslage weder als Ein- oder Ausschlusskriterium, noch als prädiktiver Parameter verwenden.

4.1.5 Geburtsgewicht des Neugeborenen

Der vielfach zitierte positive Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht des Neugeborenen und dem Stammzellgehalt im Nabelschnurblut konnte in unserer Untersuchung nicht eindeutig signifikant bewiesen werden. In der gegenwärtigen Literatur ist das Gewicht der Neugeborenen gemeinsam mit dem Schwangerschaftsalter der meistuntersuchte und als mit am aussagekräftigsten eingeschätzte neonatale Parameter für eine Eignung zur Nabelschnurblutabnahme. Viele Studien belegen übereinstimmend eine direkte positive Korrelation zwischen Geburtsgewicht und dem Probenvolumen ([11], [13], [29], [93], [50], [64], [71] und [89]). Auch über eine Erhöhung der nukleären Zellzahlen bei schwereren Kindern scheint weitestgehend Konsens zu herrschen. In den meisten Fällen scheint dies jedoch eher mit dem vermehrten Sammelvolumen assoziiert zu sein, also eine reine Erhöhung der absoluten Zellzahlen darzustellen ([13] S.9, [64] S.1175). In anderen Studien bleibt die Vermehrung zwar in der Multivarianzanalyse signifikant ([69] S.691), eine direkt vermehrte Zellkonzentration konnte für nukleäre Zellen allerdings nicht festgestellt werden. Hiatt et al. demonstrierten im Gegensatz dazu, trotz durchschnittlich verringerter absoluter Zellzahlen pro Nabelschnurblutprobe, eine vergleichbare Vorläuferzellkonzentration von SGA- und AGA-Kindern, so dass die überwiegende Anzahl der Proben der kleineren Kinder durchaus für eine Transplantation verwendbar gewesen wäre ([44] S.589).

Analog dürfte bei der mehrfach postulierten Erhöhung der CD34-positiven Zellen im Nabelschnurblut von Kindern mit größerem Geburtsgewicht ebenfalls der Volumeneffekt eine große Rolle spielen ([29] Tab. 4, [64] S.1175). Aroviita et al. beschrieben einen direkt positiven Zusammenhang sowohl zwischen dem absoluten als auch dem relativen Geburtsgewicht und der CD34-positiven Zellkonzentration im Nabelschnurblut. Allerdings wurden hierbei nur Neugeborene mit Extremwerten (unterhalb der 5. und oberhalb der 95. Perzentile) miteinander verglichen ([8] S. 1325). Nakagawa et al. konnten diese Beobachtung auch mit einem repräsentativeren Patientenkollektiv bestätigen ([71] S.264).

Die Häufigkeitsverteilung des Geburtsgewichtes der in unsere Untersuchung aufgenommenen Neugeborenen entspricht durchaus der Grundgesamtheit und auch die Einteilung zur Anpassung des Gewichtes an das Schwangerschaftsalter anhand standardisierter Perzentilenkurven – mit

8,6% der Kinder unterhalb der zehnten und 9,1% über der 90. Perzentile – ist eindeutig als repräsentativ zu bezeichnen. Der Mittelwert ist mit ähnlich angelegten Studien vergleichbar ([64] S. 1175, [76] S.853), liegt aber niedriger als in den Studien, in denen Frühgeburtlichkeit ein Ausschlusskriterium darstellte. Trotz repräsentativer Daten konnte der vielfach beschriebene Zusammenhang zwischen Gewicht und Zellzahlgehalt in unserer Untersuchung nur in einzelnen Teilbereichen nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.3.4). Das könnte an der Tatsache liegen, dass das Geburtsgewicht mit diversen anderen, möglicherweise verzerrenden Faktoren eng assoziiert ist. Auch in vorliegender Arbeit besteht eine starke Korrelation mit dem Gestationsalter ($p < 0,001$), des Weiteren sind Knaben in der Regel schwerer als Mädchen ($p = 0,004$) und Kinder rauchender Mütter sowie per Kaiserschnitt entbundene Kinder haben – auch, aber nicht nur aufgrund des Zusammenhangs mit dem Schwangerschaftsalter – ein signifikant erniedrigtes Geburtsgewicht ($p = 0,037$). LGA-Kinder werden hingegen überdurchschnittlich häufig per Sectio entbunden ($p = 0,003$) und die aus Beckenendlage geborenen Kinder sind im Allgemeinen mikrosom ($p = 0,003$). Diese vielen, sich gegenseitig beeinflussenden Parameter gilt es, adäquat in die Studien mit einzubeziehen und mit entsprechenden multivariaten Verfahren zu untersuchen, was in einigen der zitierten Arbeiten leider unterblieb. In unserer Studie zeigte sich das Geburtsgewicht in der multiplen Regressionsanalyse nicht als signifikanter Einflussfaktor ($p = 0,133$).

Auch Donaldson et al. deuteten in ihrer Veröffentlichung an, dass das gemeinhin mit dem Geburtsgewicht assoziierte Gewicht der Plazenta, obgleich schwieriger zu eruieren und dann notwendigerweise mit einer Nabelschnurblutabnahme „ex utero“ verbunden, den mindestens ebenbürtigen, möglicherweise sogar aussagekräftigeren Parameter darstellt ([22] S.131). Ähnliche Aussagen treffen Solves et al. ([93] S.111), Mancinelli et al. ([64] S.1175) und Askari et al. ([10] Table 3). Ballen et al. veröffentlichten 2001 die wohl bisher prägnantesten Ergebnisse in Bezug auf das Geburtsgewicht ([13]) und stellten eine hochsignifikante Assoziation mit dem Probenvolumen, der Zellzahl von TNCs und CD34-positiven Zellen, als auch der Anzahl von CFU-GM fest ($p < 0,001$). Dem zufolge ergab sich in diesem speziellen Patientenkollektiv in der Multivarianzanalyse eine Zunahme des Volumens um 6%, eine Zunahme der TNC um 11%, der CD34-positiven Zellen um 28% und der CFU-GM um 22% pro 500 g Zunahme im Geburtsgewicht.

Insofern wird das Geburtsgewicht wohl zu Recht als einer der primären prädiktiven Parameter für den Zellzahlgehalt im Nabelschnurblut betrachtet, allerdings gilt es die zahlreichen weiteren Einfluss nehmenden Faktoren zu berücksichtigen. Bei einer Nabelschnurblutspende sollte immer die Gesamtheit der neonatalen, maternalen und perinatalen Parameter erwogen werden, ein Ein- oder Ausschluss rein auf Basis des Geburtsgewichtes, mit cut-off Levels, wie von manchen Autoren empfohlen ([93] S.110), kann unserer Meinung nach, aufgrund der dafür nicht ausreichenden Datenlage, nicht empfohlen werden.

4.1.6 Schwangerschaftsalter

Wie bereits mehrfach veröffentlicht, konnte auch unsere Untersuchung die positive Korrelation von mononukleären Zellen bei zunehmendem Schwangerschaftsalter sowie eine Abnahme der CD34-positiven Zellen gegen Ende der Schwangerschaft bestätigen. Mit einer Beobachtungszahl von 1.067 Schwangeren und einer mit anderen Studien vergleichbaren Häufigkeitsverteilung kann man trotz des leicht erniedrigten Mittelwertes von einer repräsentativen Stichprobe ausgehen. Der erniedrigte Mittelwert ergibt sich aus der Tatsache, dass – im Vergleich zu den meisten anderen Arbeiten – Frühgeburtlichkeit in unserer Studie kein Ausschlusskriterium darstellte.

Übereinstimmend beschrieben sowohl Jones et al. ([50] Tab. III) als auch Askari et al. ([10] Tab. 3) ein gesteigertes Probenvolumen bei nach der 40. Schwangerschaftswoche geborenen Kindern. Dieses Ergebnis blieb jedoch in beiden Studien in der Multivarianzanalyse nicht statistisch signifikant, so dass von einer Verzerrung durch den mit dem Schwangerschaftsalter stark korrelierenden Parameter Geburtsgewicht ausgegangen werden kann. Auch in unserer Untersuchung zeigte sich in der multivariaten Analyse eine Überlagerung durch die Faktoren absolutes Geburtsgewicht und Nikotinabusus.

Surbek et al. beobachteten in ihrer Untersuchung ausschließlich Frühgeborene und zeigten ebenso im Laufe der Schwangerschaft zunehmende Volumina der Proben, die zu einer Abnahme des Gehaltes von CD34-positiven Zellen pro Milliliter bei gleich bleibenden absoluten Zellzahlen pro Probe führten ([98] S.819). Dies bestätigten Nakagawa et al. ([71] Tab. 3 und 4) analog für zwischen der 37. und 41. Schwangerschaftswoche geborene Säuglinge. Auch Shields et al. beschrieben, dass der Gehalt an CD34-positiven Zellen während der Fetalperiode höher ist als nach der Geburt und dass das Nabelschnurblut Frühgeborener um ein Vielfaches reicher an koloniebildenden Vorläuferzellen ist ([85] S.933). Außerdem gibt es in Abhängigkeit vom Schwangerschaftsalter Veränderungen im Gehalt der zirkulierenden Vorläuferzellen mit den höchsten Werten im zweiten Trimester und fortlaufender Abnahme während des weiteren Schwangerschaftsverlaufes ([85] S.933, s. auch [21] S. 384 und [13] S.12).

Interessant ist die Studie von Aroviita et al., die bei während des Schwangerschaftsverlaufes konstant bleibender CD34-positiven Zellkonzentration eine Zunahme der nukleären Zellen beobachten konnten ([8] S. 1325). Dies erklärt auch den in mehreren Untersuchungen veröffentlichten ([116] S.1340, [106] S.635, [92] S.302) abnehmenden prozentualen Anteil der CD34-positiven Zellpopulation an nukleären Zellen bzw. mononukleären Zellen ([21] S.383) während der Schwangerschaft.

Mancinelli et al. hingegen beobachteten eine statistisch signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils von CD34-positiven Zellen bei nach der 39. Woche geborenen Kindern. Diese Abhängigkeit des Zellgehalts vom Schwangerschaftsalter soll sich durch die Assoziation von Schwangerschaftsalter und Alterungsvorgängen der Plazenta ergeben, durch die der Fetus fortschreitenden Hypoxien ausgesetzt wird, welche in diversen Kompensationsmechanismen,

unter anderem einer Erhöhung des zirkulierenden Blutvolumens und der Ausschüttung von hämatopoetischen Vorläuferzellen, resultiert ([64] S.1175).

Eine signifikante positive Korrelation mit zunehmendem Schwangerschaftsalter wird hingegen übereinstimmend für den Gehalt an nukleären Zellen berichtet ([10] S.190, [22] S.130, [98] Tab. 1, [13] Tab. 3b). Diese Studien beschränkten allerdings ihre Beobachtungen auf die absoluten Zellzahlen pro Probe, so dass auch hier eine eventuelle Verzerrung durch das bei nach der 40. Schwangerschaftswoche festgestellte, erhöhte Probenvolumen vorstellbar wäre. Nakagawa et al. untersuchten jedoch die Zellkonzentration pro Milliliter und konnten auch hierfür signifikante Anstiege mit dem Schwangerschaftsalter verzeichnen ([71] Tab. 3 und 4). Solves et al. untersuchten im Umkehrschluss verschiedene Charakteristika bei Blutproben mit einem niedrigen Gehalt an TNCs gegenüber Proben mit hohen Zellzahlen und fanden das durchschnittliche Schwangerschaftsalter für letztgenannte Gruppe signifikant erhöht ([93] Tab. 2).

Eine aktuelle Untersuchung von Dimitriou et al. zeigte zwar niedrigere absolute mononukleäre Zellzahlen bei Frühgeborenen im Gegensatz zu Reifgeborenen, was aber in diesem Fall sehr wahrscheinlich auf das niedrigere Probenvolumen zurückzuführen ist, da die Konzentration von mononukleären Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut in beiden Gruppen ähnlich verteilt war ([21] S. 384).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Konzentration von CD34-positiven Zellen, überwiegend aufgrund des „Verdünnungseffekts“ durch das zunehmende Probenvolumen mit zunehmendem Schwangerschaftsalter bzw. zunehmendem Geburtsgewicht, abnimmt und sich der prozentuale Anteil CD34-positiver Zellen aufgrund der ansteigenden Zellzahlen von nukleären Zellen verringert; der absolute Gehalt CD34-positiver Zellen pro Probe bleibt aber konstant (vgl. Solves et al. [92] S.302). Laut Ballen et al. bringt jede zusätzliche Schwangerschaftswoche eine Volumenzunahme von 3%, eine elfprozentige Abnahme von CFU-GM und 9% weniger CD34-positive Zellen pro Probe. Somit lässt sich keine generelle Empfehlung zur Abnahme von Nabelschnurblut bezüglich des Schwangerschaftsalters stellen.

4.1.7 Apgar-Score des Neugeborenen

Wir stellten in dieser Studie erhöhte Zellkonzentrationen von sowohl mononukleären Zellen als auch CD34-positiven Zellen bei Kindern mit Apgar-Werten < 8 fest, diese zeigten sich jedoch nur für letztgenannte Zellpopulation statistisch signifikant (vgl. Kap. 3.3.6).

Der Apgar-Score des Neugeborenen ist ein für die klinische Praxis gebräuchlicher Parameter. Für wissenschaftliche Auswertungen eignet er sich eher weniger. Dies liegt u. a. an seiner ordinalen Skalierung, die – weil leider häufig missachtet und als intervallskaliert fehlinterpretiert – eine statistische Auswertung dann stark verzerren kann. Außerdem limitiert die ernstzunehmende Subjektivität der Beurteilung einen Vergleich zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen enorm.

Deshalb wurde dieser Parameter bisher auch erst in wenige Studien als Einflussfaktor miteinbezogen. Dabei stellten Lim et al. höhere Zahlen von nukleären Zellen, Granulozyten und koloniebildenden Vorläuferzellen bei Kindern mit niedrigen 1-Minuten Apgar-Scores fest ([62] Tab. IV). Hingegen beschrieben Solves et al. einen signifikant höheren CFU-Gehalt für Neugeborene mit Apgar-Werten ≥ 7 ([94] Tab. 5). Beide Aussagen konnten in unserer Untersuchung nicht in dieser Form bestätigt werden.

Es muss allerdings angeführt werden, dass die verschiedenen Apgar-Scores nicht nur signifikant untereinander, sondern auch mit mehreren der anderen Variablen korrelieren. So präsentieren sich Neugeborene mit höherem Geburtsgewicht, fortgeschrittenerem Schwangerschaftsalter und alkalischeren pH-Werten durchgehend mit besseren Apgar-Werten. Auch in unserer Untersuchung verliert der Parameter Apgar-Score aufgrund der Überlagerung durch den postpartalen pH-Wert in der multivariaten Analyse seine Signifikanz. Weiter wiesen weibliche Neugeborene und aus Schädellage geborene Kinder signifikant bessere 5-Minuten- und 10-Minuten-Scores auf. Die Assoziation mit verschiedenen Entbindungsmodi, wie sie Virginia Apgar in ihrer Originalveröffentlichung von 1953 ([5]) und in der Nachfolgearbeit von 1958 ([6]) präsentiert, ist heutzutage aufgrund der massiven Fortschritte und Veränderungen in der geburtshilflichen klinischen Praxis, durch die die Risiken und Belastungen für Mutter und Kind gerade bei Schnittentbindungen völlig neu zu bewerten sind, nicht mehr in vergleichbarer Form gegeben.

Trotz dieser zum Teil auch gegenläufigen Korrelationen sollte eine Nabelschnurblutentnahme bei Neugeborenen mit Apgar-Scores ≤ 8 im Hinblick auf den zu erwartenden Zellzahlgehalt besonders in Betracht gezogen werden.

4.1.8 Arterieller Nabelschnur-pH-Wert

Übereinstimmend mit der bisher veröffentlichten Literatur stellten wir eine Erhöhung der Zellkonzentrationen bei Neugeborenen mit niedrigeren pH-Werten fest (vgl. Kap. 3.3.7).

Die Messung der Nabelschnurblutgaswerte und der Säure-Basen-Status ist nach den Richtlinien des Committee on Obstetric Practice die beste Methode zur Bestimmung des metabolischen Zustands des Feten zum Zeitpunkt der Geburt ([1] S.1319). In der Regel lassen sich bei Neugeborenen unmittelbar nach der Geburt tendenziell erniedrigte pH-Werte messen, dies entspricht bis zu einem gewissen Grad einer als physiologisch zu wertenden Reaktion. Stark erniedrigte pH-Werte können jedoch auf eine durch Asphyxie, Durchblutungsstörungen oder anderweitig verursachte Stressreaktion hinweisen.

Der arterielle Nabelschnur-pH-Wert in unserer Studie lag im Durchschnitt im repräsentativen Kollektiv und ist mit anderen Untersuchungen vergleichbar. Sowohl die Konzentration der mononukleären Zellen als auch die der CD34-positiven Zellen zeigte sich bei Kindern mit einem

pH-Wert von unter 7,2 signifikant erhöht. Auch in der multivariaten Analyse blieb der Nabelschnur-pH-Wert der signifikanteste Einflussfaktor ($p < 0,001$ für mnc, $p = 0,002$ für CD34⁺). Dieses Ergebnis bestätigten Shlebak et al. analog für Kinder mit pH-Werten $\leq 7,1$ ([89] S.1169) und Solves et al. grenzwertig ($p = 0,055$) für die absoluten Zellzahlen an TNCs ([94] Table 5). Auch die Gruppe um Aufderhaar stellte zunehmende Zellzahlen von nukleären Zellen und CD34-positiven Zellen fest ([11] S.319), bei Lim et al. hingegen zeigte sich in der Multivarianzanalyse eine Überlagerung des in der bivariaten Analyse zunächst signifikanten Ergebnisses durch den venösen pH-Wert ([62] S.1148). Dieses Phänomen wird dadurch erklärt, dass sich der arterielle pH-Wert erst während der letzten 15 Minuten vor der Geburt stärker verändere. Diese Zeitspanne sei möglicherweise zu kurz, um eine Stammzellmobilisierung zu verursachen ([62] S.1149). Die Vorgänge, die dieser Stammzellmobilisierung zugrunde liegen, sind allerdings mehr als unzureichend geklärt. Ein möglicher Erklärungsansatz vermutet eine Mobilisation von kernhaltigen Erythroblasten und Vorläuferzellen in den fetalen Blutkreislauf durch erhöhte Produktion von Cytokinen ([11] S.321). G-CSF und GM-CSF sind als stammzellmobilisierende Wachstumsfaktoren bereits länger bekannt und werden erfolgreich klinisch eingesetzt. Die Vielzahl der assoziierten Interleukine und anderer Botenstoffe, ihre genaue Rolle und ihr Zusammenspiel gilt es noch genauer zu erforschen.

Alles in allem präsentiert sich der arterielle Nabelschnur-pH-Wert jedoch als aussagekräftiger Parameter, der routinemäßig im Geburtsverlauf bestimmt wird und deshalb leicht als Einschlusskriterium zur Nabelschnurblutspende herangezogen werden kann. Neugeborene mit einem arteriellen Nabelschnur-pH-Wert von $\leq 7,2$ weisen höhere Stammzellzahlen auf als Kinder mit alkalischerem pH-Wert und scheinen deshalb für eine Nabelschnurblutprobenentnahme nach der gegenwärtigen Datenlage besonders geeignet.

4.1.9 pH-Wert der Mikroblutuntersuchung

In Anlehnung an den arteriellen Nabelschnur-pH-Wert, mit dem der pH-Wert der Mikroblutuntersuchung auch eng positiv korreliert, zeigte sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen den Zellkonzentrationen an mononukleären sowie CD34-positiven Zellen. Der Mittelwert lag etwas oberhalb des Wertes für den Nabelschnur-pH-Wert, was aufgrund der Gewinnung von kapillärem, sprich arteriovenösem Mischblut bei der Mikroblutuntersuchung nicht unbedingt so zu erwarten war (vgl. Kap. 3.3.8). Die Streuung war vergleichbar mit dem bei Saling beschriebenen Kollektiv; Saling erklärt diese durch die Labilität der physiologischen Abläufe beim Feten und dessen geringerer Empfindlichkeit gegenüber Störungen. Mit diesen Eigenschaften könne sich der Fet den Belastungen während der Geburt besser anpassen, gleichzeitig führten solche Eigenschaften aber naturgemäß auch zu einer größeren Streuung der Normalbereiche ([83] S.287).

Interessant ist, dass trotz des im Vergleich mit dem Nabelschnur-pH-Wert alkalischeren Mittelwertes die Zellkonzentrationen in der Gruppe der Kinder mit durchgeführter Mikroblutuntersuchung durchwegs höher liegen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine eventuelle Assoziation von längerer Austreibungsphase und der Durchführung einer MBU. Lim et al. zeigten in ihrer Untersuchung eine Erhöhung der Zellzahlen bei stressassoziierten Geburten und bei längerer Geburtsdauer ([60] S.556). Da dieser Parameter in unserer Arbeit nicht untersucht wurde, kann diese Annahme nicht statistisch verifiziert werden. Trotzdem sollte man anhand der signifikant erhöhten Zellkonzentrationen auch oder gerade bei Kindern, bei denen eine Mikroblutuntersuchung während des Geburtsverlaufes indiziert war, eine Nabelschnurblutabnahme in Betracht ziehen.

4.1.10 Maternaler Nikotinabusus

Nikotinabusus der Mutter während der Schwangerschaft hatte unseren Ergebnissen nach einen signifikanten negativen Einfluss auf die Konzentrationen von mononukleären und CD34-positiven Zellen (vgl. Kap. 3.3.9) im Nabelschnurblut.

Die schädigenden Auswirkungen des Rauchens während der Schwangerschaft werden ausführlich in der gynäkologischen und geburtshilflichen Fachliteratur beschrieben und belegt (vgl. [82] und [88]). Verschiedene im Zigarettenrauch enthaltene Stoffe wie Cadmium, Benzpyren oder andere noch nicht genau erforschte Substanzen beeinträchtigen die Proliferation und Differenzierung von Trophoblasten sowie die Ausbildung der für die optimale Sauerstoffversorgung des Feten notwendigen placentaren Gefäßstruktur ([82] S.274). Weiter lässt sich vermuten, dass diese Vorgänge eine Anpassung des Feten an die veränderte Stoffwechsellage auslösen. Tatsächlich finden sich im Nabelschnurblut von Kindern rauchender Mütter niedrigere Zellzahlen von Neutrophilen und Retikulozyten, jedoch ähnliche Hämoglobinwerte sowie Thrombozytenzahlen im Vergleich zu Kindern von Nichtraucherinnen ([66] S.451).

13% der Teilnehmerinnen an unserer Studie gaben bei der Vorstellung zur Geburt bzw. direkt bei der Geburt an, Raucherinnen zu sein, was sich in etwa mit den Angaben anderer Untersuchungen ([13] S.12) deckt. Dabei muss aber nochmals auf die Problematik der Tendenz zur Verharmlosung bei Selbstauskunft der Patientinnen zum Rauchverhalten hingewiesen werden. Außerdem wurden keine Angaben zu passiver Belastung durch Tabakrauch, zu einer eventuellen Einstellung des Rauchens während der Schwangerschaft sowie zur Anzahl der tatsächlich gerauchten Zigaretten erhoben. Somit kann die Aussage nur richtungsweisend im Sinne einer qualitativen Aussage sein, nicht aber exakt quantitativ. Neugeborene rauchender Mütter wiesen signifikant erniedrigte mononukleäre und CD34-positive Zellzahlen auf. Zweiteres bestätigt die Studie von Ballen et al. ([13] Tab. 3c).

Raucherinnen haben in der Regel auch kleinere Kinder und es treten häufiger

Geburtskomplikationen (vgl. [87] S.84) auf. Die Assoziation mit niedrigerem Geburtsgewicht und Multiparität (letzteres Kriterium wurde in unserer Studie nicht untersucht, aber bei Ballen et al. [13] postuliert) könnte erklären, warum der Zusammenhang Nikotinabusus und erniedrigte Zellzahlen bei der amerikanischen Studie – im Gegensatz zu unserer Arbeit – in der Multivarianzanalyse nicht signifikant blieb.

Shiono et al. berichteten eine eindeutig erhöhte Frühgeburtlichkeit bei rauchenden Müttern, die auch nach Anpassung an dreizehn verschiedene Verzerrungsfaktoren, darunter Alter der Mutter, Alkoholkonsum während der Schwangerschaft etc., statistisch signifikant blieb ([87] S.84). Allerdings waren die Ergebnisse dieser Erhebung besonders für Frühgeburten vor der 34. Schwangerschaftswoche signifikant, so dass dieses wenn auch interessante Ergebnis keinen relevanten Einfluss beim Großteil der veröffentlichten Arbeiten gehabt haben wird, bei denen Frühgeburtlichkeit doch überwiegend ein Ausschlusskriterium darstellte. Auch in unserer Untersuchung gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Rauchen und Frühgeburtlichkeit.

Auch den von Mercelina-Roumans et al. beschriebenen stärkeren Einfluss des Rauchens auf männliche Neugeborene ([65] S.372) konnten wir nicht analog bestätigen. Im Gegenteil, im Vergleich der Kinder von Raucherinnen gegen Kinder von Nichtraucherinnen wiesen die weiblichen Neugeborenen weitaus signifikantere Unterschiede im Zellzahlgehalt auf als die männlichen. Das könnte unsere Vermutung unterstützen, dass zwar nicht der absolute Zellgehalt, wohl aber die verschiedenen Zellpopulationen bei Neugeborenen unterschiedlichen Geschlechtes teilweise stark differieren. Ob und inwieweit diese Verteilung bzw. Umverteilung mit unterschiedlichen Kompensationsmechanismen und Reaktionen im Sinne einer Stressantwort bei neugeborenen Knaben und Mädchen zusammenhängt, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend geklärt.

4.1.11 Maternale Cortisonmedikation

Eine Verabreichung von Cortison während der Schwangerschaft zeigt unseren Ergebnissen nach keinen signifikanten Einfluss auf die Stammzellzahlen im Nabelschnurblut. (vgl. Kap. 3.3.10).

In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass der Fet ab der 18. bis 20. Schwangerschaftswoche mit erheblichen hormonellen und zirkulatorischen Veränderungen auf verschiedene Formen von Stress reagiert ([91] S.162). Die hormonelle Stressantwort betrifft unter anderem eine Erhöhung der Katecholamin-, β -Endorphin- und Glukokortikoidspiegel. Eine Vielzahl dieser Hormone, aber auch anderer Cytokine und Wachstumsfaktoren, wie z.B. stem cell factor (SCF), Thrombopoietin und Leukenkephalin spielen eine Rolle in der Anpassungsreaktion des Knochenmarks an akute oder längerfristige Stresssituationen und können die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen anregen. Allein ist ihre Fähigkeit dazu entweder kapazitativ oder

zeitlich limitiert; erst im Zusammenspiel mehrerer Faktoren bildet sich ein signifikanter kostimulatorischer Effekt aus. Die genauen Vorgänge sind bisher nicht im Detail geklärt, Grisaru et al. scheinen aber zumindest den Grundstamm der ablaufenden Kaskade entschlüsselt zu haben ([38]): Die durch die freigesetzten Glukokortikoide induzierte Granulozytose wird von einer Erhöhung von proinflammatorischen und hämatopoese-assoziierten Cytokinen begleitet, die unter anderem von Acetylcholin und Acetylcholinesterase (AChE) reguliert wird (vgl. auch [56] S.117). Das Acetylcholinesterase-Gen enthält ein funktionelles Glucocorticoid-„response element“ und mehrere mögliche Bindungsstellen für hämatopoetische Transkriptionsfaktoren. Durch alternatives Splicing entstehen drei Acetylcholinesterase-Varianten, darunter die so genannte „readthrough“-AChE, welche im Rahmen der Stressantwort überexprimiert und anschließend C-terminal gespalten wird. Das abgespaltene, aus 26 Aminosäuren bestehende Peptid ARP ist als hämatopoetischer Wachstumsfaktor stärker wirksam als Cortisol und SCF und fördert eine Proliferation von CD34-positiven Vorläuferzellen auch nachdem die Glukokortikoid-Plasmaspiegel bereits wieder abgesunken sind.

Wie lange diese Effekte darüber hinaus anhalten und sich bei Blutuntersuchungen zum Zeitpunkt der Geburt bemerkbar machen, ist gegenwärtig nicht bekannt. Auch die Frage, ob extern zugeführte Cortisonprodukte eine ähnliche Kaskade nach sich ziehen können, bleibt weiter offen. In unserer Untersuchung konnte kein direkter Zusammenhang zwischen einer maternalen Cortisonmedikation und der Stammzellkonzentration im Nabelschnurblut nachgewiesen werden. Allerdings zog das Studienkonzept einige mögliche Konsequenzen nach sich, die zu einer Verzerrung geführt haben könnten und so einen Fehler zweiter Art in diesem Fall durchaus wahrscheinlich machen. Zum einen wurden die Patientinnen rein aufgrund des Kriteriums Cortisonmedikation ja/nein gruppiert, das genaue Präparat bzw. die Indikation wurde verzeichnet, nicht jedoch der Zeitraum zwischen Verabreichung und Geburt des Kindes. Dadurch konnte der Anteil der Patientinnen, die im Laufe ihrer Schwangerschaft, sei es aufgrund prophylaktischer Maßnahmen zur Förderung der Lungenreife oder aufgrund einer mütterlichen Indikation Cortison erhielten, ihr Kind aber noch über einen ausreichend langen Zeitraum austragen konnten, so dass die Auswirkungen im fetalen Kreislauf nicht mehr messbar waren, nicht gesondert betrachtet werden. Dies mag eine Verzerrung in unserem Datenkontingent nach sich gezogen haben, die zu einer Angleichung der Mittelwerte in den beiden untersuchten Gruppen führte. Auch ist nicht sicher, ob die zur Therapie oder Prophylaxe applizierte Dosis ausreicht, um eine messbare Veränderung im fetalen Kreislauf zum Zeitpunkt der Geburt nachzuweisen. Obwohl Gitau et al. in ihrer Untersuchung eine Korrelation zwischen fetalen und maternalen Baseline-Cortisonspiegeln aufzeigten, was einen Cortisontransfer über die Plazenta vermuten lässt, wird die Gesamtkonzentration durch den biochemischen Abbau mittels 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 bei der Plazentapassage um 80 bis 90% ([30] S.107) vermindert. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die ohnehin kaum in den maternalen Kreislauf

transportierten inhalierten Kortikosteroide und eventuell auch die i.m. applizierten Präparate wie Celestan in ihrer Dosis nicht ausreichen, um eine Stressreaktion des Feten mit Einbeziehung des Knochenmarks und oben beschriebene assoziierte Vorgänge auszulösen. In der Literatur finden sich keine Studien, die diesen Tatbestand untersucht haben.

Um die exakten Auswirkungen einer Cortisonmedikation der Mutter auf den Feten zu klären, bedarf es also noch weitergehender Untersuchungen. Allerdings kann aus unseren Ergebnissen geschlossen werden, dass eine Applikation von Kortikosteroiden während der Schwangerschaft auf keinen Fall ein Ausschlusskriterium für eine Nabelschnurblutspende darstellen sollte.

4.1.12 Intervall bis zur Verarbeitung der Blutprobe

Unsere Ergebnisse zeigten einen bisher in dieser Form nicht veröffentlichten signifikanten Anstieg der Zellkonzentrationen mit zunehmender Lagerungsdauer bis zur Verarbeitung der Nabelschnurblutproben (vgl. Kap. 3.3.11).

Die Zeit bis zur Verarbeitung der Blutprobe ist ein bisher wenig untersuchter Parameter. Genau genommen wurden in den meisten der veröffentlichten Arbeiten die Blutproben, die ein bestimmtes, wenn auch variierendes, Zeitintervall überschritten hatten, gar nicht verarbeitet oder zumindest nicht in die Auswertung miteinbezogen. So untersuchten Wyrsh et al. ([116]) und Dimitriou et al. ([21]) ihre Proben innerhalb von 12 Stunden, Nakagawa et al. ([71]) und M-Reboredo et al. ([70]) innerhalb 24 Stunden und Solves et al. ([94]) sowie Aroviita et al. ([7]) legten den Verarbeitungszeitraum bei bis zu 48 Stunden fest. Bedauerlicherweise sind diese Studien so unterschiedlich konzipiert, dass ein Vergleich der Zellzahlen miteinander nicht möglich ist.

Da die Untersuchung des Verarbeitungsintervalls nicht ein primäres Ziel dieser Arbeitsgruppen war, äußern sich nur Nakagawa et al., die höhere Zahlen an CD34-positiven Zellen bei kürzerem Zeitintervall feststellen konnten ([71] S.264), und Aroviita et al. zu diesem Sachverhalt. Letztere konnten zwar vermehrt CFU-GM in der Gruppe der innerhalb von 8 Stunden verarbeiteten Proben feststellen, die Zahlen an CFU-GEMM und CFU-TOT unterschieden sich jedoch nicht signifikant von der Gruppe der zwischen 8 und 25 Stunden untersuchten Proben ([7] S.225). Shlebak et al., stellten eine rapide Abnahme von CFU-GM Zahlen bei Proben, die länger als neun Stunden gelagert wurden, fest ([90] S.133).

Unsere hochsignifikanten Ergebnisse belegen eine positive Korrelation zwischen Verarbeitungsintervall und der Zellkonzentration sowohl mononukleärer Zellen als auch CD34-positiver Zellen. Eine mögliche Erklärung für das in unserer Untersuchung beschriebene Phänomen lieferten Dukes et al. bereits 2004: Sie berichteten ähnlich unseren Ergebnissen eine Zunahme der Ausbeute bei der Zellzahlbestimmung der fetalen Zellen im maternalen Blut nach Lagerung der Blutprobe über Nacht. Dies führten sie auf Veränderungen in der Zelldichte zurück,

welche zur Folge habe, dass sich sowohl ein größerer Prozentsatz an fetalen Zielzellen, aber auch eine größere Zahl an unerwünschten Zellen, wie z.B. Erythrozyten in der mononukleären Zellschicht ansammle. Ob unsere Beobachtung ansteigender Zellzahlen bei zeitverzögerter Verarbeitung in ähnlicher Weise lediglich auf einer Verschiebung der Messwerte beruht oder tatsächlich auf eine erhöhte Konzentration an Zellen zurückzuführen ist, muss in weiterführenden Untersuchungen genauer geklärt werden. Diesen Ergebnissen nach sollten aber keinesfalls Blutproben aufgrund eines zu langen Zeitraums seit Blutabnahme grundsätzlich von der weiteren Verarbeitung ausgeschlossen werden. Unsere Nabelschnurblutproben waren trotz verzögertem Verarbeitungsintervall aufgrund des ansteigenden Stammzellgehaltes prinzipiell für Transplantationen nutzbar, obwohl mit zunehmender Lagerungsdauer der Proben auch limitierende Faktoren, wie hygienische und infektiologische Aspekte in höherem Maße zu berücksichtigen sind.

4.2 Methodenkritik und Anregung weiterführender Untersuchungen

Wie bei allen wissenschaftlichen Untersuchungen gab es auch in vorliegender Studie Aspekte, die im Laufe der wissenschaftlichen Arbeit verbesserungswürdig erschienen oder im Vergleich mit anderen ähnlich angelegten Untersuchungen unterblieben waren. Diese Punkte sollen im Folgenden erläutert und Ursachen, wo möglich, aufgezeigt werden.

4.2.1 Probleme bei Datenerhebung, Dokumentation und Probengewinnung

Bezüglich Datenerhebung und Dokumentation der erhobenen Parameter besteht, wie bereits beschrieben, kein Anspruch auf Vollständigkeit. Bei einigen Variablen ergaben sich hohe Fallzahlen fehlender Angaben (z.B. bei der Eruierung des Rauchverhaltens der Mutter) oder ernstzunehmende Zweifel an der Möglichkeit einer lückenlosen und wissenschaftlich exakten Erhebung. Letzteres trifft vor allem auf die Verabreichung von Cortisonpräparaten während der Schwangerschaft zu. Diese erfolgte in nicht wenigen Fällen zu einem weit früheren Zeitpunkt in der Schwangerschaft und wurde zum Zeitpunkt der Geburt von der Patientin nicht mehr berichtet. Gerade bei Verabreichung der Cortisonpräparate in externen, dem Klinikum Rechts der Isar nicht angeschlossenen Krankenhäusern, war eine Erhebung also nur dann möglich, wenn zum Zeitpunkt der Geburt die erforderlichen Unterlagen (Arztbriefe, Patientenakten etc.) bereits im Haus vorlagen.

Darüber hinaus hätte eine Erfassung weiterer Faktoren, z.B. der Parität, des venösen Nabelschnur-pH-Werts, des Zeitpunkts des Blasensprungs, der Geburtsdauer insgesamt sowie der Dauer der einzelnen Phasen der Geburt den interessanten Vergleich mit bereits zu diesen Thematiken veröffentlichten Studien ermöglicht. Damit wäre aber gerade bei komplizierten

Geburtsverläufen die lückenlose Dokumentation massiv erschwert worden, was eventuell zu einem nicht verhältnismäßigen Ausschluss überwiegend dieser Geburten geführt hätte. Auch die statistische Aussagekraft wäre durch eine Aufnahme zu vieler unterschiedlicher Parameter und dann möglicherweise nur unvollständiger Dokumentation stark reduziert worden.

Bei der Probengewinnung ergaben sich nur geringfügige Probleme. Die Rekrutierungsraten verbesserten sich im Lauf der Studie zunehmend und auch die Probenvolumina stabilisierten sich nach anfänglichen Abnahmeschwierigkeiten. Dazu trug auch die „STEMMAT-Lotterie“, ein Belohnungssystem für die Hebammen des Kreißsaals bei, das die Motivation zur Nabelschnurblutabnahme bei möglichst allen Entbindungen förderte. Trotzdem ist ein eventueller Bias durch den „willkürlichen“ Ein- oder Ausschluss von Neugeborenen durch die Geburtshelfer nicht vollständig auszuschließen. Auch wurde der exakte Zeitraum zwischen Geburt und Abnabelung nicht definiert und dokumentiert. Diese Information ist jedoch als äußerst wichtig einzustufen, da schon geringe Differenzen große Unterschiede im Bezug auf das Probenvolumen und somit auf die damit assoziierten Parameter haben können.

4.2.2 Probleme bei der Verarbeitung im Labor

Die Verarbeitung der Proben in zwei verschiedenen Labors brachte einige Herausforderungen mit sich. Obwohl der Verteilungsplan für die Nabelschnurblutproben mit Rücksichtnahme auf größtmögliche Nutzung der Kapazitäten und gleichberechtigten Bedingungen für die beteiligten Partnerinstitute entwickelt worden war, kann ein Bias aufgrund dieser zeitlichen Verteilung, wenngleich auch äußerst unwahrscheinlich, nicht komplett ausgeschlossen werden.

Aufgrund oben genannter Gründe (vgl. Kap. 4.1.1), wurden für diese Untersuchung lediglich die Konzentrationen an mononukleären und CD34-positiven Zellen herangezogen. Für eine Vergleichbarkeit mit dem Großteil der veröffentlichten Literatur wäre eine zusätzliche Bestimmung der nukleären Zellen (TNCs) von Vorteil gewesen. Des Weiteren unterschieden sich die Methoden zur Bestimmung bzw. Isolierung der Zellpopulationen in einigen Aspekten. Hierunter fallen Unterschiede der zur Aufbereitung verwendeten Medien und Reagenzien sowie deren Lagerung (z.B. variierende Bedingungen bezüglich der Temperatur), verschiedene Protokolle der Dichtegradientenzentrifugation, leicht differierende „gating“-Strategien (vgl. Kap. 2.3.2 und 2.3.3.) und andere standortspezifische Gegebenheiten. Wenngleich die beteiligten Laborpartner nach Kenntnisnahme der Protokolle des jeweils anderen Labors eine Vergleichbarkeit der Methoden bestätigten, lassen die sich signifikant unterscheidenden Mittelwerte bei beiden betrachteten Zellkonzentrationen doch Auswirkungen der Abweichung in der Methodik vermuten. Rückschlüsse auf die exakten Gründe für diese Beobachtung können aufgrund der nicht existierenden Standardisierung und des fehlenden Konsenses zum Stellenwert der verschiedenen Verfahren zur Zellzahlbestimmung zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht

gezogen werden. Ein direkter Vergleich der beiden Laboratorien, also die Untersuchung derselben Nabelschnurblutproben in beiden Labors mit den jeweiligen Protokollen wäre wünschenswert gewesen, war aus organisatorischen Gründen (zeitliche Verteilung und Transportmöglichkeiten) aber leider nicht durchführbar.

Auch der prozentuale Anteil der auf den Zellgehalt hin untersuchten Proben lag niedriger als wünschenswert. Dies begründete sich meist darauf, dass sich die Forschungsarbeiten der Labors u. a. auf die Expansion blutbildender Vorläuferzellen in Kultur (III. Medizinische Klinik) bzw. auf die Entwicklung von Protokollen zur Kryokonservierung (BSD) konzentrierten. Dafür waren die Zellzahlbestimmungen nicht notwendigerweise bei allen Proben durchzuführen und unterblieben deshalb teilweise.

4.2.3 Probleme bei der Datenauswertung

Grundsätzlich ist die Datenauswertung der am stärksten für Fehler anfällige Abschnitt einer wissenschaftlichen Arbeit. Dies wurde in der vorliegenden Untersuchung durch eine von Anfang an bestehende enge Zusammenarbeit und Beratung mit dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München weitestgehend vermieden. So erfolgte die Einteilung der stetigen Variablen – im Gegensatz zu den meisten veröffentlichten Studien – nicht willkürlich oder aufgrund einer statistischen Repräsentativität, sondern nach etablierten standardisierten Schemata, wie z.B. der Einteilung des pH-Werts nach Saling, der aktuellen Perzentilenkurven für ein möglichst vergleichbares Kollektiv oder der Bewertung der Apgar-Scores in der Originalarbeit. Diese Vorgehensweise kann unter Umständen zu Fehlern zweiter Art führen, was bedeutet, dass kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen erkannt wird, obwohl er in Wirklichkeit besteht, ist aber statistisch gesehen korrekt.

Eine Miteinbeziehung des Probenvolumens in die statistische Auswertung unterblieb in dieser Studie bedauerlicherweise, da der Fokus anfänglich zu stark auf die Zellzahlkonzentrationen gerichtet war. Erst im Laufe der Datenauswertung wurde die Wichtigkeit dieser Information durch den vermuteten Einfluss auf viele andere der untersuchten Parameter ersichtlich. Da die Daten jedoch von Seiten der Labors akquiriert und dokumentiert wurden, besteht die Möglichkeit, sie in folgenden Publikationen in die Auswertung mit einzubeziehen.

4.2.4 Ausblick und Anregungen für weitere Untersuchungen

Nicht nur die vorliegende Untersuchung zeigt, wie sehr das Gebiet der Stammzellforschung gerade im Bereich der Stammzellen aus Nabelschnurblut noch im Aufbau begriffen ist. Wie bereits mehrfach erwähnt, wäre es an der Zeit, einen umfassenden Vergleich der bisher unternommenen Untersuchungen und etablierten Verfahren anzustellen und daraus Empfehlungen für eine einheitliche Vorgehensweise zur Nabelschnurblutabnahme, Lagerung,

Aufbereitung, Zellzahlbestimmung und Zellisolation abzuleiten. Erst dann kann im strengen Sinne einer evidenzbasierten Medizin eine vergleichende Forschung in Richtung klinischer Anwendung begonnen werden.

Auch wenn Richtlinien und Grenzwerte für Einschluss oder Ausschluss von Kindern für Nabelschnurblutspenden erst nach Etablierung des eben beschriebenen Konsens formuliert werden können, ist die weitere Untersuchung von Prädiktoren für den Stammzellgehalt im Nabelschnurblut unbedingt empfehlenswert. Gerade bei der gegenwärtig zunehmenden Bereitschaft zur Nabelschnurblutspende muss nach einfachen Kriterien oder unkompliziert durchzuführenden Tests entschieden werden können, welche Nabelschnurblutproben einer Aufbereitung und Einlagerung zuzuführen sind und welche sich dafür aufgrund ihres zu geringen Stammzellgehalts nicht eignen.

Auch der Ansatz, dass verschiedene Stressfaktoren eine Stammzellausschüttung auslösen können, sollte in jedem Fall weiter verfolgt werden. Besonders interessant sind hier tiefergehende Untersuchungen zur Stammzellmobilisation auf molekularer Ebene (Cytokintheorie) und die Auswirkungen extern zugeführter Mediatoren (u. a. Interleukine, Wachstumsfaktoren, Steroide und andere Hormone). Sind diese Vorgänge erst umfassend untersucht, erleichtern sie möglicherweise auch die bestehenden Forschungsvorhaben zur Expansion von Nabelschnurblutstammzellen. Die Entwicklung und Anwendung eines solchen Verfahrens böte dann natürlich die Möglichkeit, die Problematik der zu geringen Stammzellzahlen zu umgehen, die Nutzung von Nabelschnurblutstammzellen auch regelhaft erwachsenen Patienten zugänglich zu machen und eventuell das Anwendungsgebiet der Nabelschnurbluttransfusion auf weitere Indikationen auszuweiten.

5 Zusammenfassung

Die Stammzellforschung ist eines der weitreichendsten und viel versprechendsten Forschungsgebiete der letzten Jahre. Gerade die Erforschung von adulten Stammzellen aus Nabelschnurblut ist aufgrund einfacher Gewinnungsmöglichkeit, geringer ethischer Bedenken und dem noch stark ausgeprägten Differenzierungspotential dieser Zellen von besonderem Interesse. Der limitierende Faktor bei der klinischen Anwendung ist jedoch häufig die zu geringe Zahl von Nabelschnurblutstammzellen in einer gespendeten Blutprobe. Insofern ist die Forschung bestrebt, sowohl Methoden zur ex-vivo Expansion von Nabelschnurblutstammzellen zu entwickeln, als auch Verfahren zu etablieren, mit denen der Stammzellgehalt einer Blutprobe im Vorfeld eingeschätzt werden kann. Dies würde eine Einlagerung von Proben mit zu geringem Zellgehalt vermeiden und somit die Kosteneffizienz der Nabelschnurblutbanken steigern. Ob und inwiefern sich peripartale neonatale und maternale Parameter als solche Prädiktoren eignen, wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchung eruiert.

Die Abnahme der Nabelschnurblutproben erfolgte durch die geschulten Hebammen des Kreißsaals der Frauenklinik der TU München (Klinikum Rechts der Isar) unmittelbar nach der Geburt des Kindes bei noch ungeborener Plazenta. Die Verarbeitung der Proben erfolgte nach einem festgelegten zeitlichen Verteilungsplan in zwei verschiedenen Labors. Beide Labors bestimmten die Konzentration von mononukleären Zellen mittels Verfahren der Dichtegradientenzentrifugation und den Gehalt von CD34-positiven Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut mittels FACS-Analyse. Die Methodik orientierte sich, sofern existent, an den derzeitigen internationalen Standards bzw. den aktuellen Studienlagen zur Zellzahlbestimmung (z.B. dem ISHAGE Protokoll zur Bestimmung der CD34-positiven Zellen). Es bestanden geringe Abweichungen zwischen den Protokollen beider Labors, deshalb wurden zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit neben einer statistischen Gesamtauswertung auch getrennte Auswertungen für die beiden Laboratorien durchgeführt.

Hierbei erwiesen sich einige perinatale Parameter als aussagekräftige Prädiktoren für den Stammzellgehalt im Nabelschnurblut:

Der arterielle Nabelschnur-pH-Wert des Neugeborenen korrelierte negativ linear mit der Konzentration an mononukleären und CD34-positiven Zellen, Kinder mit einem pH-Wert unterhalb 7,2 wiesen signifikant erhöhte Zellzahlen auf. Neugeborene rauchender Mütter hingegen zeigten signifikant erniedrigte Zellkonzentrationen in beiden Zellpopulationen.

Als Vorhersagewert bezüglich der Konzentration an mononukleären Zellen eignet sich besonders der Geburtsmodus. Höhere Zellzahlen fanden sich bei vaginal und vaginal operativ entbundenen Kindern gegenüber primären und sekundären Sectiones.

Auch die Lagerungsdauer der Blutproben bis zur Verarbeitung im Labor wirkte sich auf den Gehalt von mononukleären Zellen pro Milliliter Nabelschnurblut aus. So zeigten sich signifikant erhöhte Zellzahlen nach einem Zeitraum von 24 Stunden mit einer weiteren Erhöhung nach einem Intervall von 60 Stunden.

Der nach einer Minute erhobene Apgar-Score hingegen ließ einen Rückschluss auf die CD34-positiven Zellzahlen zu. Kinder mit Werten von 7 Punkten und weniger wiesen höhere Zellkonzentrationen auf als Neugeborene mit einem physiologischen Apgar-Score von 8 Punkten oder mehr.

Der Vergleich mit der existierenden Literatur und die Einordnung in die aktuelle Studienlage gestaltet sich bei diesem erst seit relativ kurzer Zeit untersuchten Thema aufgrund fehlender Standards und nicht einheitlicher Protokolle und Verfahren teilweise schwierig, unterstützt aber größtenteils die Ergebnisse unserer Arbeit. Eine weiterführende Grundlagenforschung zur Ursachenklärung mancher der beschriebenen Zusammenhänge wäre wünschenswert.

Die vorliegende Untersuchung unterstreicht die Bedeutung des Einflusses bestimmter äußerer Faktoren auf den Stammzellgehalt im Nabelschnurblut Neugeborener. Dabei eignen sich bevorzugt stressassoziierte Parameter wie der arterielle Nabelschnur-pH-Wert und der Entbindungsmodus als Prädiktoren für die Konzentration an mononukleären und CD34-positiven Zellen. Diese Ergebnisse könnten in Zukunft die Auswahl von Neugeborenen für eine Nabelschnurblutspende erleichtern und die Aufarbeitungs- und Einlagerungskosten für Nabelschnurblutproben deutlich reduzieren.

IV. Literaturverzeichnis

- [1] **ACOG Committee on Obstetric Practice:** ACOG Committee Opinion No. 348, November 2006: Umbilical cord blood gas and acid-base analysis. *Obstet Gynecol* 2006; 108:1319-22
- [2] **Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA:** An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 419-23
- [3] **Almici C, Carlo-Stella C, Mangoni L, Garau D, Cottafavi L, Ventura A, Armanetti M, Wagner JE, Rizzoli V:** Density separation of umbilical cord blood and recovery of hemopoietic progenitor cells: implications for cord blood banking. *Stem Cells* 1995; 13:533-40
- [4] **Aoki M, Yasutake M, Murohara T:** Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device. *Stem Cells* 2004; 22:994-1002
- [5] **Apgar V:** A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg* 1953:260-7
- [6] **Apgar V, Holaday DA, James LS, Weisbrot IM, Berrien C:** Evaluation of the newborn infant; second report. *J Am Med Assoc* 1958; 168:1985-8
- [7] **Aroviita P, Teramo K, Westman P, Hiilesmaa V, Kekomaki R:** Associations among nucleated cell, CD34+ cell and colony-forming cell contents in cord blood units obtained through a standardized banking process. *Vox Sang* 2003; 84:219-27
- [8] **Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Westman P, Kekomaki R:** Birthweight of full-term infants is associated with cord blood CD34+ cell concentration. *Acta Paediatr* 2004; 93:1323-9
- [9] **Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Kekomaki R:** Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex. *Transfusion* 2005; 45:613-21

- [10] **Askari S, Miller J, Chrysler G, McCullough J:** Impact of donor- and collection-related variables on product quality in ex utero cord blood banking. *Transfusion* 2005; 45:189-94
- [11] **Aufderhaar U, Holzgreve W, Danzer E, Tichelli A, Troeger C, Surbek DV:** The impact of intrapartum factors on umbilical cord blood stem cell banking. *J Perinat Med* 2003; 31:317-22
- [12] **Baksh D, Yao R, Tuan RS:** Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007 [Epub ahead of print]; doi:10.1634/stemcells.2006-0709
- [13] **Ballen KK, Wilson M, Wu J, Ceredona AM, Hsieh C, Stewart FM, Popovsky MA, Quesenberry PJ:** Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27:7-14
- [14] **Bongso A, Richards M:** History and perspective of stem cell research. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:827-42
- [15] **Bonnet D:** Haematopoietic stem cells. *J Pathol* 2002; 197:430-40
- [16] **Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Army M, Tomas L, Boyse EA:** Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:3828-32
- [17] **Cairo MS, Wagner JE:** Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood* 1997; 90:4665-78
- [18] **Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M:** Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001; 32:1005-11
- [19] **Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M:** Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000; 11:3001-5

- [20] **Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ**: Rapid expansion in recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:3213-8
- [21] **Dimitriou H, Perdikogianni C, Stiakaki E, Vorgia P, Hatzidaki E, Kalmanti M**: The impact of mode of delivery and gestational age on cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Ann Hematol* 2006; 85:381-5
- [22] **Donaldson C, Armitage WJ, Laundry V, Barron C, Buchanan R, Webster J, Bradley B, Hows J**: Impact of obstetric factors on cord blood donation for transplantation. *Br J Haematol* 1999; 106:128-32
- [23] **Dukes KA, Sullivan LM, Lewis D, Johnson KL, Bianchi DW, Simpson JL, Holzgreve W, Hahn S, Bischoff FZ, Jackson LG**: The effect of the elapsed time between blood draw and processing on the recovery of fetal cells from maternal blood. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11:154-65
- [24] **Emerson SG**: Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood* 1996; 87:3082-8
- [25] **Erices A, Conget P, Minguell JJ**: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109:235-42
- [26] **Falkenburg JH, van Luxemburg-Heijs SA, Zijlmans JM, Fibbe WE, Kluijn-Nelemans JC, Kanhai HH, Willemze R**: Separation, enrichment, and characterization of human hematopoietic progenitor cells from umbilical cord blood. *Ann Hematol* 1993; 67:231-6
- [27] **Fisk NM, Roberts IA, Markwald R, Mironov V**: Can routine commercial cord blood banking be scientifically and ethically justified? *PLoS Med* 2005; 2(2):e44
- [28] **Fritsch G, Stimpfl M, Buchinger P, Printz D, Sliutz G, Wagner T, Agis H, Valent P, Gardner H**: Does cord blood contain enough progenitor cells for transplantation? *J Hematother* 1994; 3:291-8

- [29] **George TJ, Sugrue MW, George SN, Wingard JR:** Factors associated with parameters of engraftment potential of umbilical cord blood. *Transfusion* 2006; 46:1803-12
- [30] **Gitau R, Fisk NM, Teixeira JM, Cameron A, Glover V:** Fetal hypothalamic-pituitary-adrenal stress responses to invasive procedures are independent of maternal responses. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:104-9
- [31] **Gleason CA, Hamm C, Jones MD:** Effect of acute hypoxemia on brain blood flow and oxygen metabolism in immature fetal sheep. *Am J Physiol* 1990; 258:H1064-9
- [32] **Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse EA:** Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321:1174-8
- [33] **Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C:** Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997; 337:373-81
- [34] **Gluckman E, Rocha V, Chastang C:** Cord blood banking and transplant in Europe. Eurocord. *Vox Sang* 1998; 74(Suppl 2):95-101
- [35] **Gluckman E, Rocha V, Chevret S:** Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplant. *Transfus Clin Biol* 2001; 8:146-54
- [36] **Götz M:** Von Stützzellen zu Stammzellen – Paradigmenwechsel in der Biologie
In: „Stammzellen – Heiler der Zukunft? Grundlagen, Klinische Studien, Rechtlicher Rahmen“. Verband deutscher Biologen und biowissenschaftlicher Fachgesellschaften e.V., Prof. Dr. Karl Daumer (Hrsg.). Vdbiol Geschäftsstelle München 2004, S.7-14
- [37] **Grisaru D, Deutsch V, Pick M, Fait G, Lessing JB, Dollberg S, Eldor A:** Placing the newborn on the maternal abdomen after delivery increases the volume and CD34 cell content in the umbilical cord blood collected: an old maneuver with new applications. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:1240-3

- [38] **Grisaru D, Deutsch V, Shapira M, Pick M, Sternfeld M, Melamed-Book N, Kaufer D, Galyam N, Gait MJ, Owen D, Lessing JB, Eldor A, Soreq H:** ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant, has hematopoietic growth promoting activities. *Mol Med* 2001; 7:93-105
- [39] **Gunsilius E, Gastl G, Petzer AL:** Hematopoietic stem cells. *Biomed Pharmacother* 2001; 55:186-94
- [40] **Harris DT, Schumacher MJ, Rychlik S, Booth A, Acevedo A, Rubinstein P, Bard J, Boyse EA:** Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13:135-43
- [41] **Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T:** The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:12240-4
- [42] **Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM:** Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2 Suppl):S745-53
- [43] **Hielscher O, Hilfert T, Gressmann H:** Netcord Inventory and Use June 2007
<https://www.netcord.org/inventory.html> (Stand: 26.07.2007)
- [44] **Hiatt AK, Britton KA, Hague NL, Brown HL, Stehman FB, Broxmeyer HE:** Comparison of hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood collected from neonatal infants who are small and appropriate for gestational age. *Transfusion* 1995; 35:587-91
- [45] **Holzgreve W, Surbek DV:** Cord blood banking and transplantation – fetal, maternal and perinatal issues. *Infusionsther Transfusionsmed* 1999; 26(Suppl 2):10-6
- [46] **Jacobs VR, Niemeyer M, Gottschalk N, Schneider KTM, Kiechle M, Oostendorp RA, Peschel C, Hönicka M, Lehle K, Birnbaum D, Meyer TP, Rapp S, Burkhart J, Aigner J, Eblenkamp M, Wintermantel E:** Das STEMMAT-Projekt als Teil der Gesundheitsinitiative BayernAktiv: Adulte Stammzellen aus Nabelschnur und -blut als Alternative zur embryonalen Stammzellforschung. *Zentralbl Gynakol* 2005; 127: 368-72

- [47] **Jacobs VR, Niemeyer M, Gottschalk N, Schneider KTM, Kiechle M:** Privates Nabelschnurblutbanking reduziert nicht die Probenanzahl für wissenschaftliche Stammzellforschung. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2005; 209:223-7
- [48] **Jacobs VR, Niemeyer M, Kiechle M:** Transplantations of stored umbilical cord blood from private blood banks: worldwide experience and analysis of 52 case reports from 1993-2004. *Cytotherapy* 2006; 8(Suppl 2):40
- [49] **Jensen A, Roman C, Rudolph AM:** Effects of reducing uterine blood flow on fetal blood flow distribution and oxygen delivery. *J Dev Physiol* 1991; 15:309-23
- [50] **Jones J, Stevens CE, Rubinstein P, Robertazzi RR, Kerr A, Cabbad MF:** Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:503-9
- [51] **Koc ON, Lazarus HM:** Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27:235-9
- [52] **Krabbe C, Zimmer J, Meyer M:** Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells – a critical review. *APMIS* 2005; 113:831-44
- [53] **Kramer MS:** Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis. *Bull World Health Organ* 1987; 65:663-737
- [54] **Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS:** CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996; 1:1-13
- [55] **Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocchi G, Carrier C, Stevens CE, Rubinstein P:** Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996; 335:157-66
- [56] **Laakko T, Fraker P:** Rapid changes in the lymphopoietic and granulopoietic compartments of the marrow caused by stress levels of corticosterone. *Immunology* 2002; 105:111-9

- [57] **Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, Mullen M, Mealiffe M, Teerstappen LW, Hardwick A, Moubayed M, Oldham F, Corringham RE, Ho AD:** Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1995; 85:275-82
- [58] **Laughlin A, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, Gerson SL, Lazarus HM, Cairo M, Stevens CE, Rubinstein P, Kurtzberg J:** Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 2001; 344:1815-22
- [59] **Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Lu M, Chopp M:** Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001; 316:67-70
- [60] **Lim FT, van Winsen L, Willemze R, Kanhai HH, Falkenburg JH:** Influence of delivery on numbers of leukocytes, leukocyte subpopulations, and hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood. *Blood Cells* 1994; 20:547-58
- [61] **Lim F, Beckhoven J, Brand A, Kluin-Nelemans J, Hermans J, Willemze R, Kanhai H, Falkenburg J:** The number of nucleated cells reflects the hematopoietic content of umbilical cord blood for transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:965-70
- [62] **Lim FT, Scherjon SA, van Beckhoven JM, Brand A, Kanhai HH, Hermans JM, Falkenburg JH:** Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:1144-52
- [63] **Mahmood A, Lu D, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M:** Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2001; 49:1196-204
- [64] **Mancinelli F, Tamburini A, Spagnoli A, Malerba C, Suppo G, Lasorella R, de Fabritiis P, Calugi A:** Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units. *Transplant Proc* 2006; 38:1174-6

- [65] **Merzelina-Roumans P, Breukers RB, Ubachs JM, van Wersch JW:** Cord blood cells and indices: smoking-related differences between the sexes. *Acta Paediatr* 1995; 84:371-4
- [66] **Merzelina-Roumans PE, Breukers RB, Ubachs JM, van Wersch JW:** Hematological variables in cord blood of neonates of smoking and nonsmoking mothers. *J Clin Epidemiol* 1996; 49:449-54
- [67] **Meyers RL, Paulick RP, Rudolph CD, Rudolph AM:** Cardiovascular responses to acute, severe haemorrhage in fetal sheep. *J Dev Physiol* 1991; 15:189-97
- [68] **Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P:** Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 2000; 96:2717-22
- [69] **Mohyeddin Bonab MA, Alimoghaddam KA, Goliaei ZA, Ghavamzadeh AR:** Which factors can affect cord blood variables? *Transfusion* 2004; 44:690-3
- [70] **M-Reboredo N, Diaz A, Castro A, Villaescusa RG:** Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26:1263-70
- [71] **Nakagawa R, Watanabe T, Kawano Y, Kanai S, Suzuya H, Kaneko M, Watanabe H, Okamoto Y, Kuroda Y, Nakayama T; Chugoku-Shikoku Cord Blood Bank:** Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *Transfusion* 2004; 44:262-7
- [72] **Newton I, Charbord P, Schaal JP, Herve P:** Toward cord blood banking: density-separation and cryopreservation of cord blood progenitors. *Exp Hematol* 1993; 21:671-4
- [73] **Nikischin W, Peter M, Oldigs HD:** The influence of mode of delivery on hematologic values in the umbilical vein. *Gynecol Obstet Invest* 1997; 43:104-7
- [74] **Perutelli P, Catellani S, Scarso L, Cornaglia-Ferraris P, Dini G:** Processing of human cord blood by three different procedures for red blood cell depletion and mononuclear cell recovery. *Vox Sang* 1999; 76:237-40

- [75] **Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA:** Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 2002; 197:441-56
- [76] **Prat I, Hernandez MC, Ortiz M, Flores A, Gonzales de Gor R, Sanchez F, Terol E, Galeote A, Ruiz MD, Larracochea J, Maldonado J:** Contribution of maternal and neonatal factors to the evaluation of umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23:853-5
- [77] **Raff M:** Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19:1-22
- [78] **Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M:** Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften* 2002; 89:338-51
- [79] **Rocha V, Wagner JE, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, Gluckman E:** Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 2000; 342:1846-54
- [80] **Rottman GA, Ramirez M, Civin CI:** Cord blood transplantation: a promising future. *Pediatrics* 1997; 99:475-6
- [81] **Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE, Rosenfield RE, Stevens CE:** Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998; 339:1565-77
- [82] **Salafia C, Shiverick K:** Cigarette smoking and pregnancy II: vascular effects. *Placenta* 1999; 20:273-9
- [83] **Saling E:** Die Blugasverhältnisse und der Säure-Basen-Haushalt des Feten bei ungestörtem Geburtsablauf. *Z Geburtshilfe Gynakol* 1964; 161:262-92
- [84] **Schneider KTM:** Überwachungsmethoden des Feten.
In: „Gynäkologie und Geburtshilfe“. *Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider KTM, Weiss JM (Hrsg.)*. Springer-Verlag Berlin 2000, 1. Auflage, S.198 – 233

- [85] **Shields LE, Andrews RG:** Gestational age changes in circulating CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells in fetal cord blood. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:931-7
- [86] **Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T:** Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103:2776-9
- [87] **Shiono PH, Klebanoff MA, Rhoads GG:** Smoking and drinking during pregnancy. Their effects on preterm birth. *JAMA* 1986; 255:82-4
- [88] **Shiverick KT, Salafia C:** Cigarette smoking and pregnancy I: ovarian, uterine and placental effects. *Placenta* 1999; 20:265-72
- [89] **Shlebak AA, Roberts IA, Stevens TA, Syzdlo RM, Goldman JM, Gordon MY:** The impact of antenatal and perinatal variables on cord blood haemopoietic stem/progenitor cell yield available for transplantation. *Br J Haematol* 1998; 103:1167-71
- [90] **Shlebak AA, Marley SB, Roberts IA, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY:** Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23:131-6
- [91] **Smith RP, Gitau R, Glover V, Fisk NM:** Pain and stress in the human fetus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92:161-5
- [92] **Solves P, Larrea L, Soler MA, Mirabet V:** Relationship between gestational age and cord blood quality. *Transfusion* 2001; 41:302-4
- [93] **Solves P, Perales A, Mirabet V, Blasco I, Blanquer A, Planelles D, Larrea L, Monleon J, Carbonell-Uberos F, Soler MA:** Optimizing donor selection in a cord blood bank. *Eur J Haematol* 2004; 72:107-12
- [94] **Solves P, Perales A, Moraga R, Saucedo E, Soler MA, Monleon J:** Maternal, neonatal and collection factors influencing the haematopoietic content of cord blood units. *Acta Haematol* 2005; 113:241-6

- [95] **Sparrow RL, Cauchi JA, Ramadi LT, Waugh CM, Kirkland MA:** Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. *Transfusion* 2002; 42:210-5
- [96] **Stamm C, Steinhoff G:** Kardiales Tissue Engineering. *Herz* 2002; 27:445-52
- [97] **Steller J:** Neonatologie.
In: "Klinikleitfaden Gynäkologie Geburtshilfe". *Goerke K, Steller J, Valet A (Hrsg.); Schäffler A, Renz U (Reihenhrsg.)*. Gustav Fischer Verlag Ulm 1997, 4. Auflage, S.277-306
- [98] **Surbek DV, Holzgreve W, Steinmann C, Hahn S, Gratwohl A, Wodnar-Filipowicz A, Tichelli A:** Preterm birth and the availability of cord blood for HPC transplantation. *Transfusion* 2000; 40:817-20
- [99] **Surbek DV, Danzer E, Steinmann C, Tichelli A, Wodnar-Filipowicz A, Hahn S, Holzgreve W:** Effect of preeclampsia on umbilical cord blood hematopoietic progenitor-stem cells. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185:725-9
- [100] **Sutherland DR, Keating A:** The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J Hematother* 1992; 1:115-29
- [101] **Sutherland DR, Keating A, Nayar R, Anania S, Stewart AK:** Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp Hematol* 1994; 22:1003-10
- [102] **Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I:** The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hematother* 1996; 5:213-26
- [103] **Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T:** Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularisation. *Nat Med* 1999; 5:434-8
- [104] **The World Medical Association:** World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (2004).
<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm> (Stand: 30.07.2007)

- [105] **Thierry D, Hervatin F, Traineau R, Brossard Y, Stark R, Benbunan M, Gluckman E:** Hematopoietic progenitor cells in cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9(Suppl 1):101-4
- [106] **Thilaganathan B, Nicolaides KH, Morgan G:** Subpopulations of CD34-positive haemopoietic progenitors in fetal blood. *Br J Haematol* 1994; 87:634-6
- [107] **Vettenranta K, Piirto I, Saarinen-Pihkala UM:** The effects of the mode of delivery on the lymphocyte composition of a placental/cord blood graft. *J Hematother* 1997; 6:491-3
- [108] **Vilmar K, Bachmann KD, Kurth R:** Richtlinien zur Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut (CB = Cord Blood). Bundesärztekammer (1999).
<http://www.bundesaerztekammer.de/page.asp?his=0.7.45.3284> (Stand: 24.07.2007)
- [109] **Vogl SE, Worda C, Egarter C, Bieglmayer C, Szekeres T, Huber J, Husslein P:** Mode of delivery is associated with maternal and fetal endocrine stress response. *BJOG* 2006; 113:441-5
- [110] **Voigt M, Schneider KTM, Jährig K:** Analyse des Geburtsgutes des Jahrgangs 1992 der Bundesrepublik Deutschland. Teil 1: Neue Perzentilwerte für die Körpermaße von Neugeborenen. *Geburtsh Frauenheilk* 1996; 56:550-8
- [111] **Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E:** Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995; 346:214-9
- [112] **Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, Goldman A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Weisdorf DJ, Ramsay NK, Davies SM:** Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002; 100:1611-8
- [113] **Warwick R, Armitage S:** Cord blood banking. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:995-1011

- [114] **Watt SM, Contreras M:** Stem cell medicine: umbilical cord blood and its stem cell potential. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005; 10:209-20
- [115] **Williams DE, Lu L, Broxmeyer HE:** Characterization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Immunol Res* 1987; 6:294-304
- [116] **Wyrsh A, dalle Carbonare V, Jansen W, Chklovskaja E, Nissen C, Surbek D, Holzgreve W, Tichelli A, Wodnar-Filipowicz A:** Umbilical cord blood from preterm human fetuses is rich in committed and primitive hematopoietic progenitors with high proliferative and self-renewal capacity. *Exp Hematol* 1999; 27:1338-45
- [117] **Yamada T, Okamoto Y, Kasamatsu H, Horie Y, Yamashita N, Matsumoto K:** Factors affecting the volume of umbilical cord blood collections. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79:830-3
- [118] **Zwahr C, Zwahr B, Voigt M:** Praktische Erfahrungen mit der Klassifikation von Neugeborenen unter Berücksichtigung von Gestationsdauer und Geburtsgewicht. *Zentralbl Gynakol* 1982; 104:1421-9

V. Dankvermerk

Ich danke Frau Prof. Dr. Marion Kiechle-Bahat als Klinikdirektorin und Herrn Prof. Dr. K.T.M. Schneider als Leiter der geburtshilflichen Abteilung für die Möglichkeit, diese Untersuchung in den von ihnen geführten Institutionen durchzuführen.

Für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit danke ich meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. Volker Jacobs, noch mehr jedoch für seine tatkräftige Unterstützung und stetige Motivation.

Auch den andern Mitarbeitern des STEMMAT-Projektes, explizit den Hebammen des Kreißsaals, Herrn PD Dr. Robert Oostendorp und Frau Sandra Hippauf aus dem Labor der III. Medizinischen Klinik der TU München und Herrn Dr. Thomas Meyer aus dem Labor des Blutspendedienstes des BRK, gilt mein Dank. Sie haben mir den Einstieg in die Thematik erleichtert und waren hilfreiche Ansprechpartner bei fachlichen Fragen.

Meine Schwester Katharina Bölsterl und ihr Freund Stefan Singer haben durch ihren unermüdlichen Einsatz und ihr besonderes Engagement nicht nur diese Arbeit bereichert.

VI. Anhang

Analysen-Zertifikat für Blutbeutel des ÖRK

Analysen-Zertifikat

Gerätezentrale für Bluttransfusion
des ÖRK GmbH
Transfusion Equipment Centre
Gewerbegebiet Pebering 19
A-5301 Eugendorf / Sbg

Chargenangaben

Beuteltyp: 1-BB-150-CPD-NP
 Artikelnummer: 8001938
 Lotnummer: 0005A27G04
 Herstellungsdatum: 27.01.2005
 Verwendbar bis: 08/2005
 Blutstabilisatorlösung CPD: 21 ml

Prüfergebnisse


Prüfung auf Sterilität erfolgt gemäß Ph. Eur. IV; 2.6.1.

Prüfung auf Bakterienendotoxine erfolgt gemäß Ph. Eur. IV; 2.6.14.

Prüfung auf Pyrogene erfolgt gemäß Pharm. Eur. IV; 2.6.8.

Der Beutel entspricht den Anforderungen nach Pharm. Eur. IV; 3.1.1., 3.2.3. und 3.2.4. sowie der DIN ISO 3826.

Prüfung	Einheit	Soll	UG	OG	Ergebnis
physikalische Prüfungen					
Sterilität		steril	0	0	konform
Blutstabilisatorlösung CPD:					
pH-Wert			5,3	5,9	konform
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	[g/l]	2,51	2,38	2,64	konform
Na-Citrat x 2 H ₂ O	[g/l]	26,3	25	27,62	konform
HMF	Abs. 550nm		0	0,3	konform
Glucose x H ₂ O	[g/l]	25,50	24,23	26,78	konform
Citronensäure x H ₂ O	[g/l]	3,27	2,94	3,6	konform
Bakterienendotoxine	[Eu/ml]	0	0	5,6	konform


I.A. Dipl. Ing. Nicole Gunser
Laborleitung


I.V. Mag. Michael Kurz
Leiter Qualitätsmanagement

Freitag, 11. Februar 2005

SEITE 1 VON 1

STEMMAT-Information

Frauenklinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Marion Kiechle



Abteilung für Perinatalmedizin
Leiter: Univ.-Prof. Dr. KTM Schneider

Frauenklinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Straße 22, 81675 München

Briefanschrift: Ismaninger Str. 22
81675 München

Pränatale Diagnostik u. Therapie, Poliklinik,
Risikosprechstunden:

Zentrale
Anmeldung: Tel. 41 40 - 24 46

Information zur Nabelschnur/-blut-Spende für das STEMMAT-Projekt

Liebe werdende Mutter,

für Sie steht in den nächsten Wochen oder Tagen die Geburt Ihres Kindes / Ihrer Kinder an. Ein für Sie ganz besonderer Moment. Wir werden Sie auf Ihrem Weg begleiten und wünschen Ihnen eine schöne Geburt.

Auch wenn Ihre Gedanken auf ganz andere Dinge gerichtet sind, so möchten wir den Moment doch nutzen, Sie um einen Gefallen zu bitten. Als Universitätsklinik führen wir nicht nur die Behandlung von Patientinnen durch, sondern sind auch mit der Forschung auf Verbesserungen für die Gesundheit ausgerichtet. Wie können Sie dazu beitragen?

Nach der Geburt Ihres Kindes kommt die Nachgeburt, der Mutterkuchen, und Ihr Baby wird abgenabelt. Der Mutterkuchen mit der daran hängenden Nabelschnur und Resten von Nabelschnurblut hat für Sie normalerweise keine weitere Bedeutung und wird entsorgt.

Für uns können diese Blut- und Gewebereste aber noch eine Bedeutung haben. Wir möchten Sie deshalb um Ihre Erlaubnis bitten, sie für wissenschaftliche Zwecke nutzen zu dürfen. Wir wollen im Rahmen eines Forschungsprojektes u.a. Zellen aus Nabelschnur und –blut auf ihre Eigenschaften und Lagerungsfähigkeiten untersuchen, um vielleicht in Zukunft dies für die Verhinderung oder Heilung von Krankheiten nutzen zu können. Im beiliegenden Aufklärungsbogen sind alle Einzelheiten ausführlich dargestellt. Wir würden uns über Ihre Einwilligung und Unterschrift am Ende des Aufklärungsbogens freuen.

Vielen Dank!

Version 4 07.10.2003 Kreißsaal: Tel. 41 40 - 24 00
Fax 41 40 - 48 92

Sekretariat: Tel. 41 40 - 24 30 / - 24 31
Fax 41 40 - 24 47
email: KTM.Schneider@lrz.tum.de

STEMMAT-Aufklärungsbogen



Frauenklinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Marion Kiechle



Abteilung für Perinatalmedizin
Leiter: Univ.-Prof. Dr. KTM Schneider

Frauenklinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Straße 22, 81675 München

Briefanschrift: Ismaninger Str. 22
81675 München

Pränatale Diagnostik u. Therapie, Poliklinik,
Risikosprechstunden:

Zentrale
Anmeldung: Tel. 41 40 - 24 46

Aufklärungsbogen für die Überlassung von Nabelschnur und –blut zu Forschungszwecken im Rahmen des STEMMAT-Projektes

1. Ziel der Studie:

Stammzellen in der Nabelschnur und im -blut sind Zellen mit besonderen Eigenschaften. In ihnen liegt die Anlage, sich zu allen Körpergeweben entwickeln zu können. Wir verstehen bis heute noch zu wenig über diese Eigenschaften und wollen sie untersuchen. Die Studie hat zwei Hauptziele: Einerseits soll untersucht werden, wie lange man die Zellen langfristig gekühlt lagern kann, ohne dass sie ihre Funktion und Eigenschaften verlieren. Zweitens sollen die Funktion und Entwicklungsfähigkeit der Stammzellen aus der Nabelschnur sowie aus dem Nabelschnurblut untersucht werden, um damit die Grundlagen für die Entwicklung von körpereigenem Ersatzgewebe besser zu verstehen und ggf. später einmal durchführen zu können („Tissue Engineering“). Das Projekt dient der Grundlagenforschung zu diesem Thema.

2. Ethische Beurteilung:

Die Forschung an unreifen (=embryonalen) Stammzellen ist in Deutschland umstritten. Die Forschung an adulten (=reifen) Stammzellen aus Nabelschnur und –blut im Rahmen dieser Studie ist einwandfrei, unbedenklich und rechtlich uneingeschränkt möglich. Eine Untersuchung des genetischen Codes (DNA) oder ein Screening auf Erbkrankheiten findet nicht statt.

3. Ihre Aufgabe:

Ihr Anteil an diesem Forschungsprojekt ist absolut freiwillig und besteht in der Einwilligung in die einmalige Spende von Nabelschnur- und –blut ggf auch von Mutterkuchen und Eihaut nach der Geburt Ihres Kindes / Ihrer Kinder für wissenschaftliche Zwecke, die danach zum Eigentum der Forschungsgruppe werden. Es wird kein zusätzliches Blut von Ihnen benötigt.

4. Ein- und Ausschlusskriterien:

Voraussetzung für die Teilnahme an dieser Studie ist 18 Jahre und die volle Geschäftsfähigkeit, sowie ausreichende Kenntnis der deutschen Sprache, um diese Aufklärung zu verstehen.

5. Finanzielle Verpflichtungen:

Für Sie hat die Teilnahme an dieser Studie keine Kosten zur Folge; Sie erhalten aber auch keine finanzielle Entschädigung dafür.

6. Mögliche Risiken und Nachteile für Sie oder Ihr Kind:

Es gibt keine, da die Proben nach Abschluss der Geburt entnommen werden, nachdem das Kind längst abgenabelt ist. Wie bei einer normalen Geburt steht Nabelschnurblut für eine etwaige zukünftige Transfusion nicht zur Verfügung.

7. Vorteile für Sie und Ihr Kind:

Sie oder Ihr Kind werden keinen direkten oder indirekten Vorteil aus der Blut-/Gewebespende haben. Es wird auch kein Gewebe bzw. Blut für Sie oder Ihr Kind zur späteren Verwendung oder Nutzung eingelagert z.B. für eine Nabelschnurbluttransfusion.

8. Vorteile für die Gesellschaft:

Im Rahmen der langfristig angelegten Grundlagenforschung von adulten (=reifen) Stammzellen sollen Therapieformen und Behandlungsmöglichkeiten untersucht werden. So könnten in Zukunft adulte, aber „unverbrauchte“ Stammzellen aus der eigenen Nabelschnur nach der Geburt eingelagert werden, um aus diesen Zellen dann im Falle lebensbedrohlicher Erkrankungen Ersatzgewebe zu entwickeln und für therapeutische Maßnahmen zu nutzen. Von den Ergebnissen dieser Studie zur Entwicklung von patienteneigenem Zell- oder Gewebeersatz könnten kommende Generationen profitieren.

9. Alternativen:

Welche grundsätzlichen Alternativen zur wissenschaftlichen Nabelschnur-/blut-Spende für wissenschaftliche Zwecke gibt es?

a) Nabelschnurblutspende:

Falls Sie einen konkreten Grund haben, eine Nabelschnurblutspende für einen anderen Menschen durchzuführen (sogenannte „gerichtete“ Nabelschnurblutspende) oder allgemein Nabelschnurblut spenden wollen („ungerichtete“ Nabelschnurblutspende), ist die Teilnahme an dieser Studie für die Spende von Nabelschnurblut nicht möglich. Die Nabelschnurblutspende ist an unserer Klinik zwar keine Routine, ist aber ggf. im Einzelfall nach Rücksprache möglich. Eine Spende der Nabelschnur ist nach der Geburt trotzdem möglich.

b) Nabelschnurblutbank zur Selbstnutzung:

Falls Sie das Nabelschnurblut Ihres Kindes für den grundsätzlich möglichen aber eher unwahrscheinlichen Eigenbedarf langfristig aufbewahren lassen möchten, ist die Teilnahme an dieser Studie für die Spende von Nabelschnurblut nicht möglich. Die Chancen dafür, eingelagertes Nabelschnurblut selbst einmal nutzen zu können, sind sehr gering und liegen nach Schätzungen bei ca. 1:10.000 bis 1:200.000. Diese Dienstleistung wird von kommerziellen Firmen angeboten, z.B. Vita 34 oder Cryo-Care. Die Kosten dafür betragen derzeit ca. 1300,- € für 20 Jahre Einlagerungszeit und müssen von Ihnen privat bezahlt werden. Falls Sie mit diesen Firmen einen Vertrag geschlossen haben, so nehmen wir in Ihrem Auftrag gerne die Nabelschnurblut ab und sorgen für den Transport zu den Labors der Firmen. Auch in diesem Fall ist die Spende der Nabelschnur nach der Geburt trotzdem möglich.

10. Komplikationen / Gesundheitliche Risiken:

Komplikationen für Sie oder Ihr Kind können aus der Blut-/Gewebespende nicht entstehen, da wir nur die übrig bleibenden Reste nach der Geburt verwenden.

11. Teilnahme und Widerruf der Einwilligung zur Studie:

Durch Ihre Unterschrift willigen Sie in die Teilnahme an dieser Studie ein. Sie können Ihre Einwilligung jederzeit und ohne Angabe von Gründen bis zur anonymen Verarbeitung des gespendetem Nabelschnurgewebes und -blutes widerrufen. Dies ist nach der anonymisierten Verarbeitung der Zellen jedoch nicht mehr möglich. Der Widerruf der Zustimmung hat keine Nachteile zur Folge und auch keinen Einfluss auf den Ablauf der Geburt. Eine Nutzung von Zellen oder Blut/-bestandteilen durch Sie, z.B. für Ihr Kind, ist nach der erfolgten Spende nicht mehr möglich.

12. Widerruf durch die Projektteilnehmer:

Es gibt keine Garantie für die wissenschaftliche Nutzung von gespendeter Nabelschnur /-blut. Die Spende der Nabelschnur bzw. des -blutes kann z.B. aufgrund von geringer Menge oder anderer Gründe für eine Auswertung nicht geeignet sein. In solchen Fällen kann die Spende nicht genutzt werden und das Nabelschnurgewebe bzw. -blut wird entsorgt.

13. Namen der Studienteilnehmer:

Die Studie wird unter Führung des Zentralinstitutes für Medizintechnik (ZIMT) der Technischen Universität München von Prof. Dr. Dr. E. Wintermantel, Dr. J. Aigner und Dr. D. Westphal durchgeführt. Weitere Teilnehmer sind u.a. die Frauenklinik mit Fr. Prof. Dr. M. Kiechle, Prof. Dr. K.T.M. Schneider und Dr. V.R. Jacobs, die III. Medizinische Klinik mit Prof. Dr. C. Peschel und Dr. R.A.J. Oostendorp der Technischen Universität München sowie die Herz-Thorax-Herznahe-Gefäßschirurgie der Universitätsklinik Regensburg mit Prof. Dr. D. Birnbaum und Fr.

Dr. K. Lehle sowie der Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes GmbH mit Dr. S. Rapp und Dr. J. Burkhart.

14. Ansprechpartner:

Falls Sie jetzt noch Fragen haben, können Sie sich jederzeit gerne an den Ansprechpartner der Frauenklinik, Dr. Volker Jacobs, unter Tel. 089-4140-2409 oder über klinikinternen Pieper 11-2423- oder an seinen Vertreter wenden.

15. Veröffentlichung:

Eine Veröffentlichung der Forschungsergebnisse ist u.a. in der wissenschaftlichen Literatur bzw. als Vortrag geplant. Sie persönlich werden über die Forschungsergebnisse allerdings nicht informiert.

16. Finanzierung dieses Forschungsprojektes:

Dies Projekt wird im Rahmen der Gesundheitsinitiative *BAYERNAKTIV* des Bayerischen Staatsministeriums für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz finanziert. Informationen dazu finden Sie auf dem Internet unter www.bayernaktiv.de.

17. Mögliche kommerzielle Nutzung von Forschungsergebnissen:

Das STEMMAT-Forschungsprojekt ist grundsätzlich wissenschaftlich und nicht kommerziell angelegt, d.h. es ist nicht geplant, Stammzellen zur Transplantation weiterzuverarbeiten oder Zelllinien weiterzuverkaufen. Keiner der Forschungsteilnehmer hat einen finanziellen Interessenkonflikt. Falls aber die Ergebnisse aus dieser Studie dafür genutzt werden können, die Entwicklung neuer medizinischer Verfahren, Produkte und/oder Dienstleistungen zu fördern oder solche kommerziell zu vertreiben, entsteht hieraus kein Anspruch für Sie auf eine Vergütung.

18. Datenschutz:

Alle im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten werden vertraulich behandelt und mindestens für die Dauer des Projektes aufbewahrt. Zur Einsichtnahme und Auswertung sind nur die Projektteilnehmer bzw. von Ihnen beauftragte Personen und Institutionen ermächtigt. Das Blut/Gewebe wird anonym weiterverarbeitet.

STEMMAT-Einwilligungserklärung

Frauenklinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Marion Kiechle



Abteilung für Perinatalmedizin
Leiter: Univ.-Prof. Dr. KTM Schneider

Frauenklinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Straße 22, 81675 München

Briefanschrift: Ismaninger Str. 22
81675 München

Pränatale Diagnostik u. Therapie, Poliklinik,
Risikosprechstunden:

Zentrale
Anmeldung: Tel. 41 40 - 24 46

**Einwilligungserklärung für die Überlassung von Nabelschnur und –blut zu
Forschungszwecken im Rahmen des STEMMAT-Projektes**

Datenschutz:

Alle im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten werden vertraulich behandelt und mindestens für die Dauer des Projektes aufbewahrt. Ich bin mit der Weitergabe der Daten einverstanden. Zur Einsichtnahme und Auswertung sind nur die Projektteilnehmer bzw. von Ihnen beauftragte Personen und Institutionen ermächtigt. Das Blut/Gewebe wird anonym weiterverarbeitet.

Einwilligung und Unterschrift:

Ich habe die vierseitige Aufklärung zur Studienteilnahme erhalten, gelesen und verstanden, dass die Teilnahme freiwillig ist. Ich habe keine Fragen und stimme der Spende von Blut- und Geweberesten nach der Geburt meines Kindes / meiner Kinder für wissenschaftliche Zwecke zu.

München, den

Unterschrift

Abtretung der Rechte:

Ich trete zeitlich unbefristet und unwiderruflich alle Rechte z.B. an Forschungsergebnissen, Entwicklungen, Daten oder Dienstleistungen, die im Rahmen des Projektes entstehen, an die Teilnehmer des STEMMAT-Forschungsprojektes ab.

München, den

Unterschrift

Version 4 07.10.2003

Kreisbüro: Tel. 41 40 - 24 00
Fax 41 40 - 48 92

Sekretariat: Tel. 41 40 - 24 30 / - 24 31
Fax 41 40 - 24 47
email: KTM.Schneider@fz2.tum.de