

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer**

**“Isolierung und Charakterisierung
mesenchymaler Stammzellen (UCSC)
aus der humanen Nabelschnur,,**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Victoria Constanza Lechner
aus Puerto Varas, Chile
Würzburg, März 2010**

Referent: Prof. Dr. med. Th. Meyer

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 10.05.2011

Die Promovendin ist Ärztin

... von Dir habe ich die Flügel

meine Träume zu erreichen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Thematische Einführung.....	6
1.2	Definition der Stammzellen.....	8
1.3	Anatomie der Nabelschnur.....	10
1.4	Embryologie der Nabelschnur.....	11
1.5	Histologischer Aufbau der Nabelschnur.....	14
2	Fragestellungen.....	16
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Zellgewinnung.....	17
3.2	Zellkultur.....	20
3.3	Methoden der Zellidentifikation.....	20
3.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	20
3.3.2	Immunhistochemie.....	21
3.4	Erhebung der Messdaten und ihre Auswertung.....	23
4	Ergebnisse.....	24
4.1	Isolierungsergebnisse.....	24
4.2	Isolierungsergebnisse in Abhängigkeit von der Geburtsart.....	25
4.3	Anzahl der adhärenen Zellen.....	26
4.4	Morphologischer Differenzierungsverlauf der UCSCs in der Zellkultur.....	27
4.5	Histologische und Immunhistologische Analyse der UCSCs.....	32
4.5.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	32
4.5.2	Immunhistochemie (anti Fibroblasten-Ak).....	33
4.5.3	Immunhistochemie (anti CD13-Ak).....	34
4.5.4	Immunhistochemie (anti CD 105-Ak).....	35
4.5.5	Immunhistochemie (anti CD 14-Ak und anti CD 34-Ak).....	36

5	Diskussion	37
6	Zusammenfassung.....	49
7	Literaturverzeichnis	51

Anhang

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1. Thematische Einführung

Die „Regenerative Medizin“ stellt zum gegenwärtigen Zeitpunkt eines der spannendsten Felder der biomedizinischen Forschung dar. Als anwendungsorientierte Disziplin hat sie das Ziel, ausgehend von der Erforschung der regenerativen Prinzipien des Organismus neue innovative Methoden zur Behandlung von Gewebsschäden zu entwickeln [1].

Das grundlegende Prinzip regenerativer Vorgänge ist es, durch einen Gewebsschaden eine Anreicherung wenig differenzierter Zellen (Vorläuferzellen) am Ort der Schädigung zu induzieren. Dieses wird entweder durch Proliferation ortsständiger Zellen oder durch Einwanderung von Zellen erreicht. Gesteuert durch das äußere Milieu (extrazelluläre Matrix, zelluläre Umgebung, lösliche Mediatoren) differenzieren diese Zellen funktionell aus und bilden ortstypisches Gewebe. Dieses Prinzip legt zwei Therapieansätzen nahe, um die Regeneration von Gewebe zu induzieren bzw. zu unterstützen:

- Beeinflussung des äußeren Milieus
und
- Anreicherung entsprechender Vorläuferzellen am Ort des Gewebeschadens.

Denkbar ist in diesem Zusammenhang die Rekrutierung in situ befindlicher Vorläuferzellen (Einsatz von Zytokinen) oder das gezielte Einbringen in vitro kultivierter Zellen an den Ort des Gewebeschadens. Aus Letzterem ergibt sich eine zentrale Herausforderung in der regenerativen Medizin aber auch der Kinderchirurgie, nämlich die Suche nach geeigneten Zellpopulationen als Grundlage für eine gezielte Gewebsregeneration bzw. einen gezielten Gewebeersatz. Diese Zellen müssen hierbei zwei Voraussetzungen erfüllen. Zum einen müssen sie in vitro eine proliferative Aktivität besitzen, um sie ex corpore vermehren zu können und zum anderen müssen sie in der Lage sein, sich funktionell in den angrenzenden ortsständigen Gewebsverband einzugliedern. Dieses setzt voraus, dass sie eine phänotypische Plastizität besitzen und sich in ihrer Differenzierung an die Umgebung anpassen können.

Multipotente Stammzellen besitzen per definitionem diese Eigenschaften und sind deshalb für die regenerative Medizin von besonderem Interesse [2]. Da der Einsatz von embryonalen Stammzellen aufgrund ihrer ethischen Problematik limitiert ist, gibt es intensive Bemühungen, auch aus dem postnatalen Organismus Zellen mit ähnlichen Eigenschaften zu gewinnen. Hierbei zeigt sich, dass offenbar in einer Vielzahl von Geweben (insbesondere Knochenmark, Fettgewebe, Blut, Haut) Zellen existieren, die mit einem geringen Determinationsgrad und einer hohen Proliferationskapazität Eigenschaften multipotenter Stammzellen aufweisen [3]. Die diesbezüglich wohl am ausführlichsten untersuchten Zellen sind die „mesenchymalen Stammzellen“ des Knochenmarks [4]. Wenngleich durchaus kontrovers diskutiert, so weisen zahlreiche Untersuchungen darauf hin, dass auch funktionell ausdifferenzierte Zellen ein hohes Maß an Plastizität besitzen können und über einen Dedifferenzierungs- bzw. Transdifferenzierungsprozess in wenig determinierte Zellen bzw. andere funktionelle Differenzierungsformen übergehen können [3,4]. Neuere Untersuchungen legen den Verdacht nahe, dass sich in der Nabelschnur des Menschen ebenfalls Bindegewebszellen finden lassen, die zur Gruppe der Mesenchymalen Stammzellen zu zählen sind und ebenfalls ein hohes Differenzierungspotential besitzen (siehe Abbildung 1).

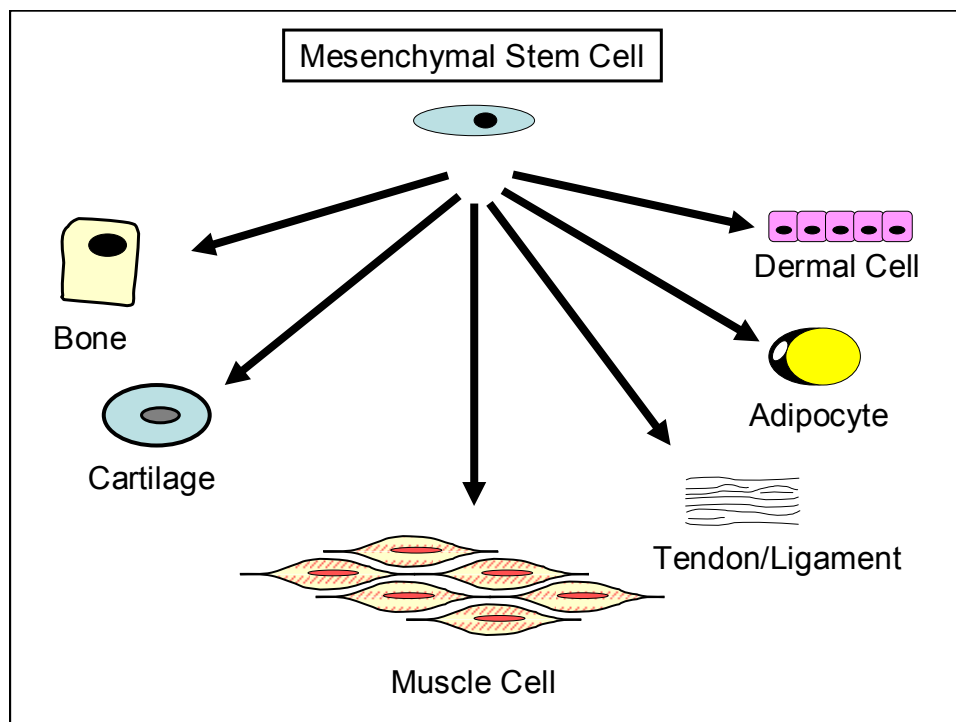


Abb. 1: Differenzierungspotentiale mesenchymaler Stammzellen

Da die Nabelschnur des jeweiligen Säuglings ohne jegliche Intervention vorliegt und mit ihr eine beträchtliche Menge an Gewebe zur Verfügung steht, halten wir dies für eine hoffnungsvolle Quelle zur Gewinnung UCSCs.

1.2. Definition der Stammzellen

Nach der strengen Definition zeichnen sich Stammzellen dadurch aus, dass sie:

- sich unlimitiert reproduzieren können
- und
- aus einer undifferenzierten in eine differenzierte und spezifische Zelle übergehen können.

Während der embryonalen Entwicklung differenzieren sich aus einer befruchteten Eizelle mehr als 200 unterschiedliche Zelltypen. Jene Zelltypen, welche in der Lage sind, einen kompletten Organismus zu generieren, werden als „*totipotente*“ Stammzellen bezeichnet. Dieses Kriterium erfüllen nur frühembryonale Stammzellen im 8-Zell-Morulastadium. Demgegenüber besitzen „*pluripotente*“ Stammzellen die Fähigkeit in alle unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen zu differenzieren, sie können jedoch keinen komplexen Gesamtorganismus generieren [5]. Auch einige Gewebe des adulten Organismus beherbergen Zellen mit hohem Regenerierungspotential, die sog. adulten Stammzellen. Typische Ursprungsgewebe dieser adulten Stammzellen sind das Knochenmark, lymphatische Organe, Fett- und Pankreasgewebe, das ZNS sowie das Epithel des Gastrointestinaltraktes [1-5].

Stammzellen des Knochenmarks können sich in hämatopoetische-, endotheliale- und mesenchymale Stammzellen differenzieren. Diese Zellen besitzen eine „**Multipotenz**“, d.h. sie verfügen über eine Differenzierungsfähigkeit in verschiedene Zelltypen ohne zugleich pluri- oder totipotent zu sein (siehe auch Tabellen 1)

- **totipotente SC:** Während der embryonalen Entwicklung differenzieren sich aus einer befruchteten Eizelle mehr als 200 unterschiedliche Zelltypen. jene Zelltypen, die in der Lage sind, einen kompletten Organismus zu generieren, werden als totipotente SC bezeichnet. Dieses Kriterium erfüllen frühembryonale SC im 8-Zell-Morulastadium.
- **pluripotente SC:** Sie besitzen die Fähigkeit sich in alle unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen zu differenzieren, sie können jedoch einen Gesamtorganismus nicht generieren (Bsp.: embryonale Stammzellen).
- **multipotente SC.** Sie verfügen über die Fähigkeit, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren ohne zugleich toti- oder pluripotent zu sein (Bsp.: SC des hämatopoetischen Systemes).
- **oligopotente SC:** Fähigkeit einer Zelle, sich in wenige Abkömmlingen differenzieren zu können (Bsp.: lymphoide und myeloide SC).
- **unipotente Zellen:** Fähigkeit einer Zelle, Zellen desselben Typus zu bilden (Bsp.: Fibroblasten).

Tab. 1: Definition der Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen können wie hämatopoetische Stammzellen Abkömmlinge aller drei Keimblätter bilden, sie liefern beispielsweise alle Formen von Binde- und Stützgewebe, quer gestreifte Muskulatur, fast alle glatten Muskelzellen und Gefäßendothelien. Mesenchymale Stammzellen können aus dem humanen Knochenmark durch Aspiration isoliert werden und stellen auf Grund ihres mesenchymalen Differenzierungspotentiales und ihrer guten In-vitro-Expansionseigenschaften eine attraktive Zellpopulation für den Einsatz mesenchymaler Gewebe in Sinne des Tissue Engineerings dar. Bezüglich ihrer Oberflächenantigenexpression sind mesenchymale Stammzellen positiv für: CD13, 29, 44, 73, 90, 105, 106, 166 und MHC-Klasse-I. Sie sind hingegen negativ für andere Oberflächenantigen wie, CD14, 34, 38, 45, sowie HLA-DR (MHC-II), CD80, CD40 und CD40L [6].

1.3. Anatomie der Nabelschnur

Die Nabelschnur – der *Funiculus umbilicalis* – stellt die Verbindung zwischen Fetus und Plazenta dar (siehe auch Abbildung 2). Er führt mit seiner Vene das sauerstoffreiche Blut aus den Zotten dem Fetus zu und leitet dessen mit „Schlacken“ beladenes Blut durch die beiden Nabelarterien wieder zum Mutterkuchen.

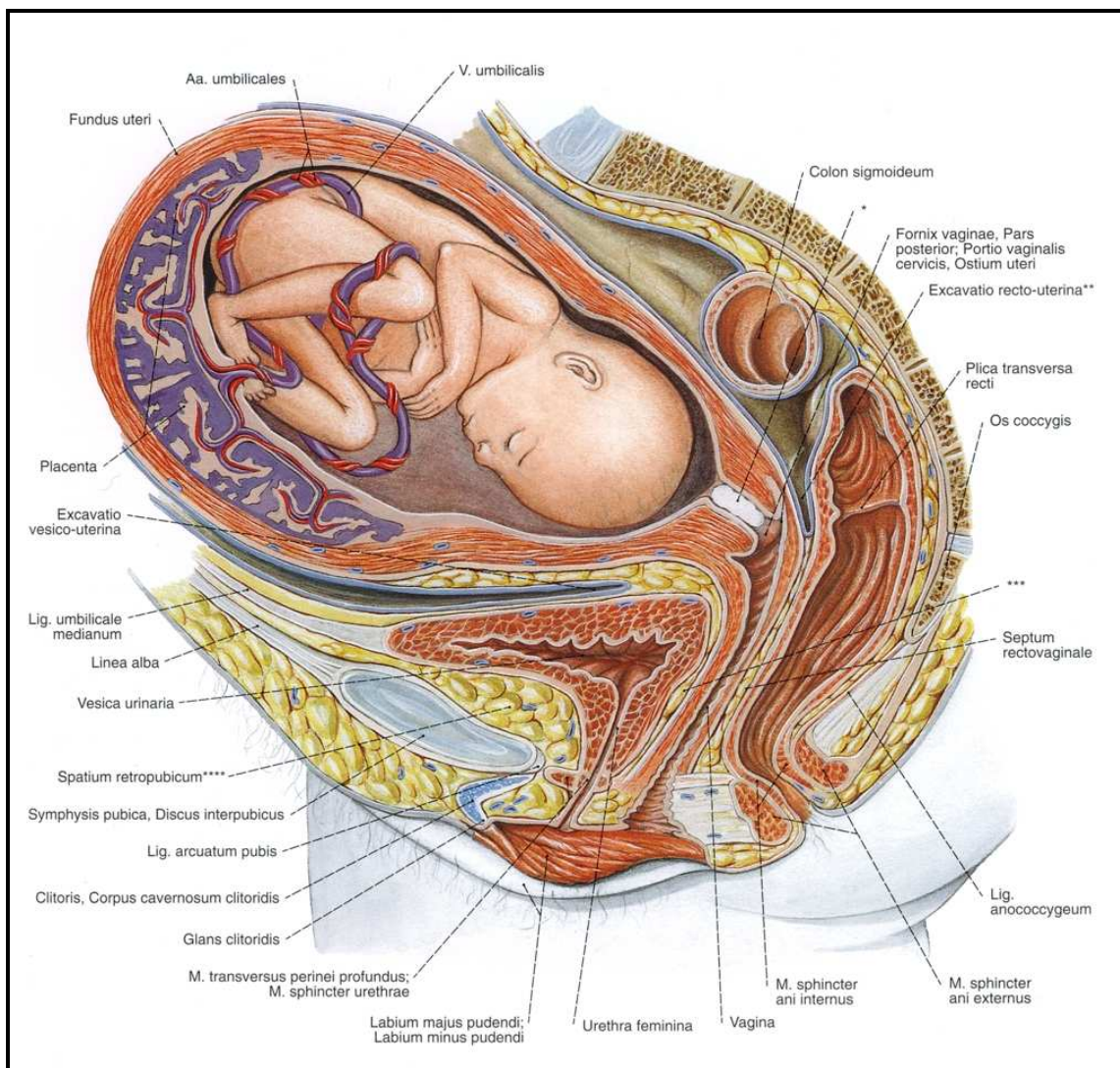


Abb. 2: Anatomisch schematische Darstellung der „Verbindung“ des Fetus mit der Mutter über den Funiculus umbilicalis (Nabelschnur; aus [7]).

1.4. Embryologie der Nabelschnur

Die Erweiterung der Eikammer durch weiteres Vorwachsen des Trophoblast in das Endometrium ist Voraussetzung dafür, dass sich Chorionhöhle und Amnionhöhle weiter entfalten können. Das gesamte Implantat wölbt sich mit der umschließenden „Decidua“ – wie der mit der Geburt „hinfällig“ werdende Teil der Unterschleimhaut (Functionalis) nun auch genannt wird – in das Uteruslumen vor. Die umschließende Decidua kann nun in eine Decidua basalis, marginalis, capsularis (zum Uteruslumen hin) und parietalis (an den nicht beteiligten Flächen des Uterus) unterschieden werden. Bis zu 4. Monat bleibt ein spaltförmiges Uteruslumen erhalten, danach verkleben Decidua capsularis und Decidua parietalis. Das Oberflächenepithel der Decidua capsularis schwindet im Berührungsbereich, danach auch das der Decidua parietalis, so daß sich aus Stroma des Endometrium und Chorion eine einheitliche Schicht als Bestandteil der „Eihäute“ oder „Fruchthüllen“ bildet.

Dort wo der Haftstiel an das Chorion grenzte, stehen Amnion und Chorion von Anfang an in geweblicher Verbindung. Diese Kontaktzone kann man in Analogie zum Amnionnabel als „Chorionnabel“ bezeichnen. Zwischen Amnionnabel und Chorionnabel bilden Haftstiel, Dottersackstiel und Nabelcoelom eine allseits von Amnion umschlossene, teilweise schlauchförmige Verbindung: *Die Nabelschnur (siehe auch Abbildung 3).*

In der Wand der Nabelschnur gehen Amnionbindegewebe und Haftstielmesoblast in ein gemeinsames Nabelschnurbindegewebe über, das nicht sehr zellreich ist. Dies nur für die Nabelschnur charakteristische Gallertgewebe wird als „Whartonsche Sulze“ bezeichnet.

Die Zellen des Nabelgallertgewebes enthalten Glycogen und sezernieren in erheblicher Maße spezifische, stark hyaluronsäurehaltige Proteoglycane mit großem Hydratisationsgrad. In der Wand der Nabelschnurgefäße kommen hingegen sulfatierende Proteoglycane vor. Aus den Nabelschnurgefäßen soll über das Gallertgewebe in erheblichem Umfang ein Austausch von Wasser, Glucose und

Elektrolyten zwischen Blut und Amnionflüssigkeit stattfinden. Das Gallertgewebe ist kapillarfrei, auch enthalten die Nabelgefäße, keine Vasa vasorum. Fehlende Zellkontakte und Interdigitationen im Endothel der Nabelgefäße werden mit der Ernährung des Gallertgewebes und dem Flüssigkeits- und Stoffaustausch in Beziehung gebracht.



Abb. 3: Menschlicher Embryo (Stadium 17, 14,8 mm) im noch geschlossenen Amnion. Deutlich ist die physiologisch torquierte Nabelschnur zu erkennen (aus [8]).

Schon früh tritt in der Nabelschnur ein schraubiger Verlauf – deutlich ablesbar in den Gefäßen – auf, von dem nicht geklärt ist, ob er aus Wachstumseigentümlichkeiten der Nabelschnur, Wachstums – oder von Druckdifferenzen der Gefäße oder von Bewegungen des Embryo herrührt. Die Einseitigkeit und Gleichsinnigkeit der Windungen (80% der Fälle entgegen dem Uhrzeigersinn) spricht gegen ihre Entstehung

allein durch Bewegungen, jedoch fehlt die Torquierung bei tierischen Feten, denen eine Rotation bei lang ausgezogenen Uterushörnern nicht möglich ist. Jedes Gefäß ist in sich torquiert. Der relative und absolute Volumenanteil der Gefäße an der Nabelschnur nimmt erheblich zu. Die Weite der Arterien wird mit 3mm, in der Vene mit 5-6mm angegeben. Die Zahl der definierten Windungen schwankt erheblich, als Extreme zum Zeitpunkt der Geburt werden 0-380 Drehungen genannt. Die Windungen sind schon früh ausgebildet, sie werden mit Verlängerung der Nabelschnur nur weiter, aber nicht zahlreicher. Als „falsche Knoten“ werden Verdickungen bezeichnet, die durch Schlingenbindungen der Gefäße oder lokale Verdickungen des Gallertgewebes entstehen. Die Länge der Nabelschnur variiert erheblich. Sie ist zunächst größer als es Ausdehnung der Amnionhöhle entspricht, aber anfangs kürzer als die Gesamtlänge des Embryo. Sie hat in der 4. Woche eine Länge von ca. 0,5 cm. In der Folge nimmt sie über 16-18 cm am Ende des 3. Monats, 33-35 cm am Ende des 5. Monats auf 50-52 cm am Geburtstermin zu. Dies sind jedoch nur durchschnittliche Werte, als Extreme beim Geburtstermin werden 18 cm und 122 cm angegeben. Als Regel für das geburtsreife Kind gilt eine Länge entsprechend der Körpergröße. Gefäßabnormalitäten der Nabelschnur sind nicht selten.

Der Ansatz der Nabelschnur an der Chorionplatte hängt von der näheren Ausbildung des Haftstiels ab. Die Insertion wird am ehesten zentral erfolgen, wenn der embryonale Pol der Blastocyste auch genau dem Implantationspol entspricht. Eine solch zentrale Insertion ist nur in 10-30% der Fälle zu finden. Die Ursache für die häufigere, verschieden stark ausgeprägte exzentrische Insertion wird in einer „atypischen“ Implantation gesehen, bei der die Blastocyste leicht rotiert, also nicht exakt mit dem embryonalen Pol voran, implantiert wurde [8].

1.5. Histologischer Aufbau der Nabelschnur

Makroskopisch lassen sich in der Nabelschnur zwei Arterien und eine Vene unterscheiden. Das umgebende gallertartige Bindegewebe wird als Wharton´sche-Sulze bezeichnet (siehe auch Abbildung 3).

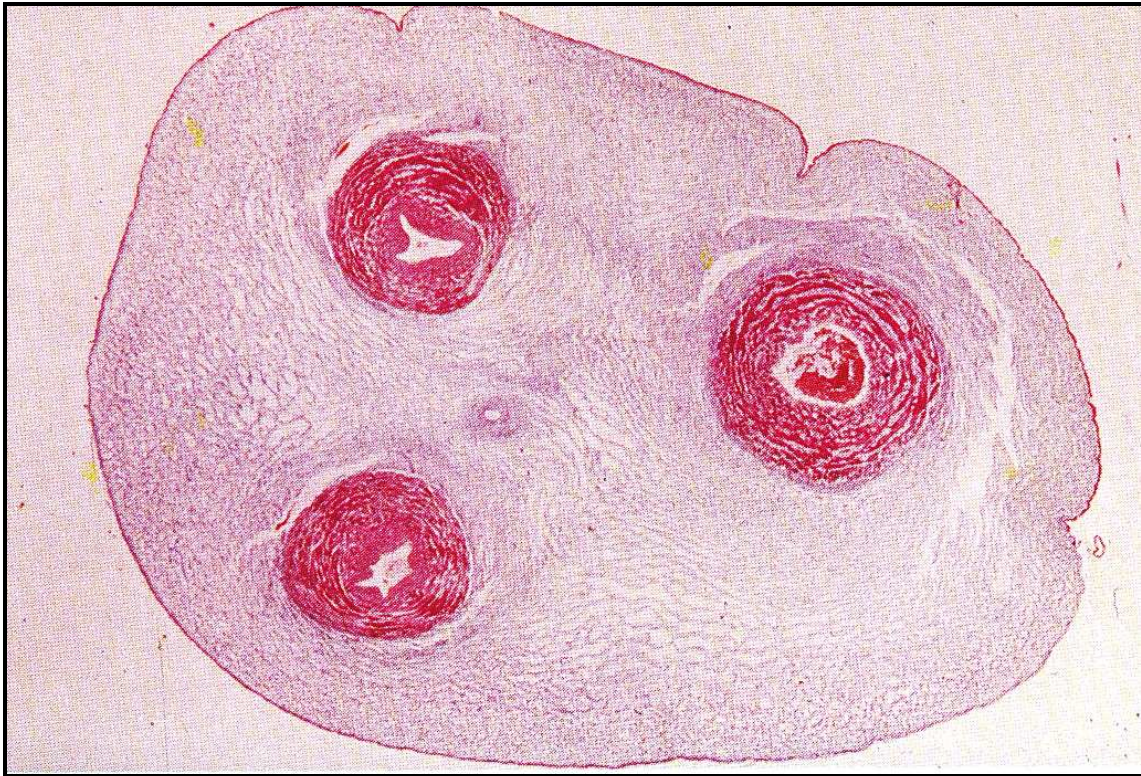


Abb. 4: Querschnitt durch die Nabelschnur eines reifen Neugeborenen. Die Oberfläche ist durch ein einschichtiges Amnionepithel bedeckt, das Innere der Nabelschnur wird von einem gefäßfreien, gallertartigen Bindegewebe, der sog. Wharton´schen Sulze, gebildet. In diese Wharton´sche Sulze sind die beiden Aa.umbilicales (links im Bild) sowie die V. umbilicalis (rechts im Bild) eingebettet (Azan-Färbung, 12fach; aus [9]).

Heute lassen sich verschiedene Arten von Bindegewebe unterscheiden. In ihrer Gesamtheit bestehen alle aus Bindegewebesubstanzen, Bindegewebefasern und Grundsubstanzen, wobei deren Mengenanteile jedoch bei den einzelnen Bindegewebearten sehr unterschiedlich sein können.

In der Wharton'schen Sulze überwiegen amorphe Grundsubstanzen. Diese bestehen v.a. aus nichtsulfatierten Glykosaminoglykanen (Hyaluronsäure). Die Grundsubstanz des Gallertgewebes ist gelartig. Eingelagert sind in die Grundsubstanz locker gebündelte Kollagenfasern sowie einzelne retikuläre Fasern (siehe auch Abbildung 5). Bei den Zellen des Gallertgewebes handelt es sich v.a. um langgestreckte, verzweigte Fibrozyten.

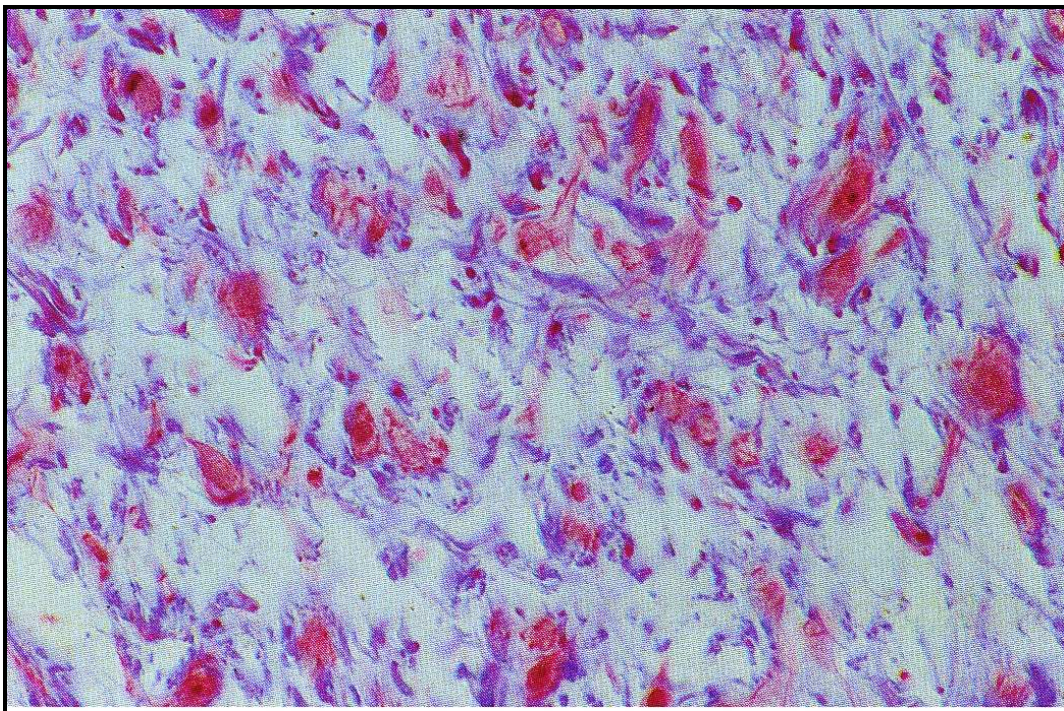


Abb. 5: Embryonales Bindegewebe aus einer reifen Nabelschnur mit Bindegewebszellen (Fibroblasten und Fibrozyten) und der homogenen gallertartigen Grundsubstanz, in der kollagene Faserchen vorkommen (Azan-Färbung, 400fach; aus [9]).

2. Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen aus der humanen Nabelschnur. In diesem Zusammenhang ergaben sich eine Reihe offener Fragen:

1. Lassen sich UCSCs in ausreichender Menge aus der humanen Nabelschnur isolieren? Vergleiche dazu Ergebniskapitel 4.1.
2. Wie viele Zellen können pro Zentimeter Nabelschnurgewebe gewonnen werden? Vergleiche dazu Ergebniskapitel 4.1.
3. Ergeben sich in Abhängigkeit von der Geburtsart unterschiedliche Isolierungsergebnisse? Vergleiche dazu Ergebniskapitel 4.2.
4. Lassen sich die isolierten Zellen zum einen kultivieren und zeigen diese Zellen zum anderen eine Adhärenz? Vergleiche dazu Ergebniskapitel 4.3.
5. Ändert sich die Zellmorphologie dieser Zellen während der Zellkultur? Vergleiche dazu Ergebniskapitel 4.4.
6. Sind die isolierten Zellen positiv für mesenchymale Stammzellmarker, wie CD13 und CD105; und negativ für hämatopoetische Stammzellmarker, wie CD14 und CD34? Vergleiche dazu Ergebniskapitel 4.5.

3. Material und Methoden

Alle Arbeiten mit der Nabelschnur und den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank (Typ Kendro-Heraeus Typ HS 12) durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in einem Inkubator der Firma Forma Science Forma®Typ 3110 gelagert, in denen eine Temperatur von 37°C mit zusätzlich 5% CO₂-Begasung und eine Luftfeuchtigkeit von 100% herrschte.

3.1. Zellgewinnung

Unmittelbar nach vaginaler Geburt oder Sectio caesarea wurde die Nabelschnur (ca. 20 cm) von termingerechten Neugeborenen (37. bis 42. Schwangerschaftswoche) in kühler physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt und innerhalb von 6h präpariert. Gemäß dem vorliegenden Ethikantrag (siehe Anlage) wurde die Einverständniserklärung der Mutter eingeholt.

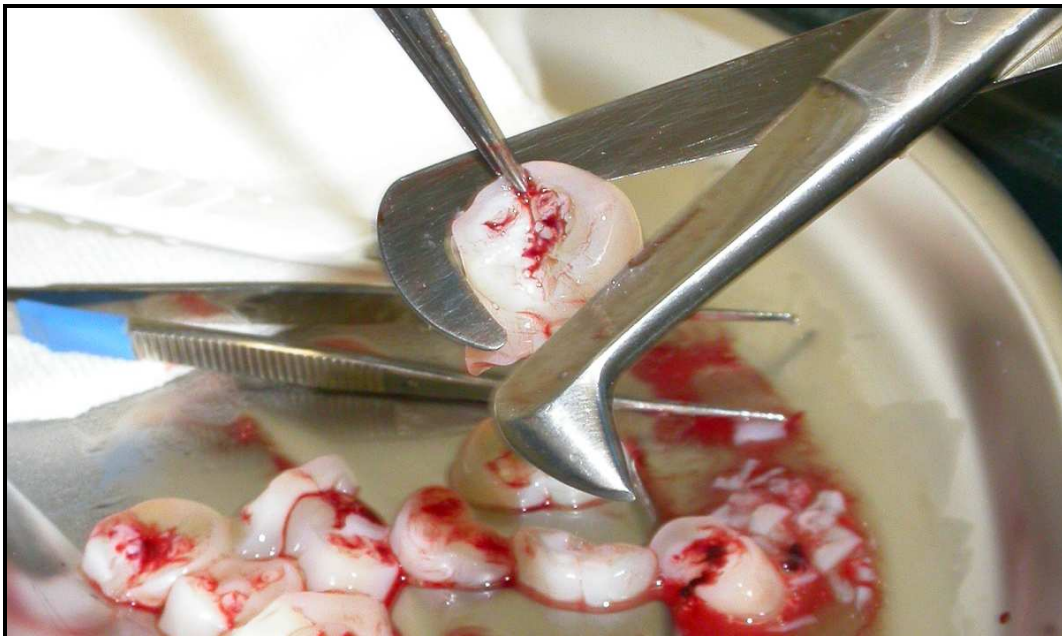


Abb. 6: Zerkleinerung der Nabelschnur in 1cm große Fragmente vor dem „picken“ der Gefäße.

Zur Isolierung der UCSC aus der Nabelschnur verwendeten wir eine von uns modifizierte Methode nach Eblenkamp et al. [10]. Nach Desinfektion des Nabelschnursegment für 30 sec. in Ethanol 70% (Firma Sigma, Deutschland) wurde die Nabelschnur dreimal mit steriler PBS-Lösung (pH: 7,21) gewaschen, 10 cm der Nabelschnur abgemessen und mit einer Schere in ca. 1 cm große Abschnitte aufgeteilt (siehe auch Abbildung 6).

Um eine Kontamination mit Gefäßendothelien zu vermeiden, wurden die die Gefäße mit einer Pinzette aus der Wharton'schen Sulze heraus -„gepickt“. Das übrige Gewebe der Nabelschnurscheiben wurde mit einem Scapel weiter in ca. 0,5 mm dicke Fragmente zerkleinert (siehe Abbildung 7).



Abb. 7: Zerkleinertes Nabelschnurgewebe vor der enzymatischen Digestion.

Die so gewonnenen Gewebsfragmente wurden anschließend für 3 h bei 37°C in einem Schüttelwasserbad in einer Enzymlösung (2 ml/cm Nabelschnur) verdaut, die 4 mg/ml Collagenase II (Fa. Worthington, UK, 290 U/ml), 0,2 mg/ml Sojabohnen-Trypsin-

Inhibitor (Fa. Sigma, Deutschland), 2,0 mg/ml Hyaluronidase II (Fa. Worthington UK, 730 U/mg), 4 mg/ml BSA (Fa. Sigma, Deutschland) und 200 µg/ml DNase II (Fa. Sigma, Deutschland, 3000–8000 U/mg Protein) enthielt.

Die so nach drei Stunden gewonnene Lösung wurde anschließend 1:10 mit PBS (pH: 7,21) verdünnt, und durch eine Bluttransfusionsleitung, welche einen internen Nylonfilter mit einer Porengröße von 200 µm besitzt (siehe Abbildung 8), filtriert und anschließend bei 300 g für 10 min zentrifugiert.



Abb. 8: Filtration der Enzym-/Gewebelösung durch ein handelsübliches Blut-Transfusionset.

Das so gewonnene Zellpellet wurde anschließend erneut einmal mit PBS gewaschen, ein zweites mal für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert, der Überstand erneut abgesaugt und mit 20 ml Kultur-Medium resuspendiert und in eine 200 ml Zellkulturflasche überführt.

3.2. Zellkultur

In Anlehnung an [10] wurde ein modifiziertes Zellkulturmedium (KM) verwendet. Hierzu wurden 300 ml DMEM High Glucose (w/o L-Glutamine w/ Na Pyruvate; Cell Concepts, Deutschland) mit 200 ml MCDB 105 Medium (Fa. Sigma, Deutschland) gemischt. Zusätzlich wurde dem Medium 50 ml hitzeinaktiviertes FCS (Cell Concept, Deutschland) und 5 ml Penizilin-Streptomizin (Cell Concept, Deutschland) hinzugefügt. Die Zellen wurden nach der Isolierung im o.g. Kulturmedium in handelsüblichen unbeschichteten 100ml Zellkulturflaschen ausgesät. Täglich wurde ein Teil des Kulturmediums ausgetauscht, um nicht adhärente Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 70-80% erreichten, wurden die Zellen nach einem Standardprotokoll gesplittet.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach einem Standardprotokoll in einer Neubauerzählkammer.

3.3. Methoden zur Zellidentifikation

3.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung):

Nach Azetonfixierung der Gefrierschnitte für 5 min, erfolgte für 30sec die Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (Best. Nr. 1,09249,0500, Firma Merck, Darmstad). Danach wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gebläut und anschließend mit Aqua dest. gespült. Die Gegenfärbung erfolgte 10 min mit einer 1%igen Eosinlösung (Best. Nr.1,15935,0025, Firma Merck). Nach kurzem Spülen mit Leitungswasser und Aqua dest. wurden die Schnitte mit Alkohol (4 x je 1 min aufsteigende Alkoholreihe) und anschliessend mit Xylol (2 x je 20 min, Best. Nr. 1,08685,2500, Firma Merck) entwässert. Die Einbettung erfolgte konventionell mit dem Schnelleinbettmedium Pertex (Firma Mediete GmbH, Burgdorf).

3.3.2. Immunhistologie:

Die im Rahmen der Isolierung aus der humanen Nabelschnur gewonnenen adhärennten Zellen, wurden mit Hilfe human-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAk) auf das Vorkommen mesenchymaler Stammzellmarker untersucht.

Monoklonale Antikörper:

Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellmarkern (CD34), keine spezifischen Stammzellmarker kommerziell zur Verfügung standen, wurden die Zellen in Anlehnung an die Literatur [10-15] auf das Vorkommen verschiedener Zelloberflächenmarker (wie z.B.: CD13, CD28, CD29, CD44, CD51, CD73, CD90, CD105, CD106) hin untersucht, die in ihrer Gesamtheit für das Vorliegen mesenchymaler Stammzellen sprechen [10-15]. In unserem Versuchsaufbau wählten wir die mAk gegen CD13 und CD105, da sie nach den Angaben der Literatur am Aussagekräftigsten sind. Quasi als Negativkontrolle verwendeten wir zusätzlich den mAk gegen CD14 und CD34, welcher spezifisch für hämatopoetische Stammzellen ist. Die Tabelle 2 zeigt die in der Immunhistochemie eingesetzten humanspezifischen mAk. Alle mAk wurden mit Hilfe eines Antikörperverdünnungsmedium (Firma Dako, Hamburg) in der in Tabelle 2 angegebenen Konzentration verwendet.

mAK (mouse anti human)	Ak-Klon	Firma	Verdünnung
Fibroblasten	5B5	Biomedica, USA	1:100
CD13	WM-47	Biotrend, Germany	1:50
CD14	B365.1	Biomedica, USA	1:100
CD34	QBEND-10	Biotrend, Germany	1:100
CD 105	SN6h	Biotrend, Germany	1:25

Tab. 2: Verwendete human-spezifische monoklonale Antikörper

Biotin-Streptavidin-Amplifikations-Nachweissystem:

Die Affinität von Streptavidin und Biotin ist im Vergleich zu der eines Antikörper-Enzymkomplexes über eine Million mal stärker. Diese meist irreversible Bindung wird im Biotin-Streptavidin-System genutzt, um für eine beträchtlich höhere Bindungskapazität zwischen einem biotinylierten Link-Antikörper und Streptavidin zu sorgen. Hiermit ergibt sich gegenüber der indirekten Methode (Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper) eine höhere Empfindlichkeit. Nachdem die Schnitte 10 min in Azeton bei Raumtemperatur (RT) fixiert und die Objektträger (OT) anschließend für ca. 15 min getrocknet wurden, wurden die Zellen mit einem Diamantstift umrandet, um sie später bei einzelnen Reaktionsschnitten auf den nassen Objektträger besser erkennen zu können. Nach 3x Waschen der OT mit PBS (pH: 7,6) auf dem Schüttelgerät, erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mit Hilfe eines Methanol-Wasserstoffperoxid-Gemisches (200 ml Methanol + 5 ml 30%iges H₂O₂, 15 min bei RT), um mögliche spätere unspezifische DAB-Reaktionen auszuschließen. Danach wurden die OT wiederum 3x mit PBS gewaschen. Vor dem Aufbringen des Primärantikörpers wurde auf die OT für die Dauer von 10-15 min bei 37°C im Brutschrank noch ein Proteinblock (Normal-Human-Serum) aufgetragen, um mögliche unspezifische Antikörperreaktionen zu verhindern. Die Primärantikörper wurden mit Hilfe eines hintergrundreduzierenden Antikörpermediums (Firma Dako, Hamburg; Code-No. S 3022) verdünnt, auf die Gefrierschnitte aufgetragen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Danach wurden die OT erneut 3x mit PBS gespült. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Multi-Link-Antikörper (Firma Biogenex, Cat. No. QP 900-9L) auf die Zellen aufgetragen und 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die OT erneut 3x mit PBS gewaschen wurden, wurde der „Tertiärantikörper“, ein Peroxidase-konjugierter-Streptavidin Super-Sensitive-Label (Firma Biogenex, Cat.-No. QP 900-9L), auf die OT aufgetragen und für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden erneut 3x mit Tris-NaCl (pH 7,4) gewaschen und anschließend in PBS (pH 7,4) überführt. Als Peroxidasesubstrat wurde in 10 ml PBS (pH 7,4) und 10 µl 30%igem H₂O₂ gelöstes 3,3-Diaminobenzidin (DAB, Cat.-Nr. 18865, Firma Serva, Heidelberg) verwendet, welches durch die enzymatische Wirkung der Peroxidase in

einen dunkeln Farbstoff umgewandelt wird. Nach erneutem 3 x Spülen der OT mit PBS und Aqua dest. erfolgte die Kernfärbung mit Hämalaun (nach Mayer, Cat.-No. 1,09249,0500, Firma Merck). Nach dem „Bläuen“ der Schnitte mit Leitungswasser und Aqua dest. wurden die Objektträger mit Alkohol (4 x je 1 min aufsteigende Alkoholreihe) und anschließend mit Zylol (2 x je 20 min) entwässert und auf konventionelle Art mit dem Schnelleinbettmedium Pertex eingebettet.

3.4. Erhebung der Messdaten und ihre Auswertung:

Die lichtmikroskopische Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Schnitt- und Vitalpräparate erfolgte an einem BX 50 Lichtmikroskop Firma Olympus.

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Exel analysiert und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet. Signifikanzbestimmungen der Daten erfolgten mit Hilfe des Student-t-Testes. Nicht signifikante Ergebnisse wurden mit n.s. (= nicht signifikant) angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Isolierungsergebnisse

UCSC lassen sich mit der unter Punkt 3.1. beschriebenen enzymatischen Methode aus dem Nabelschnurgewebe termingerechter Neugeborener isolieren (siehe auch Abbildung 9). Die durchschnittliche Ausbeute lag im Mittel bei $0,727 \times 10^6$ Zellen $\pm 0,4 \times 10^6$ Zellen pro cm Nabelschnurgewebe (NSG).

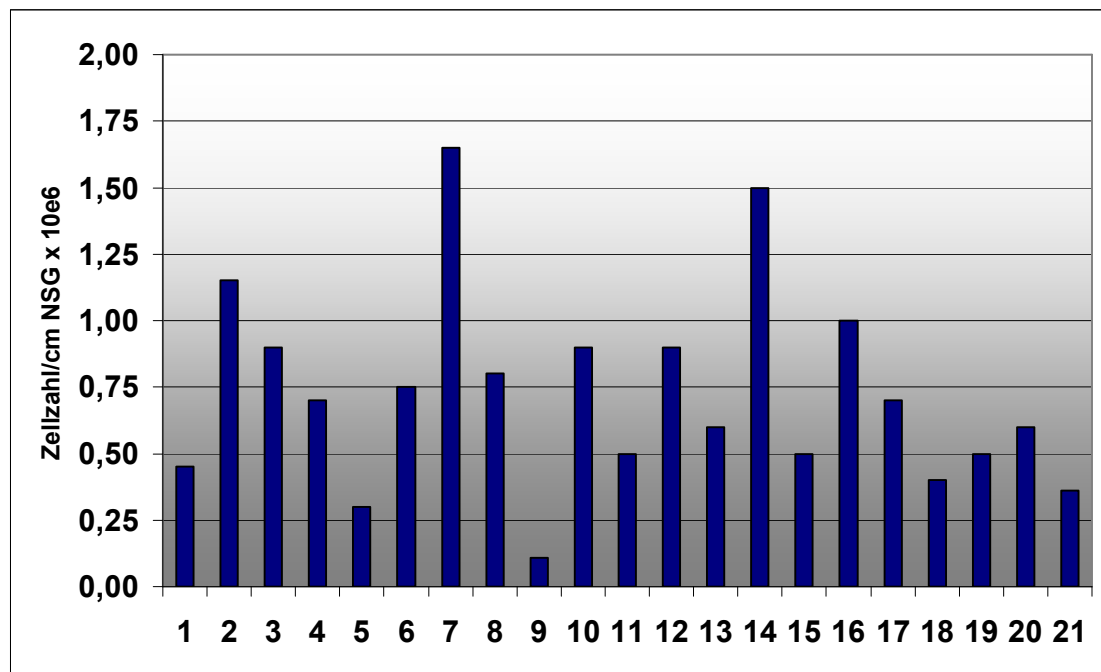


Abb. 9: Isolierungsergebnisse in chronologischer Reihenfolge (Zellzahl pro cm Nabelschnurgewebe $\times 10^6$).

Auffällig ist die große Varianz der Zellausbeute, trotz in etwa gleichem Schwangerschaftsalter zum Zeitpunkt der Geburt und gleicher Ischämiezeit bis zur Aufarbeitung des Nabelschnurgewebes. Diese Varianz der einzelnen Isolierungsausbeute scheint hierbei Ausdruck der deutlichen individuellen Unterschiede im Kaliber der einzelnen Nabelschnüre zu liegen (siehe auch Abbildung 10).



Abb. 10: Individuelle Varianz in der Dicke zweier Nabelschnüre termingerechter Neugeborener.

Insgesamt ist die Zellausbeute aus der Nabelschnur jedoch sehr zufrieden stellend. Aufgrund der Menge des zur Verfügung stehenden Materiales – die Länge der Nabelschnur beträgt zum Zeitpunkt der Geburt ca. 60 cm – ist die mögliche Anzahl der zu gewinnenden UCSCs pro Nabelschnur mit $> 40 \times 10^6$ Zellen sehr hoch.

4.2. Isolierungsergebnisse in Abhängigkeit der Geburtsart

Während in der Gruppe der vaginal entbundenen Kinder (VG) die kalte Ischämie der Nabelschnüre bis max. 12h betrug, wurden die UCSCs im Rahmen einer Sectio caesaria (SC) direkt nach der Entbindung isoliert.

So betrug die durchschnittliche Zellausbeute in der SC-Gruppe $0,63 \times 10^6$ Zellen pro cm Nabelschnurgewebe, während der Durchschnittwert in der VG-Gruppe bei $0,78 \times 10^6$ Zellen pro cm Nabelschnurgewebe. Diese Werte zeigten in der statistischen Auswertung im Student-t-Test keine signifikanten Unterschiede (siehe auch Abbildung 11).

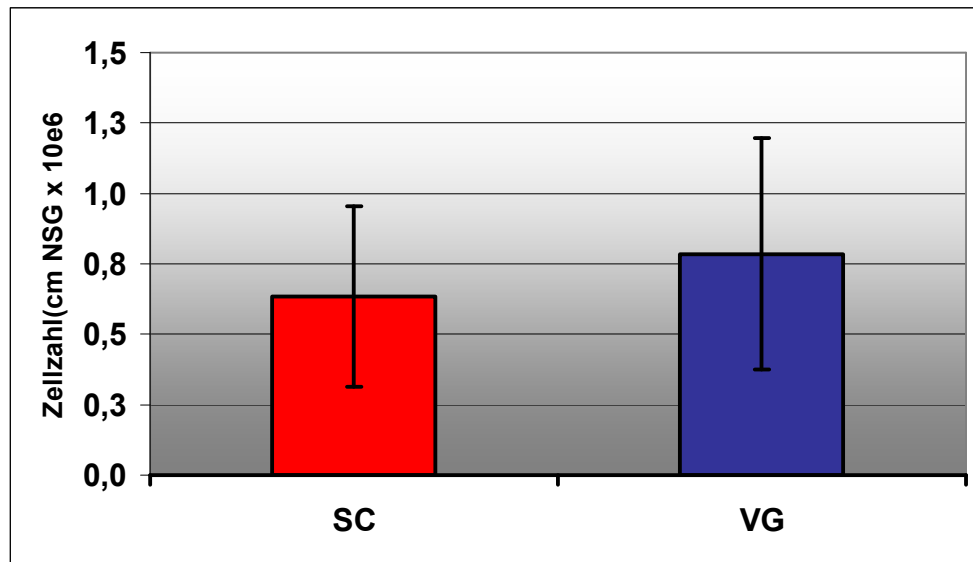


Abb. 11: Isolierungsergebnisse in Abhängigkeit der Geburtsart (SC = Sectio Caesaria, VG = vaginale Geburt; Ergebnisse: n.s.).

Diese Ergebnisse belegen, dass die Art der Entbindung sowie die kalte Ischämiezeit keinen direkten Einfluss auf das Isolierungsergebnis haben. Wir gaben jedoch im weiteren der SC den Vorzug, da hier von einem steril gewonnenen Gewebe ausgegangen werden kann, welches sich besser für die anschließende Zellkultur eignet.

4.3. Anzahl der adhärennten Zellen

Neben der individuellen Zellausbeute stellte sich die Frage, wie viele der isolierten Zellen nach der ersten Passage eine Adhärenz zeigen. Drei Tage nach Primärkultur erfolgte die erste Passage der Zellen. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu den

Isolierungsergebnissen, dass im Durchschnitt 44,06% +/- 16% der Zellen eine Adhärenz zeigten.

4.4. Morphologischer Differenzierungsverlauf der UCSC in der Zellkultur

Zum Zeitpunkt der Isolierung (T=0) fanden sich in der primären Kultur neben vielen Erythrozyten, die UCMSs als runde Zellstrukturen (siehe auch Abbildung 12), welche bereits nach wenigen Stunden eine deutliche Adhärenz zum Boden der Zellkulturflaschen zeigten.

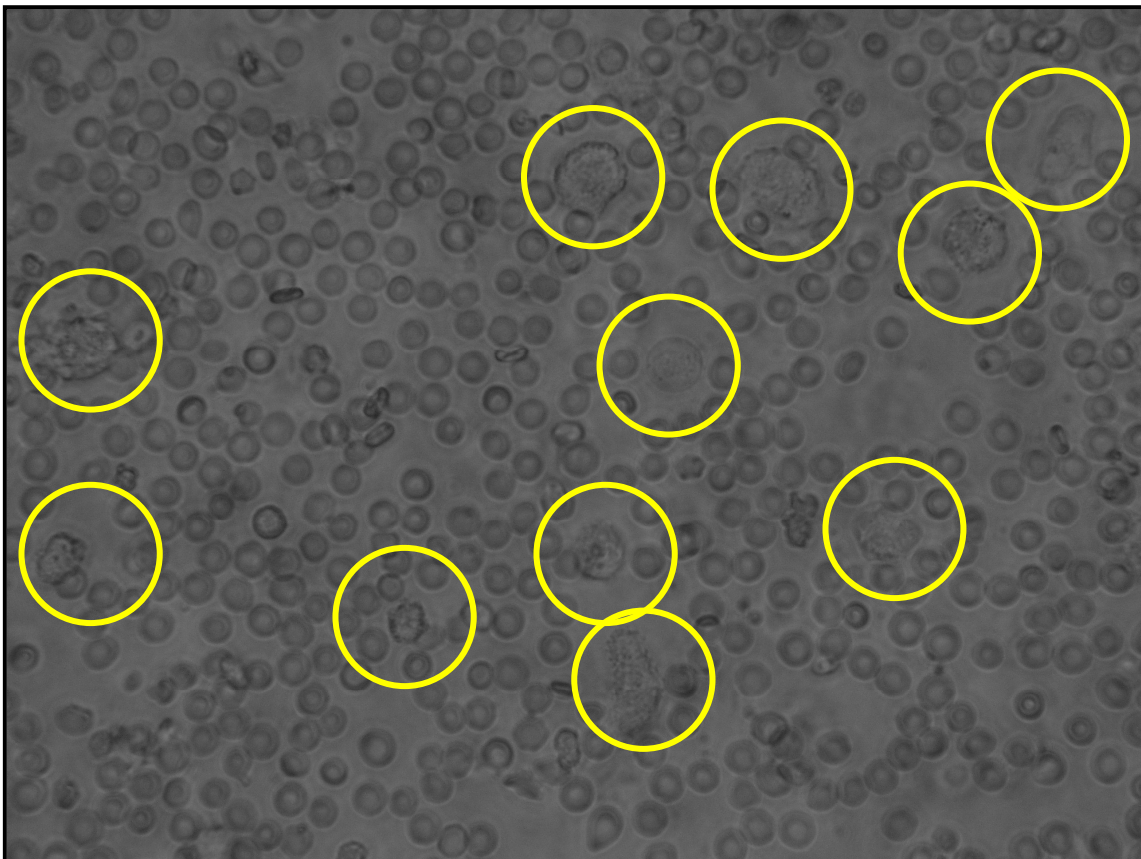


Abb. 12: Mikroskopisches Ergebnis direkt nach der Isolierung. UCSCs (große Kreise) zwischen multiplen Erythrozyten.

Bereits nach dem ersten Tag in der Zellkultur zeigten die UCMSs ihren charakteristischen, zumeist sternförmigen Aspekt mit scharfen Zellgrenzen und

zipfeligen Zellausläufern sowie einer feinen perinukleären konzentrierten Granula (siehe auch Abbildung 13 und 14).

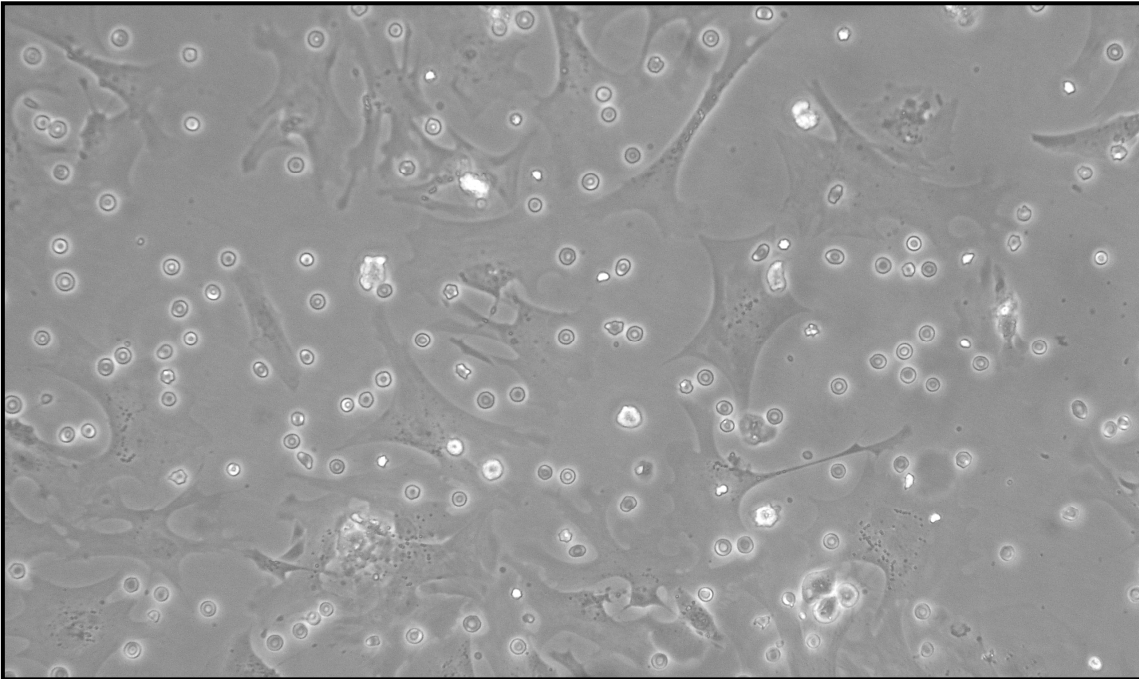


Abb. 13: Zellmorphologie am Tag +1 nach Isolierung.

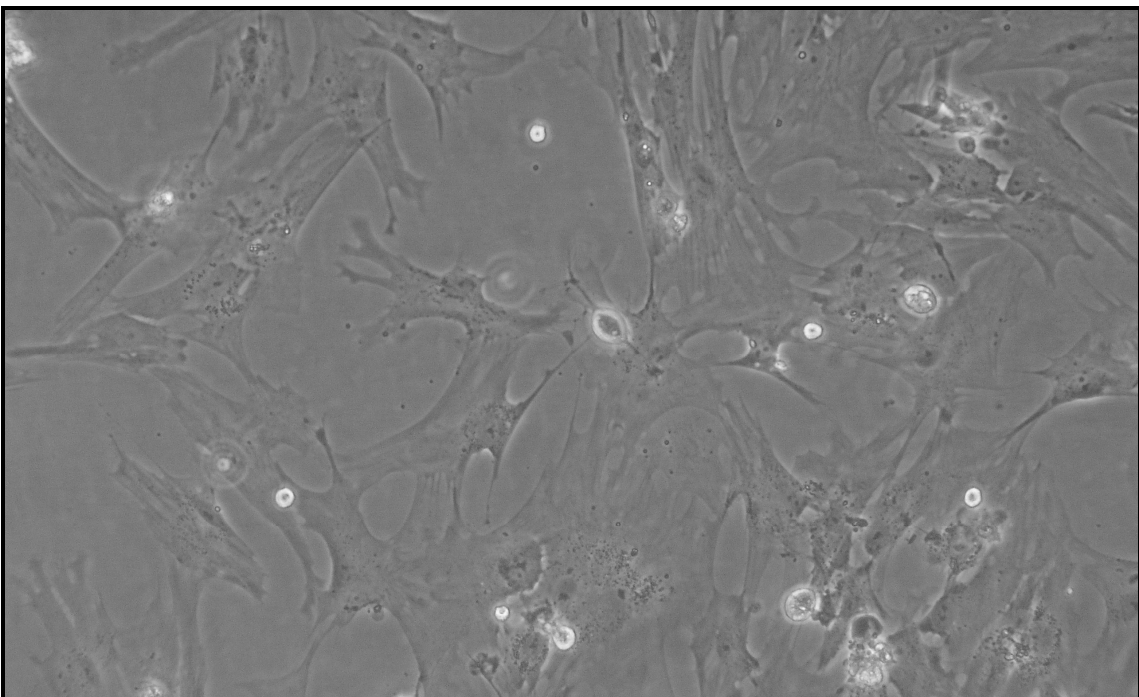


Abb. 14: Zellmorphologie am Tag +3 nach Isolierung.

Nach der ersten Passage änderte sich die charakteristische Morphologie der primären UCSCs. Die Zellen zeigten eine vermehrte Granulierung sowie eine Elongation des Zytoplasmas (siehe auch Abbildung 13 und 14). Das Auftreten von spindelförmigen Zellen mit einem breiten, flossenartigen sowie spitz zulaufenden Pol weist auf einen migratorisch aktiven Zelltyp hin. Darüber hinaus besitzen zahlreiche Zellen mit einem Saum aus membranständigen Vesikeln einen sekretorischen Phänotyp (siehe auch Abb.15).

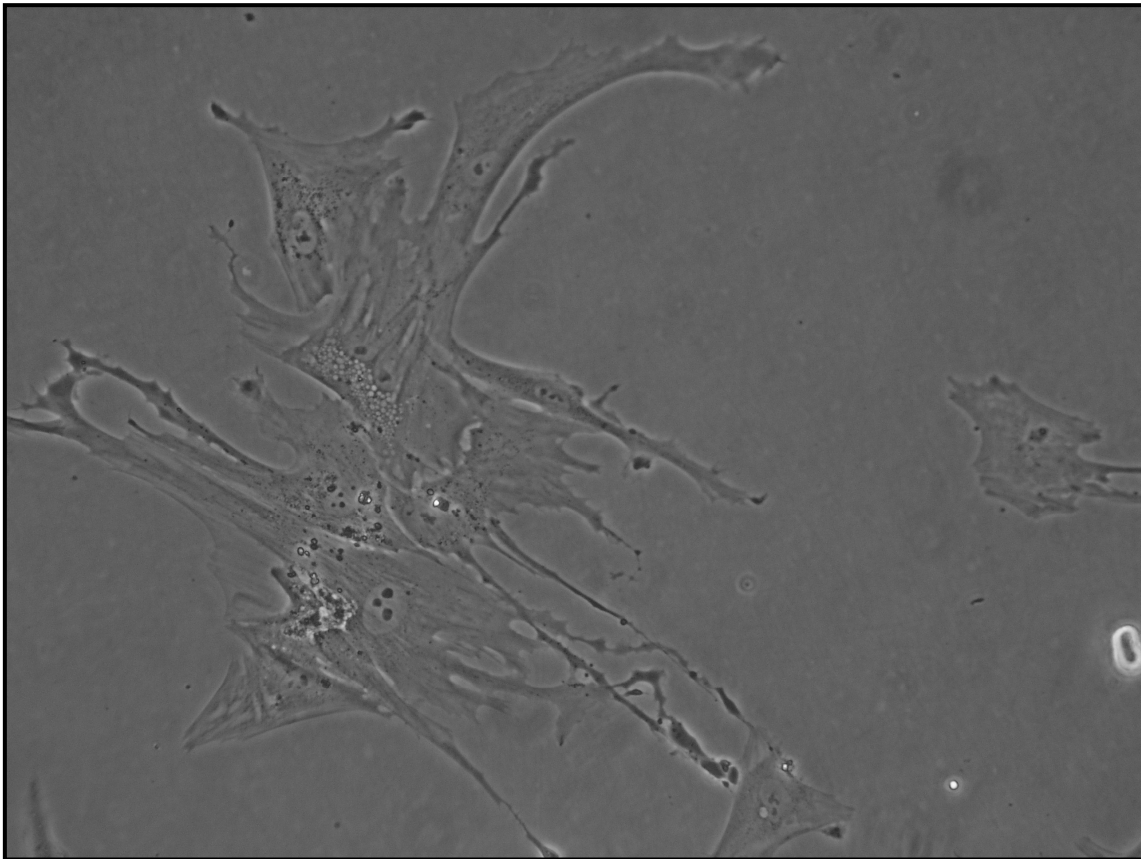


Abb. 15: Sekretorischer Phänotyp der UCSCs am Tag +7 nach Isolierung.

Im weiteren Verlauf zeigte ein Teil der Zellen in der Kultur (Tag + 22) eine für Osteoblasten typische Zellmorphologie, mit den so genannten „bone nodule“ (siehe auch Abbildung 16).

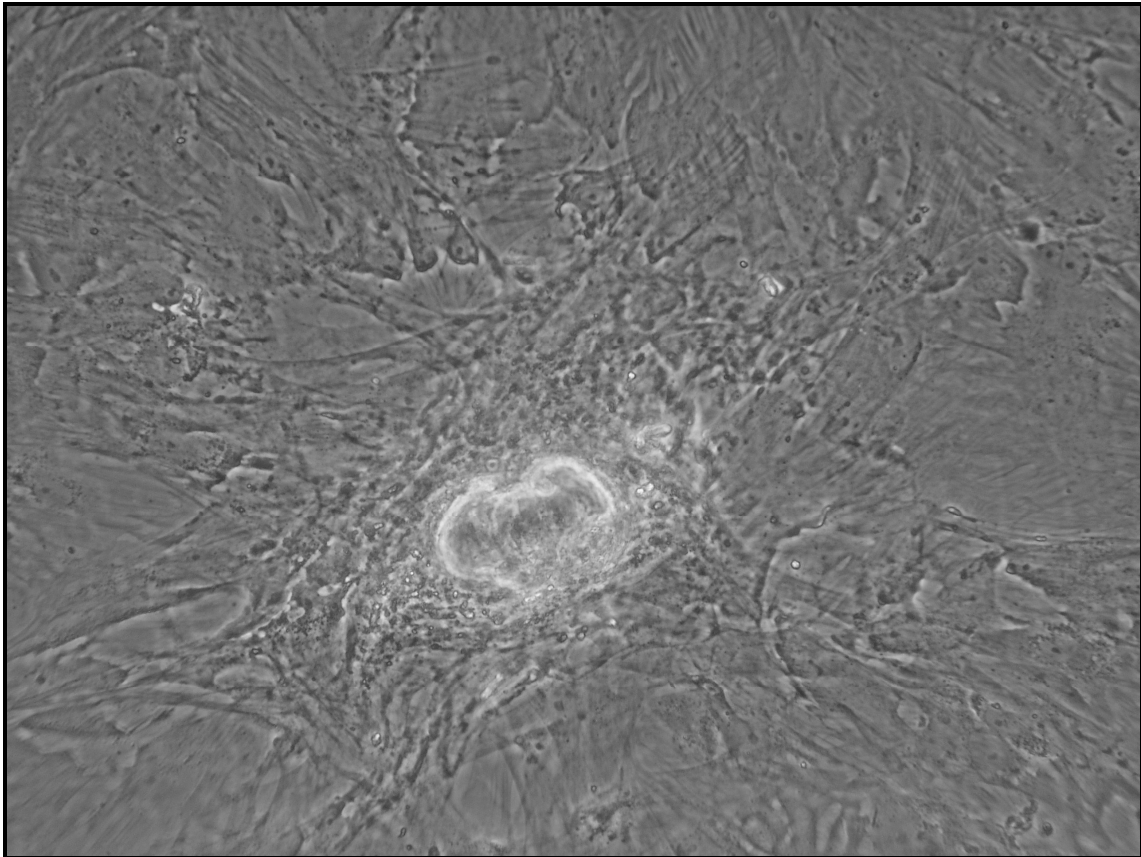


Abb. 16: Osteoblasten ähnliche Morphologie der UCSCs am Tag + 22 nach Isolierung.

Diese zellmorphologische Veränderung der UCSCs i Richtung Osteoblasten zeigte sich ab dem Tag +7 nach Isolierung. Zunächst traten nur vereinzelt Zellen in der Kulturflasche auf, mit Zunahme der Kulturzeit konnten nach ca. 20 Tagen in der Regel xx Zellen pro Kulturflasche nachgewiesen werden.

Neben dieser osteoblastären Differenzierung der UCSCs zeigte sich zusätzlich noch eine Differenzierung in Richtung der Adipozyten. So zeigten sich ebenfalls in der Langzeitkultur am Tag +22 vereinzelte Zellen mit multiplen Vakuolen (siehe auch Abbildung 17).



Abb. 17: Differenzierung der UCSCs in Adipozyten (Tag +22 nach Isolierung)

4.5. Histologische und Immunhistochemische Analyse der UCSCs

4.5.1 Hämatoxylin-Färbung

In der konventionellen Histologie zeigten die UCSCs eine den Fibroblasten ähnliche Morphologie, mit einem zumeist sternförmigen Aussehen und scharf begrenzten Zellgrenzen (siehe auch Abbildung 18).

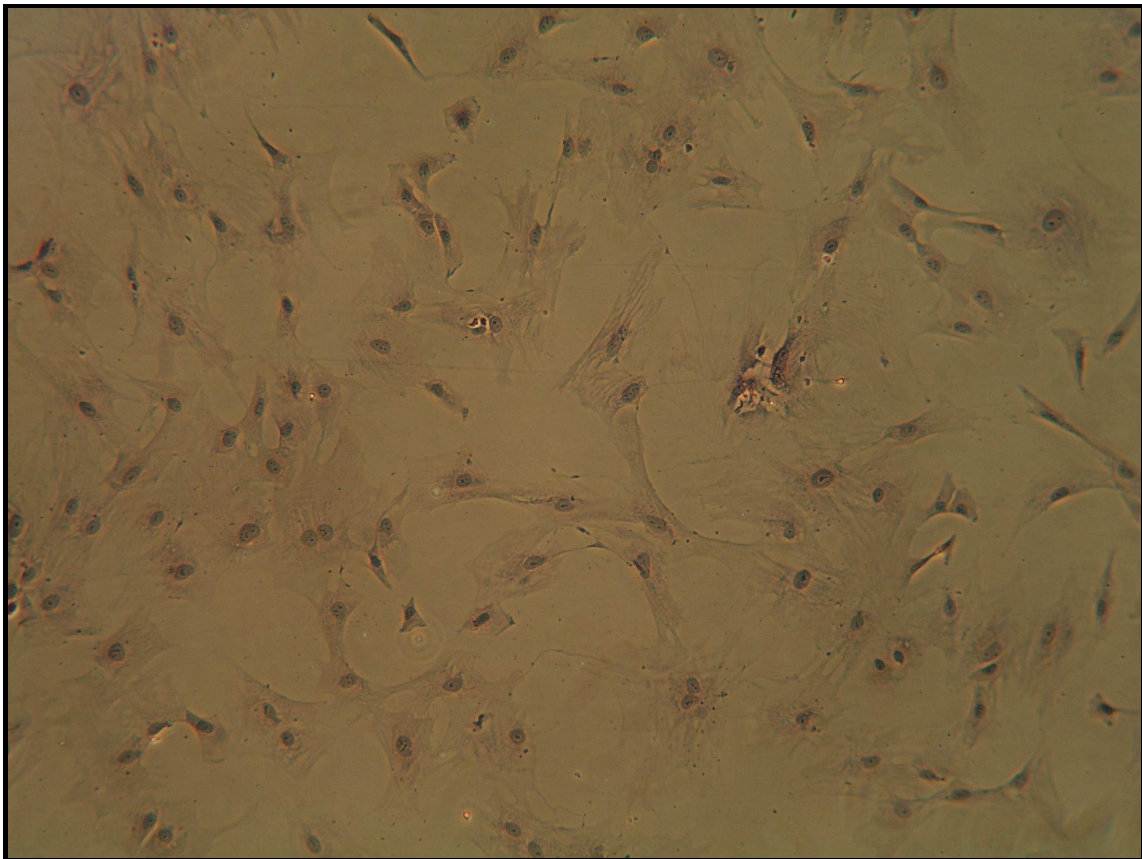


Abb. 18: Fibroblastoides Zellwachstum der UCSCs (H&E-Färbung)

Zusätzlich zeigten sich die für fibroblastoide Zellen typischen Zellausläufer, sowie eine feine Granulation. Vereinzelt Zellkerne befanden sich in der Mitose, als Ausdruck einer hohen Proliferationsrate der Zellen.

4.5.2. Immunhistochemie (Anti Fibroblasten-Ak)

In der immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen humane Fibroblasten waren fast 100% der primäre UCSCs deutlich positiv (siehe Abbildung 19).

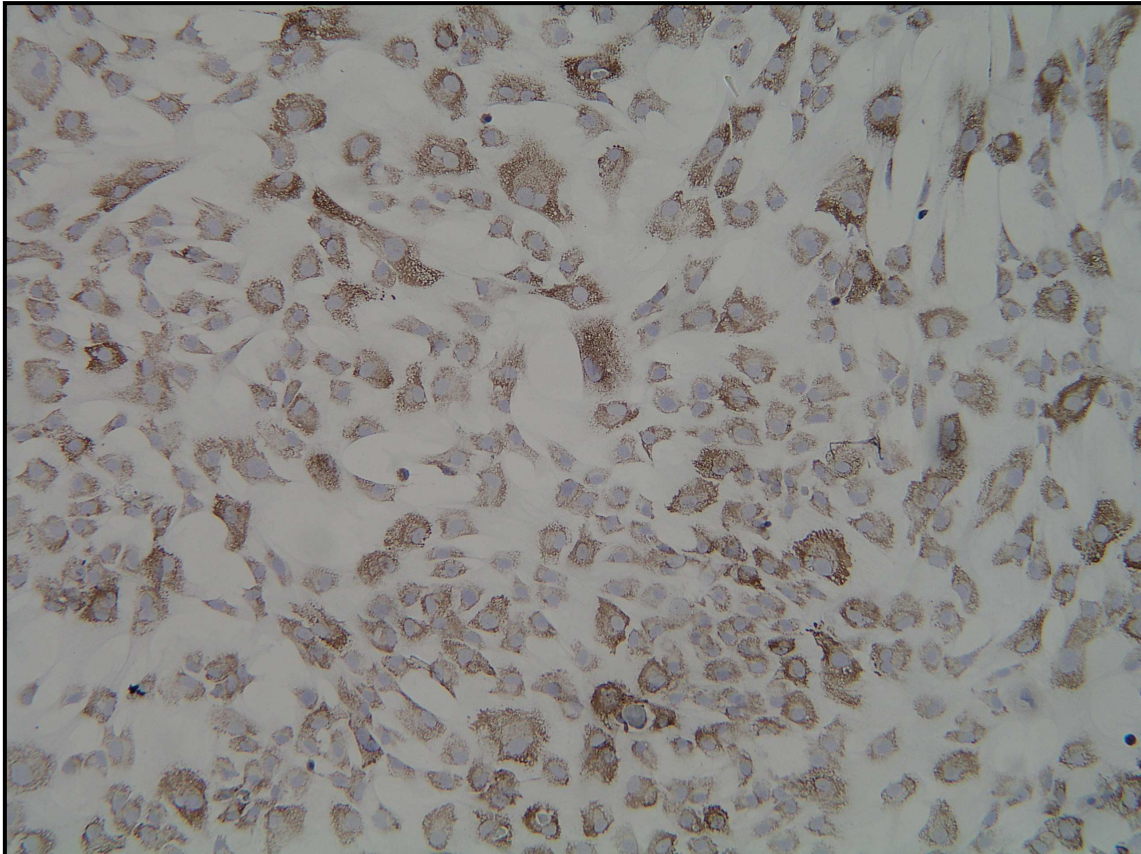


Abb. 19: Immunhistochemische Färbung der UCSC gegen humane Fibroblasten .

Da nach den Literaturangaben davon auszugehen ist, dass es sich bei den primären UCSCs um Myofibroblasten handelt [10], ist es nicht verwunderlich, dass nahezu 100% der Zellen positiv reagierten.

4.5.3. Immunhistochemie (Anti CD 13)

Da es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine kommerziellen Marker für mesenchymale Stammzellen zur Verfügung standen, wählten wir geeigneter aus der Gruppe der mesenchymalen Zellmarker (wie z.B. CD 13, 28, 29, 33, 44, 51, 71, 90, 105, 106 und 166) die Antikörper aus, welche am viel versprechensten auf das Vorkommen UCSCs hinweisen. So zeigte sich in der Immunhistologie mit einer Färbung gegen anti CD 13 eine Vielzahl positiver Zellen (siehe Abbildung 20).

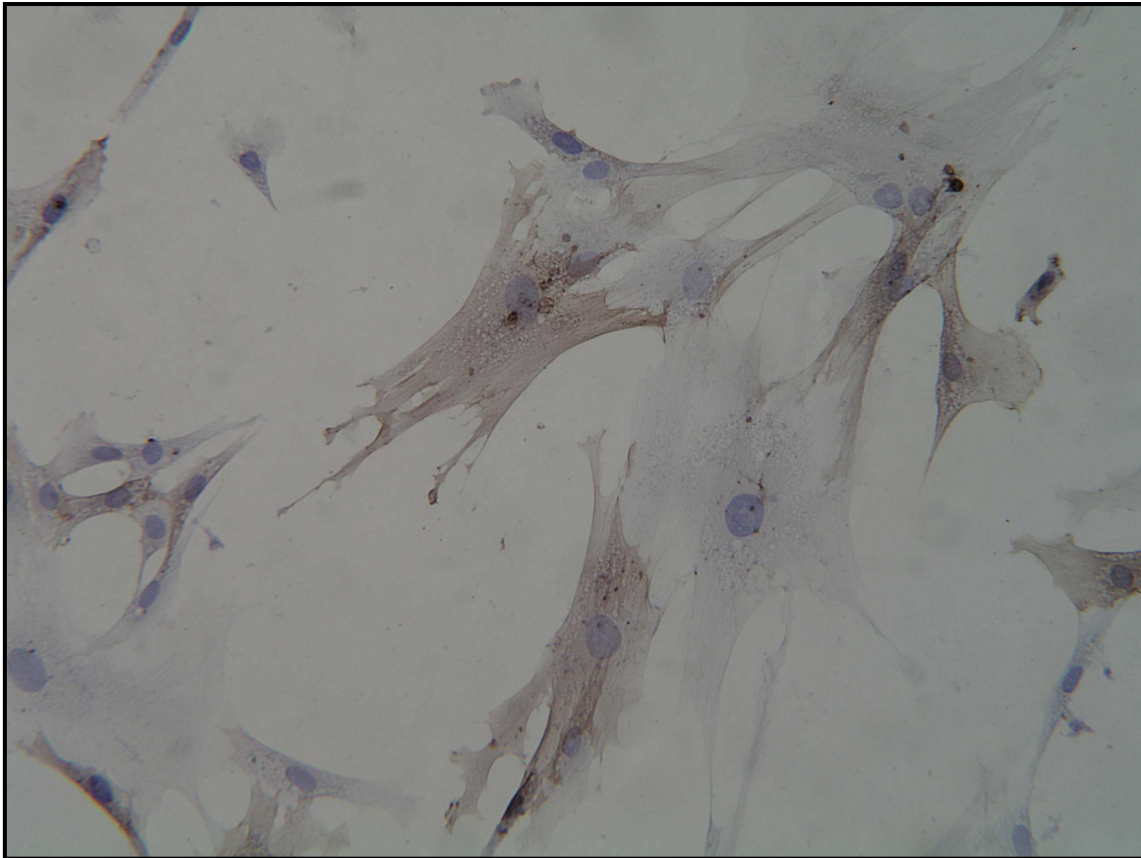


Abb. 20: Immunhistochemische Färbung der UCSCs gegen CD13.

4.5.4. Immunhistochemie (Anti CD 105)

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in einer immunhistologischen Färbung mit einem Antikörper gegen CD 105 (siehe Abbildung 21).

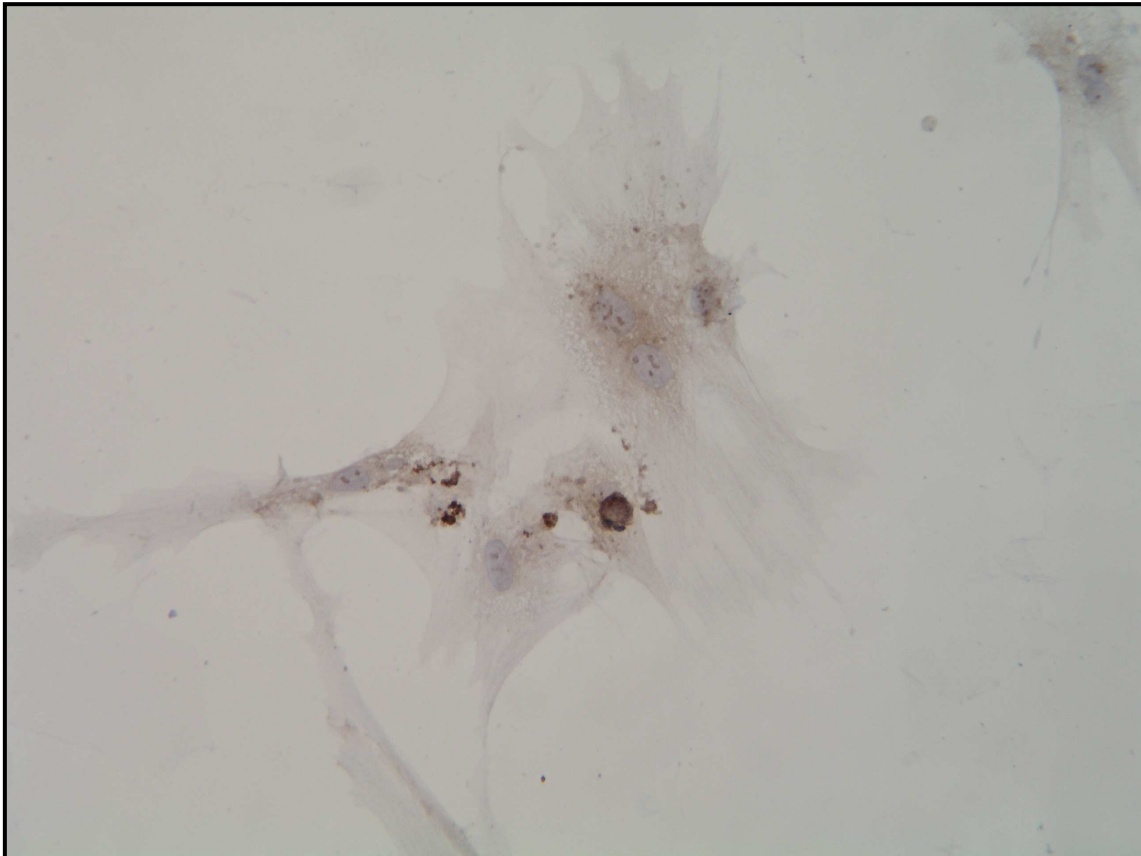


Abb. 21: Immunhistochemische Färbung der UCSCs gegen CD105.

4.5.5. Immunhistochemie (Anti CD 14 und CD 34)

Um eine „Verunreinigung“ der Zellkultur mit hämatopoetischen Stammzellen, welche ebenfalls aus dem fetalen Blut und den fetalen Gefäßen isoliert werden können, auszuschließen, erfolgte quasi als negative Kontrolle die immunhistochemische Färbung mittels zweier für die hämatopoetischen Stammzellen charakteristischen Oberflächenmarker (CD14 und CD34).

Beide Antikörper zeigten erfreulicherweise keinen Hinweis für das Vorliegen hämatopoetischer Stammzellen (siehe Abbildung 22 a und b).

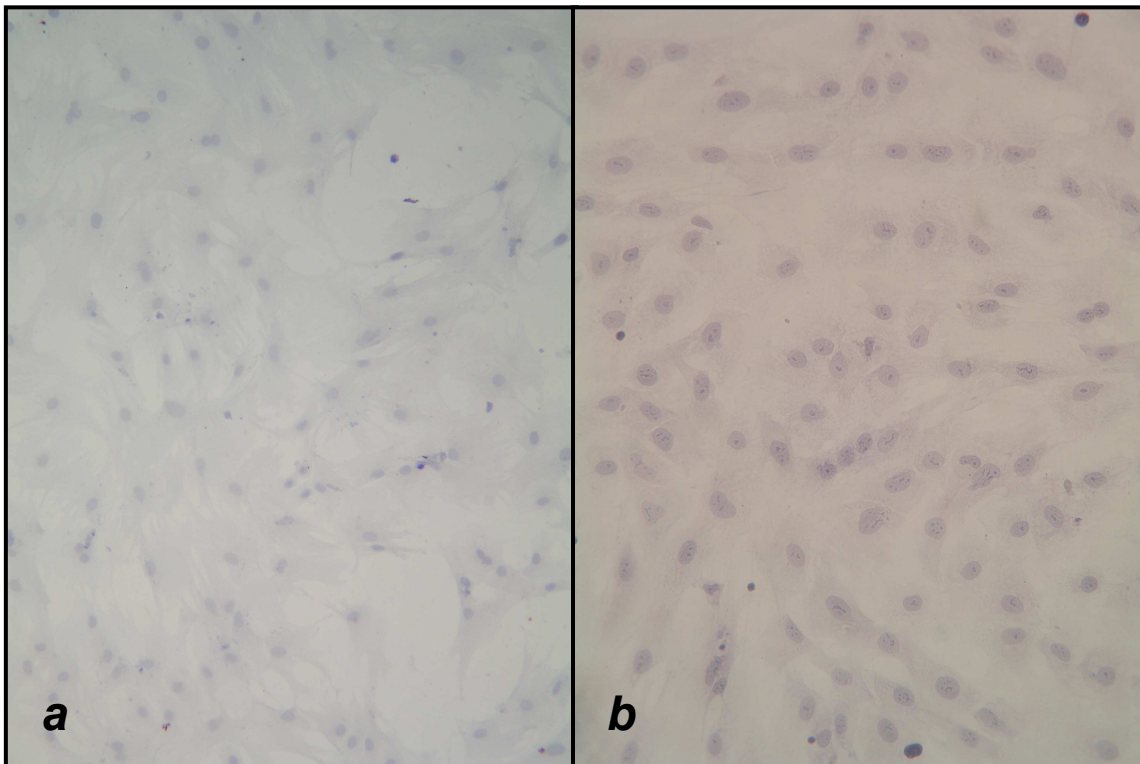


Abb. 22: Immunhistochemische Färbung gegen (a) CD 14 und (b) CD 34. Beide immunhistochemischen Färbungen zeigten keinen Hinweis für das Vorliegen hämatopoetischer Stammzellen.

5. Diskussion

Bereits seit einigen Jahren bilden hämatopoetische Stammzellen erfolgreich die Grundlage der Zelltherapie bei bestimmten malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems. Die Verwendung anderer Arten von humanen Stammzellen hat dagegen noch keinen breiten Einzug in den klinischen Alltag gehalten.

Ihre therapeutische Verwendung beschränkt sich bislang wesentlich auf Heilversuche mit humanen Stammzellen aus dem Knochenmark, wobei beispielsweise der Einsatz bei der Therapie des Myokardinfarktes [16,17] und der Osteogenesis imperfecta erwähnt sei [18]. Darüber hinaus wurde kürzlich von Herzklappenrekonstruktionen berichtet, wobei allogenes dezellularisiertes Gewebe mit autologen Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut *in vitro* besiedelt wurde. Diese wurden erfolgreich anschließend in zwei Kinder transplantiert [19,20].

Wenngleich die Erfolge dieser Therapieansätze unter den Wissenschaftlern rege diskutiert werden, so herrscht doch weitgehende Einigkeit darüber, dass stammzelltechnologische Verfahren einen viel versprechenden Ansatz für die zukünftige Therapie zahlreicher Erkrankungen darstellen.

Neben den embryonalen und den primordialen Stammzellen, deren Einsatz aus ethischen und juristischen Gründen limitiert ist, können heute in verschiedenen Gewebetypen sog. adulte Stammzellen nachgewiesen werden. Dem zu Grunde liegt die Beobachtung, dass offenbar auch im postnatalen Organismus ein Pool an wenig differenzierten Zellen vorhanden ist, der sich offenbar auf die Organgewebe verteilt und offenbar der physiologischen Geweberegeneration dient.

Diese postnatalen Stammzellen besitzen (siehe auch Abbildung 23) ebenfalls ein hohes Differenzierungspotential, wenngleich die Anzahl der möglichen Differenzierungsrichtungen im Vergleich zu den omnipotenten embryonalen Stammzellen deutlich eingeschränkt ist. Man spricht daher lediglich von einer Multi-

bzw. Pluripotenz oder gegebenenfalls sogar nur von einer Unipotenz postnataler Stammzellen [20].

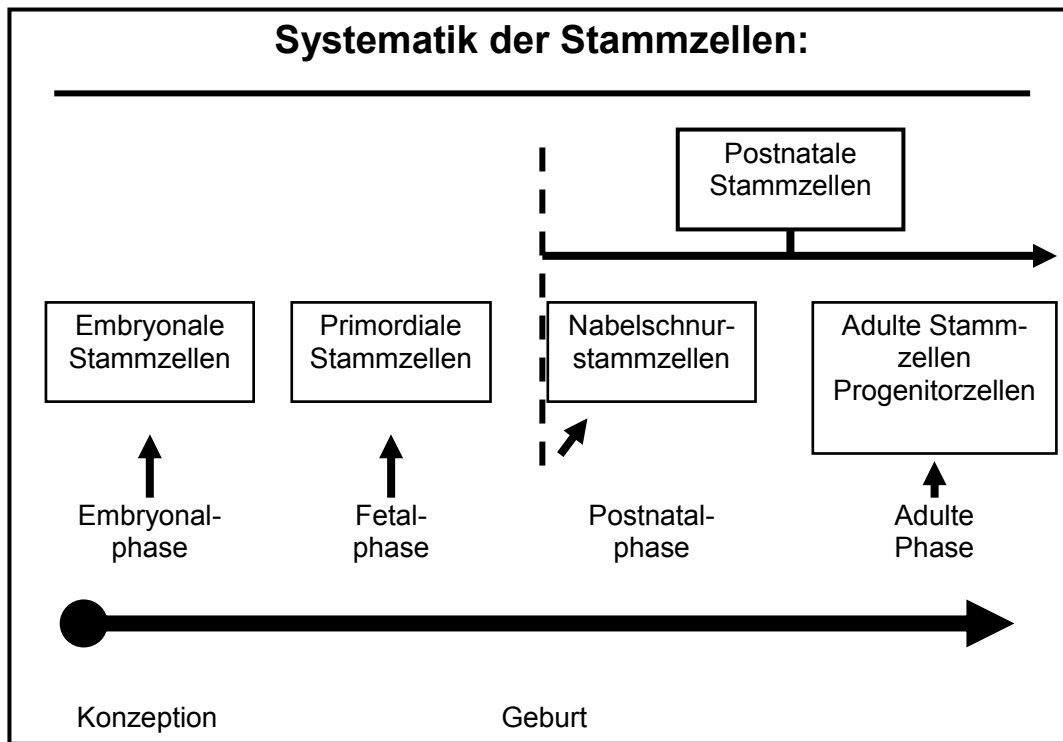


Abb. 23: Systematik der Stammzellen

Unter dem Begriff der postnatalen Stammzellen lassen sich heute neben den Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe auch diejenigen Stammzellen subsumieren, die in verschiedenen Geweben von Kindern/Jugendlichen und Erwachsenen gefunden werden können.

Diese postnatalen Stammzellen können heute in zahlreichen soliden Geweben nachgewiesen werden: So ist die Isolierung von postnatalen Stammzellen insbesondere aus der Leber [21], dem Fettgewebe[22], der Haut [23], den Haarfollikeln [24], der Mukosa des Darmes [25], dem Pankreas [26], der Lunge [27], der Zahnpulpa [28] sowie dem Gehirn [29,30] möglich.

Einige dieser Gewebe sind jedoch nur schwer und mit großem operativem Aufwand verfügbar, so dass eine Gewinnung von Stammzellen zu therapeutischen Zwecken aus diesem Gewebe nur schwer vorstellbar ist.

Anders ist es hingegen bei dem Gewebe, das bei einer Geburt anfällt und in der Regel verworfen wird: Die Nabelschnur einschließlich dem Nabelschnurblut, die Plazenta und die Eihäute (siehe auch Abbildung 24).



Abb. 24: Humane Plazenta eines reif geborenen Neugeborenen mit anhängender Nabelschnur.

Wir halten dieses Gewebe und hier vor allem das Nabelschnurgewebe für besonders geeignet, da es ohne jegliche Intervention und in beträchtlichen Mengen zur Verfügung steht.

Gerade bei Säuglingen, die mit einer kongenitalen Anomalie, wie z.B. einem vorderen Bauchwanddefekt (Gastroschisis und Omphalocele) oder einer kongenitalen

Zwerchfellhernie geboren werden, könnte die autologe Stammzelltherapie ein völlig neues Therapiekonzept darstellen [31].

Lassen sich UCSCs in ausreichender Menge aus der humanen Nabelschnur isolieren?

Da in den meisten postnatalen Gewebeformen die Stammzellen nur in sehr geringer Anzahl vorliegen, stellt sich die Frage, in wie weit sich postnatale mesenchymale Stammzellen aus der Nabelschnur in ausreichende Zahl gewinnen lassen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen konnten wir zeigen, dass sich UCSC leicht enzymatisch aus der Wharton'schen Sulze der humanen Nabelschnur isoliert werden können. In Anbetracht der zellulären Zusammensetzung der Wharton'schen Sulze stellen die eingesetzte Kollagenase und die verwendete Hyaluronidase die entscheidenden Enzyme dar.

Aufgrund der individuellen Unterschiede in der Dicke der Nabelschnur zeigten die Ergebnisse der UCSC – Isolierung jedoch eine erhebliche Varianz. Während Eblenkamp et al. [10] im Mittel $1,1 \times 10^6 \pm 5,7 \times 10^5$ Zellen isolieren konnte, lag unsere Zellausbeute im Mittel nur bei $0,727 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ Zellen pro cm Nabelschnurgewebe.

Dies mag zum einen daran liegen, dass in der Arbeit von Eblenkamp et al. [10] nur die Nabelschnüre von den Säuglingen eingegangen sind, die älter als 36 SSW waren. In unsere Arbeit verwendeten wir die Nabelschnüre aller Kinder die termingerecht zwischen der 33 und der 36 SSW geboren wurden. Leider fehlen hierzu in der oben zitierten Arbeit genaue Angaben. Betrachtet man hingegen die Streubreite der angegebenen Werte, so zeigen sich ähnliche Ergebnisse wie in unserer Arbeitsgruppen.

Zum anderen gibt die Arbeitsgruppe um Eblenkamp nicht an, aus welcher Nabelschnurlänge die oben genannten Isolierungsergebnisse erzielt wurden [10]. Da die Nabelschnur des termingerechten Neugeborenen eine Länge von 50 bis 60 cm und einen

Durchmesser von 15 bis 20 mm hat, haben wir unsere Ergebnisse stets auf einen Zentimeter Nabelschnurgewebe bezogen. Anhand dieser Angaben läßt sich leicht die Gesamtzellzahl, die aus einer intakten – 60 cm langen – Nabelschnur gewonnen werden können, berechnen.

Wie viele Zellen können pro Zentimeter Nabelschnurgewebe gewonnen werden?

Im Mittel lag unsere Zellausbeute bei $0,727 \times 10^6$ Zellen $\pm 0,4 \times 10^6$ Zellen pro cm Nabelschnurgewebe. Obwohl zwar das Nabelschnurgewebe in seiner Morphologie individuelle Unterschiede zeigte und sich diese Unterschiede auch in der Zellausbeute pro Zentimeter widerspiegeln, fällt diese Varianz jedoch bei einer Gesamtzellzahl von ca. 42×10^6 Zellen nicht mehr ins Gewicht. Dies bedeutet, dass UCSC in ausreichender Anzahl aus der humanen Nabelschnur gewonnen werden können.

Dies stellt die Grundvoraussetzung für eine zukünftige klinische Anwendung im Rahmen einer autologen Stammzelltransplantation für die Therapie frühkindlicher Fehlbildungen dar, da im Gegensatz zum Erwachsenen bei den Säuglingen auf Grund ihrer geringen Körpergröße kaum genügend körpereigenes Quellgewebe zu Isolation geeigneter Zellen – wie z.B. den mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark – zur Verfügung steht. Denn nur wenn die UCSCs in einer ausreichend großen Anzahl aus einem Gewebe gewonnen werden können, steht genügend Material zu Verfügung die Zellen für eine autologe Zelltherapie in die eine oder andere Richtung zu differenzieren.

Ergeben sich in Abhängigkeit von der Geburtsart unterschiedliche Isolierungsergebnisse?

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war es, zu eruieren in wie weit die Geburtsart und damit die kalte Ischämiezeit einen Einfluß auf das Isolierungsergebnis hat.

Während die Nabelschnüre der Kinder, welche über eine Sectio zur Welt gebracht wurden, im Anschluss direkt an die Geburt präpariert wurden, lag die Zeit zwischen einer Entbindung „via naturalis“ und der nachfolgenden Isolierung der UCSCs aus Organisationsgründen bei bis zu 12 Stunden. Während dieser Zeit wurden die Nabelschnüre in physiologischer Kochsalzlösung bei 4°C im Kühlschrank gelagert (sog. kalte Ischämiezeit). Man kann davon ausgehen, dass die warme Ischämiezeit, also die Zeit von der „Abnabelung des Säuglings“ bis zur Überführung der Nabelschnur in kalte physiologische Kochsalzlösung in beiden Gruppen gleich war, da sowohl in der Sectio-Gruppe als auch in der Gruppe der vaginal entbundenen Säuglinge die gleichen physiologischen Tests an der Nabelschnur und an dem Nabelschnurblut durchgeführt wurde. Diese warme Ischämie kann mit max. 5 Minuten angegeben werden.

Im Rahmend er hier vorliegenden Arbeit könnte gezeigt werden, dass es in Abhängigkeit von der Geburtsart und damit direkt proportional zur kalten Ischämiezeit zu keinen signifikanten Unterschieden in der Zellausbeute in beiden Gruppen gekommen war. Dieses Ergebnis deckt sich dahingehend mit den Ergebnissen aus anderen Arbeitsgruppen, die eine kalte Ischämiezeit von bis zu 24h tolerierten [11].

Sowohl aus Gründen der Sterilität als auch aus Gründen der Ökonomie verwendeten wir für unsere Zellkultur fast ausschließlich die Zellen, die aus einer Nabelschnur eines durch eine Sectio caesaria auf die Welt gebrachten Säuglings stammte.

Lassen sich die isolierten Zellen zum einen kultivieren und zeigen diese Zellen zum anderen eine Adhärenz?

Voraussetzung für die Etablierung eines zelltherapeutischen Verfahrens ist neben der Isolierung einer geeigneten Zellpopulation in ausreichender Menge die Möglichkeit die isolierten Zellen in vitro zu kultivieren.

In Anlehnung an die Arbeiten von Romanov et al., Lee et al. Wang et al., Kim et al. und Eblenkamp et al. [6,10,34,35] konnte gezeigt werden, dass sich UCSCs nicht nur in ausreichender Menge isolieren, sondern ebenfalls gut kultivieren lassen.

Neben der Aufreinigung von Stammzellen anhand von physikalischen (Dichte) und biochemischen (Oberflächenmolekülen) Charakteristika hat sich bei bestimmten Stammzellpopulationen auch eine Aufreinigung über funktionelle Eigenschaften bewährt. Bereits nach wenigen Stunden zeigte ein großer Anteil der isolierten UCSCs eine Adhäsionstendenz zum Boden der Kulturflasche. Diese Adhäsionsfähigkeit kann im weiteren für die „Aufreinigung“ der UCSCs genutzt werden. Durch anfänglichen täglichen Teilmedienwechsel können so alle nicht adhärenen Zellen und Zelltrümmer aus der Kultur entfernt werden.

Hier scheint ein deutlicher Vorteil gegenüber den hämatopoetischen mesenchymalen Stammzellen zu liegen. Obwohl auch die hämatopoetischen mesenchymalen Stammzellen eine deutliche Adhäsionsfähigkeit in der in vitro Kultur zeigen, sie müssen jedoch zunächst aufwendig über einen ersten Aufreinigungsschritt durch Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks getrennt werden [20].

Um Stammzellen in für wissenschaftliche und vor allem aber für therapeutische Zwecke in ausreichender Verfügung zu haben, ist es notwendig, diese nach der Isolierung in vitro zu vermehren. Die Expansion adhärenter Zellen erfolgt dabei am einfachsten in so genannten Monolayerkulturen.

Die Herausforderung hierbei ist, die Expansionsbedingungen so zu wählen, dass die Stammzellen in ihrem undifferenzierten Zustand verbleiben.

Während vereinzelte Arbeitsgruppen speziellen Medien für die Kultur mesenchymaler Stammzellen einsetzen [Aigner selbst], erfolgte in unserem Versuchsaufbau die Kultivierung der UCSCs in einer Mischung (60%/40%) aus einem Standardmedium (DMEM, Cell Concept Deutschland) und einem Spezialmedium (MCDB 105; Sigma Deutschland). In dieser Zusammensetzung proliferierten die isolierten UCSCs zunächst sehr gut.

In Übereinstimmung mit der Literatur zeigten auch unsere isolierten UCSCs im Kulturverlauf zunächst nach Tag +14 eine deutliche Reduktion der Proliferationsaktivität sowie eine spontane Differenzierung in osteoblastäre und adipozytäre Zell-Morphologien (Tag +22).

Obwohl diese spontane Differenzierung in osteoblastäre und adipozytäre Zell-Morphologien zum gegenwärtigen Zeitpunkt als ein Beweis für das Vorliegen multipotenter mesenchymaler Stammzellen angesehen werden kann, stellt die Expansion der UCSCs im undifferenzierten Zustand und die Etablierung geeigneter Bedingungen für die Differenzierung der oben genannten Zellen eine zukünftige große Herausforderung dar.

Nur wenn sich die UCSC in vitro in genau definierte zelluläre Subpopulationen differenzieren lassen und die Stammzellbiologie in weiten Teilen verstanden ist, kann so eine Tumorgenität minimiert werden.

Ändert sich die Zellmorphologie dieser Zellen während der Zellkultur?

Bereits nach dem ersten Tag in der Zellkultur zeigten die UCMSs ihren charakteristischen, zumeist sternförmigen Aspekt mit scharfen Zellgrenzen und zipfeligen Zellausläufern sowie einer feinen perinukleären konzentrierten Granula. Die Zellmorphologie ist den Fibroblasten sehr ähnlich.

Aufgrund immunhistochemischer Untersuchungen mittels eines mesenchymalen (Vimentin) und zweier glattemuskulärer Marker (Desmin und „Smooth muscle antigen“) konnten Eblenkamp et al. in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen zeigen [32,33] dass die UCSCs zu der Klasse der Myofibroblasten zu zählen sind. So lässt sich das zellmorphologische Bild der Primärkultur erklären, die initial den Anschein erweckt, nur aus isolierten Fibroblasten zu bestehen.

Doch bereits nach der ersten Passage änderte sich die charakteristische Morphologie der primären UCSCs. Die Zellen zeigten nun eine vermehrte Granulierung sowie eine Elongation des Zytoplasmas. Das Auftreten von spindelförmigen Zellen mit einem breiten, flossenartigen sowie spitz zulaufenden Pol weist auf einen migratorisch aktiven Zelltyp hin. Darüber hinaus besitzen zahlreiche Zellen mit einem Saum aus membranständigen Vesikeln einen sekretorischen Phänotyp. Auch diese Beobachtungen können durch Ergebnisse von Eblenkamp et al. untermauert werden [10].

Im weiteren Verlauf zeigten die isolierten UCSCs zunächst nach Tag +14 eine deutliche Reduktion der Proliferationsaktivität mit der Bildung einer Spindelform sowie eine spontane Differenzierung in osteoblastäre und adipozytäre Zell-Morphologien (Tag +22).

Diese spontane Differenzierung ist möglicherweise auf einen Stimulus durch enge räumliche Zell-Zell-Kontakte zurückzuführen. Eblenkamp et al. konnten zeigen [10], dass v.a. in diesen Bereichen, in denen sich die Zellen in der 3. Dimension aufwerfen, es zur Bildung kristaliner Ablagerungen kommt, die mit Hilfe geeigneter Farbstoffe

(Alizarin-Rot) als Ca-Verbindungen identifiziert werden konnten. Diese kristallinen Ablagerungen konnten auch in unserer Zellkultur multipel nachgewiesen werden (siehe auch Abbildung 25).

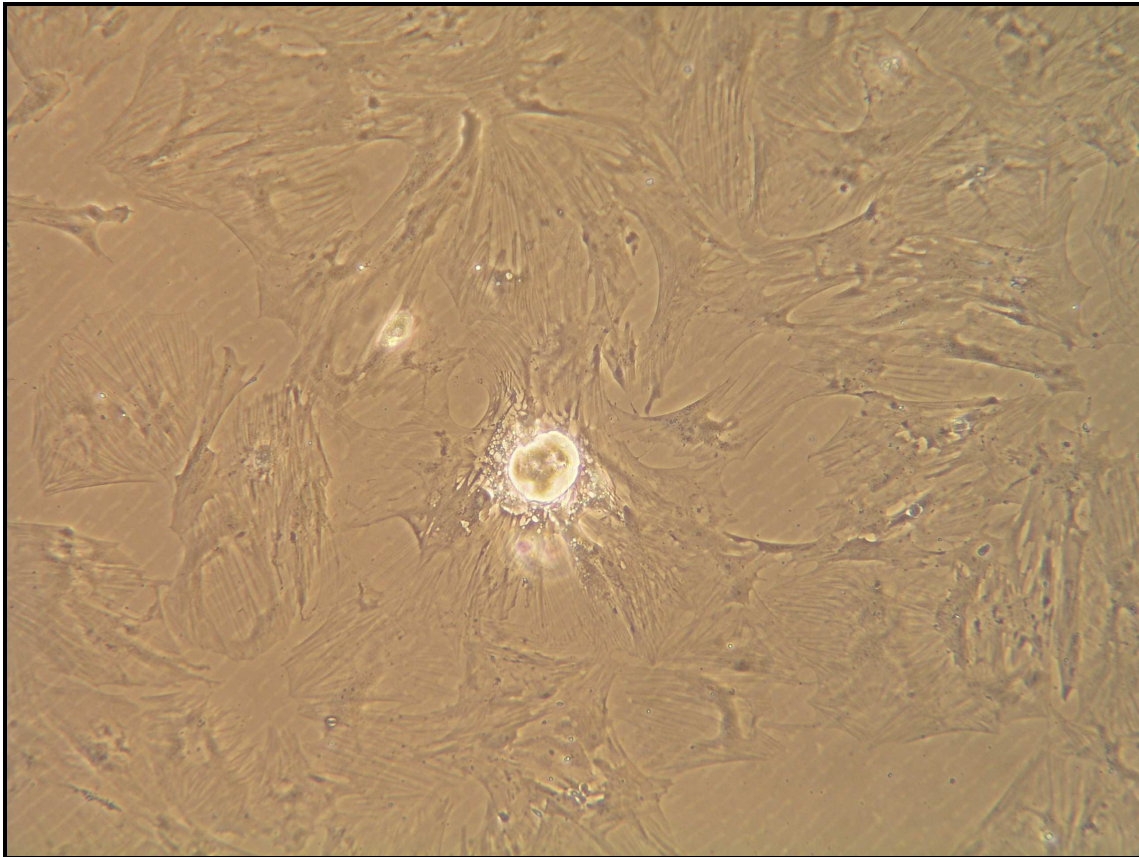


Abb. 25: Kristalline Elemente in der Kultur der UCSCs (Tag: +15 nach Isolierung).

Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe um Eblenkamp [10] eine Expression von alkalischer Phosphatase nachweisen. Diese zellmorphologischen Veränderungen mit dem typischen Aspekt von „bone nodules“ im Zusammenhang mit dem Nachweis von kristallinen Kalziumverbindungen und einer zellulären Expression von alkalischer Phosphatase bestätigen ebenfalls die Möglichkeit einer „*pluripotenten*“ osteoblastären Differenzierung der UCSCs.

Sind die isolierten Zellen positiv für mesenchymale Stammzellmarker, wie CD13 und CD105; und negativ für hämatopoetische Stammzellmarker, wie CD14 und CD34?

Mesenchymale Stammzellen können wie hämatopoetische Stammzellen Abkömmlinge aller drei Keimblätter bilden, sie liefern beispielsweise alle Formen von Binde- und Stützgewebe, quer gestreifte Muskulatur, fast alle glatten Muskelzellen und Gefäßendothelien. Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellmarkern (CD 14 und CD34), keine spezifischen Stammzellmarker kommerziell zur Verfügung standen, wurden die Zellen in Anlehnung an die Literatur [xx] auf das Vorkommen verschiedener Zelloberflächenmarker (wie z.B.: CD13, CD28, CD29, CD44, CD51, CD73, CD90, CD105, CD106) hin untersucht, die in ihrer Gesamtheit für das Vorliegen mesenchymaler Stammzellen sprechen [10,20,34,35].

In unserem Versuchsaufbau wählten wir die mAk gegen CD13 und CD105, da sie nach den Angaben der Literatur für den Nachweis mesenchymaler Stammzellen am Aussagekräftigsten sind. Quasi als Negativkontrolle verwendeten wir zusätzlich die mAk gegen CD14 und CD34, welcher spezifisch für hämatopoetische Stammzellen sind. Zusätzlich erfolgte ein immunhistochemischer Nachweis von Fibroblasten. In Übereinstimmung mit Eblenkamp et al. [10] könnten auch wir bestätigen, dass die isolierten UCSCs positiv für einen mAk gegen humane Fibroblasten waren. Dies lässt sich damit erklären, dass wie bereits oben gezeigt, die UCSCs zu der Klasse der Myofibroblasten zu zählen sind.

In Übereinstimmung mit Wang et al. [11] konnten wir ebenfalls zeigen, dass die von uns isolierten UCSCs diverse stammzelltypische Oberflächenmarker wie CD 13 und CD105 exprimierten, für hämatopoetische Stammzellmarker, wie CD 14 und CD34, hingegen negativ waren.

Diese Ergebnisse sind insoweit interessant, da die UCSCs somit Eigenschaften aufweisen, die sich bisher nur in isolierten mesenchymalen Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark fanden. Es ist daher zu diskutieren, wie UCSCs und MSCs

zueinander in Beziehung stehen. Vereinzelt veröffentlichten konnten zeigen, dass Myofibroblasten offensichtlich aus mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks (MSCs) entstehen können [36,37]. Des Weiteren stellt sich eine Subpopulation der Stromazellen des Knochenmarks, die nur unscharf von den mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks abgegrenzt werden können [38,39], selbst als Myofibroblasten dar [40,41,41].

Da die UCSCs ebenfalls zur Klasse der Myofibroblasten zu zählen sind, liegt die Vermutung nahe, dass eine verwandtschaftliche Beziehung zwischen den MSCs und den UCSCs bestehen könnte. Diese These muß jedoch durch weitere Erforschung der UCSCs und der MSCs verifiziert bzw. falsifiziert werden.

6. Zusammenfassung

Voraussetzung für die Etablierung eines zelltherapeutischen Verfahrens zur Behandlung kongenitaler Anomalien ist die Identifikation geeigneter Zellsysteme, die (1.) in ausreichender Anzahl zur Verfügung stehen, (2.) leicht zu gewinnen sind, (3.) sich in vitro gut expandieren lassen und (4.) dem notwendigen Zelltyp entsprechen bzw. sich in diesen differenzieren lassen.

Da die humane Nabelschnur ohne jegliche Intervention vorliegt und eine beträchtliche Zahl an Zellen darstellt, halten wir die Nabelschnur für eine hoffnungsvolle Quelle zur Isolierung derartiger Zellen.

Im Rahmen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich *Umbilical Cord Stroma Cells* (=UCSCs), die Bindegewebszellen des Nabelschnurgewebes, in ausreichender Anzahl aus der Wharton'schen Sulze der Nabelschnur von termingerechten Säuglingen (33.-36. Schwangerschaftswoche) mit Hilfe enzymatischer Methoden isoliert werden können. So gelang es im Mittel $0,727 \times 10^6$ Zellen $\pm 0,378 \times 10^6$ Zellen aus einem Zentimeter Nabelschnurgewebe zu isolieren.

Im Rahmen der in vitro Expansion der UCSCs konnte dargestellt werden, dass die UCSCs auf Grund ihrer phänotypischen Plastizität funktionell den mesenchymalen Stammzellen (MSCs), welche sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur aus dem Knochenmark isolieren lassen, ähneln. Dabei stellen die primären UCSCs Myofibroblasten dar. Im weiteren Verlauf zeigten die isolierten UCSCs zunächst nach Tag +14 eine deutliche Reduktion der Proliferationsaktivität mit der Bildung einer Spindelform sowie eine spontane Differenzierung in osteoblastäre und adipozytäre Zell-Morphologien (Tag +22).

Auch die immunhistochemische Analyse der Zellpopulation exprimierten die isolierten UCSCs mesenchymale Stammzellmarker, wie CD 13 und Cd 105. Im Gegensatz dazu

zeigten sie keinen Hinweis auf das Vorliegen hämatopoetischer Oberflächenmarker, wie CD 14 und CD 34.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sagen, dass sich mesenchymale Stammzellen (UCSCs) aus der humanen Nabelschnur in ausreichender Menge leicht isolieren lassen und anschließend in vitro eine sehr gute Expansion zeigen. Sie stellen somit eine wertvolle Ressource zur Gewinnung von potenten Zellen für zellbasierte Therapieansätze in der Behandlung kongenitaler Anomalien dar.

7. Literaturverzeichnis

1. Sell S. Stem Cells: What are they? Where do they come from? Why are they here? When do they go wrong? Where are they goin? In: Sell. S. (Ed.) Stem Cells Handbook. Humana Press Totowa, New Jersey 2004: 1-18.
2. Huang S. Ingber E.D. From Stem Cells to Functional Tissue Architecture. What are the signals and how are they processed? In: Sell. S. (Ed.) Stem Cells Handbook. Humana Press Totowa, New Jersey 2004: 45-56.
3. Twardzik T, Rapp. U.R., Somatische Stammzellen; Grundlage, Konzepte und Herausforderungen, Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 2002, 45: 79-8.
4. James E.D, Caplan A., Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, In: Sell. S. (Ed.) Stem Cells Handbook. Humana Press Totowa, New Jersey 2004: 107-118.
5. Chamberlain JR, Schwarze U., Wang PR et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. Science 2004, 303: 1198-1201.
6. Kim J. W., Kim S. Y., Park S. Y., Kim Y. M., Kim J. M., Lee M. H., Ryu H. M., Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord, Ann Hematol 2004, 83: 733-738.
7. Sobotta J. Atlas der Anatomie des Menschen, Band 2. Urban und Fischer 2005
8. Hinrichsen K. V. Nabelbildung, Nabelschnur und Fruchtwasser. In: Hinrichsen K. V. (Hrsg.) Humanembryologie. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1993: 139-144.

9. Kühnel W. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. Georg Thieme Verlag 2002.
10. Eblenkamp M., Aigner J., Hintermair J., Potthoff S., Hopfner U., Jacobs V., Niemeyer M., Wintermantel E., Umbilical Cord Stromal Cells (UCSC) Zellen mit osteogenem differenzierungspotenzial. Orthopäde 2004; 33: 1338–1345.
11. Wang H-S., Hung S-C., Peng S-T., Huang C-C., Wei H-M., Guo Y-J., Fu Y-S., Lai M-C, Chena C-C., Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. Stem Cells 2004; 22,1330-1337.
12. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K., Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood or Adipose Tissue. Stem Cells Express 2006, 2005-0342.
13. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswahl R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Caig S., Marshak D.R., Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, Science 1999; Vol 284: 143-147.
14. Fu Y-S., Cheng Y-C., Anya Lin M-Y., Cheng H., Chu P-M., Chou S-C., Shih Y-H., Ko M-H., Sung M-S., Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons in Vitro – Potential Therapeutic Application for Parkinsonism. Stem Cells Express 2005: 2005-0053.
15. Weiss M.L., Medicetty S., Bledsoe A.R., Rachakatla R.S., Choi M., Merchav S., Luo Y., Rao M.S. , Velagaleti G., Troyer D., Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells: Preliminary Characterization and Effect of Transplantation in a Rodent Model of Parkinson's Disease. Stem Cells Express: 2005-0330.

16. Pittinger M.F., Martin B.J., Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics, *Circ Res* 2004, 95:9-20.
17. Wollert K.C., Meyer G.P., Lotz J et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004, 364:141-148.
18. Jaroma H.J., Ritsila V.A. Effect of diffusion chamber pore size on differentiation and proliferation of periosteal cells. An experimental study. *Clin Orthop* 1988, 258-264.
19. Kill I., Amizuka N, Shimomura J., Saga Y., Kudo A. Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo.lineage and the chondro-lineage, *J. Bone Miner Res* 2004, 19:1840-1849.
20. Aigner M., Eblenkamp E., Wintermantel E. Funktioneller Gewebe und Organersatz mit postnatalen Stammzellen, *Technologische Grundlagen, Chirurg* 2005, 76: 435-444.
21. Alison M.R., Vig P., Russo F. et al., Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? *Cell Prolif* 2004, 37: 1-21.
22. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. et al, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002, 13: 44279-4295.
23. Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J., Barnabe-Heider F., Sadikot A., Kaplan D.R., Miller F.D., Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001, 3: 778-784.

24. Oshima H., Rochat A., Kedzia C., Kobayashi K., Barrandon Y, Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 2001, 104: 233-245.
25. Brittan M., Wright N.A., Gastrointestinal stem cells. *J. Pathol* 2002, 197: 492-509.
26. Kruse C., Birth M., Rohwedel J., Assmuth K., Goepel A., Wedel T., Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Appl Phy A* 2004, 79(7): 1617-1624.
27. Emura M., Stemcells of the respiratory epithelium and their in vitro cultivation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997, 33: 3-14.
28. Gronthos S., Mankani M., Brahim J., Robey P.G., Shi S., Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 13625-13630.
29. Ahmad I., Tang L., Pham H., Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 270: 517-521.
30. Palmer T.D., Schwartz P.H., Taupin P., Kasper B., Stein S.S., Gage F.H., Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 2001, 411 :42-43.
31. Meyer Th, Höcht B. Kongenitale Bauchwanddefekte: Eine Übersicht. *Chir. Praxis* 2005/2006 (im Druck).
32. Eyden B.P., Ponting J., Davies H., Bartley C., Torgersen E., Defininf the myofibroblast: normal tissues, with special reference to the stromal cells of Wharto's jelly in human umbilical cord. *J.Submicrosc Cytol Pathol* 1994, 26: 347-355.

33. Nanaev A.K., Kohen G., Milovanov A.P., Domogatsky S.P., Kaufmann P., Stromalö differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta* 1997, 18: 53-64.
34. Romanov Y.A., Svintsitskaya V.A., Smirnov V.N., Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. *Stem Cells* 2003, 21: 105-110.
35. Lee O.K, Kuo T.K., Chen W-M., Hsieh S-L., Chen T-H., Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, *Blood* 2004, 103: 1669-1675.
36. Direkze N.C., Forbes S.J., Brittan M. et al, Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplantates mice. *Stem Cells* 2003, 21:541-520.
37. Emura M., Ochiai A., Horino M., Arndt W., Kamino K., Hirohashhi S., Development of myofibroblasts from human bone marrow mesenchymal sem cells cocultured with human colon carcinoma cells anf TGF beta 1. *In Vitro Cell Dev Beiol Anim* 2000, 36: 77-80.
38. Herzog E.L., Chai L., Krause D.D., Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003, 102: 3483-3493.
39. La Russa V.F., Schwarzenberger P., Miller A., Agrawal K., Kolls J., Weiner R, Marrow stem cells, mesenchymal progenitor cells, and stromal progeny, *Cancer Invest* 2002, 20: 110-123.
40. Peled A., Yipori D., Abramsky O., Ovadia H., Shezen E., Exoression of alpha-smooth muscle actin in murin bone marrow stromal cells. *Blood* 1991, 78: 304-309.

41. Sitnicka E., Wang Q.R., Tsai S., Wolf N.S., Support versus inhibition of hematopoiesis by two characterized stromal cell types, Stem Cells 1995, 13:655-665.

42. Jäger M., Sager M., Kniooer A., Degistirici Ö., Fischer J., Kögler G., Werner Krauspe P., R., In -vitro- und In -vivo- Knochenregenerierung durch mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut. Orthopäde 2004; 33, 1361-1372.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik, für die Überlassung des Themas, sowie Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Experimentellen Chirurgie und der Experimentellen Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Universitätsklinik, für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Für die intensive Betreuung in allen praktischen und theoretischen Fragen danke ich besonders Herrn PD Dr. med. Th. Meyer, Oberarzt der Abteilung für Kinderchirurgie, Chirurgische Universitätsklinik Würzburg. Er hat durch seine hilfreichen und tatkräftigen Anregungen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. med. B. Höcht, Leiter der Abteilung für Kinderchirurgie, Herrn Prof. Dr. J. Dietl, Direktor der Universitätsfrauenklinik und Herrn PD. Dr. C. Otto, Experimentelle Chirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik, für die Unterstützung meiner Arbeit sehr dankbar.

Danken möchte ich zum einen auch Frau Dr. med. vet. I. Chodnewska, die mich in allen histologischen und immunhistologischen Arbeiten unterstützte und zum anderen Frau S. Gahn, die mir in allen Fragen der Zellkultur hilfreich zur Seite stand.

Im Übrigen gilt mein Dank besonders allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie und Experimentelle Transplantations-Immunologie, allen Kollegen und Kolleginnen der Universitätsfrauenklinik sowie allen Hebammen, die mir mit praktischer Hilfe und stets freundlich zur Seite standen.

Die vorliegende Arbeit entstand durch die finanzielle Unterstützung durch den Universitätsbund und die IHK-Würzburg, sowie aus Fördermitteln des Universitätshaushaltes der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg.

Mein ganz besonderer Dank gilt nicht zu letzt meinen Eltern, die mir den wissenschaftlichen Aufenthalt an der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik sowie der Experimentellen Chirurgie der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg erst ermöglichten.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Lechner Weisser
Vorname: Victoria Constanza
Geburtsdatum: 23.11.1983
Geburtsort: Puerto Varas, Chile
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch und Chilenisch

Schulbildung:

1989 – 1992: Deutsche Schule Puerto Varas, Chile
1993 – 2001: Germania Schule, Puerto Varas, Chile

Studium:

2002-2009: Studium der Humanmedizin an der Universidad San Sebastian, Puerto Montt, Chile.

Auslandsaufenthalte:

12/2003 – 02/2004: Auslandsfamulatur an der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik, der Universitätskinderklinik und der Abteilung für Kinderchirurgie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, Deutschland.

12/2005 – 02/2006: Forschungsaufenthalt in der Experimentellen Chirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik, Bayerische Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, Deutschland.

Würzburg, im März 2010

Victoria C. Lechner Weisser