

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Abteilung Experimentelle Embryologie
Tissue Engineering und klinische Anatomie
Leiter: Professor Dr. T. Skutella

**Der Hühnerembryo als Modell für intrauterine,
ultraschallgesteuerte Herzinterventionen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Sandra Fechner
aus Albstadt

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Drews

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Meyer-Wittkopf

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	1
1.2 Kongenitale Herzfehler und mögliche Therapieoptionen	2
1.3 Die intrauterine untraschallgesteuerte Punktion	4
1.3.1 Indikation, therapeutisches Ziel	4
1.3.2 Bisherige Experimente und Ergebnisse beim Tiermodell Schaf	5
1.3.3 Bisherige Ergebnisse intrauteriner Herzklappeninterventionen zur Korrektur angeborener Fehlbildungen in der Humanmedizin	5
1.4 Herzentwicklung	9
1.4.1 Herzentwicklung beim Menschen	9
1.4.2 Störungen in der Entwicklung der Semilunarklappen	10
1.4.3 Herzentwicklung beim Huhn	11
1.4.4 Vergleichende Herzentwicklung Mensch und Huhn	12
1.5 Wahl des Tiermodells Hühnerembryo und vorbestehende Probleme.....	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Bebrütung	18
2.2 Eischalenpräparation	18
2.3 Ultraschallgerät, Schallkopf, Kontaktgel, Tyrode-Lösung	19
2.4 Punktionssysteme	19
2.5 Nachuntersuchung des punktierten Herzens	20
3 Ergebnisse	21
3.1 Experimentalablauf	21
3.2 Anzahl der Experimente, Menge der Hühnereier	22
3.3 Eischalenpräparation	23
3.3.1 Präparation der Eischale am Tag der Punktion	23
3.3.2 Präparation nach 48 h Bebrütung, Isolierband	24
3.3.3 Präparation nach 48 h Bebrütung, Folie	25

3.4 Probleme der Schalenhaut	26
3.5 Ultraschalldarstellung	27
3.5.1 Wahl des Ultraschallkopfes	27
3.5.2 Durchführung und Ergebnisse der Ultraschalldarstellung.....	28
3.5.3 Darstellung der am Tag zwei präparierten Hühnereier	29
3.6 Punktion des Herzens	31
3.6.1 Vorgehen	31
3.6.2 Markierung des Stichkanals mit Tusche oder Nilblausulfat.....	33
3.6.3 Einsetzen eines Coils	34
3.6.4 Sonographie nach der Punktion	35
3.7 Überleben der Embryonen nach der Punktion.....	35
3.8 Nachuntersuchung des punktierten Herzens.....	36
3.8.1 Präparation des Herzens	36
3.8.2 Nachuntersuchung am Stereomikroskop.....	37
3.8.3 Anfertigung von Paraffinschnitten	41
3.9 Bewertung der sonographischen Treffsicherheit	42
4 Diskussion	43
4.1 Intrauterine, ultraschallgesteuerte Punktionen in der Humanmedizin.....	43
4.2 Das Huhn als Modell	45
4.3 Experimentalablauf.....	47
4.3.1 Eischalenpräparation	47
4.3.2 Ultraschalldarstellung	48
4.3.3 Punktion.....	49
4.3.4 Nachuntersuchung des punktierten Herzens.....	51
4.4 Fazit.....	51
4.5 Ausblick	52
5 Zusammenfassung.....	53
6 Literaturverzeichnis	55
Anlagen	63

Tabellen und Abbildungen

Tab. 1: Prozentuale Häufigkeit der Herzfehlersubtypen	2
Tab. 2: Wichtige Punkte der Herzentwicklung bei Menschen und Huhn	15
Tab. 3: Übersichtliche Darstellung des Experimentalablaufs	21
Tab. 4: Bewertung der Treffsicherheit	42
Abb. 1: Embryologische Entwicklung der Semilunarklappen.....	9
Abb. 2: Wachstumskurven Mensch und Huhn.....	13
Abb. 3: Schematische Darstellung des menschlichen Herzens.....	16
Abb. 4: Schematische Darstellung des Hühnerherzens	16
Abb. 5: Design und Aufbau des Experiments.....	22
Abb. 6: Ei am Punctionstag mit angesägten Sollbruchstellen.....	23
Abb. 7: Blick auf die Schalenhaut.....	24
Abb. 8: Gefensteretes Ei mit Tegaderm	25
Abb. 9: Während der Ultraschalldarstellung	27
Abb. 10: Ultraschalldarstellung des embryonalen Hühnerherzens	29
Abb. 11: Farbdopplerdarstellung des embryonalen Hühnerherzen	30
Abb. 12: Punction des embryonalen Hühnerherzens	31
Abb. 13: Ultraschallgesteuerte Punction des embryonalen Hühnerherzens	32
Abb. 14: Ultraschallgesteuerte Punction des embryonalen Hühnerherzen	34
Abb. 15: Herz in situ	36
Abb. 16: Isoliertes Herz unter dem Stereomikroskop	37
Abb. 17: Herz im Querschnitt	38
Abb. 18: Herz im Querschnitt	39
Abb. 19: Herz mit Coil	40
Abb. 20: Paraffinschnitt	41

1 Einleitung

In der Einleitung wird zunächst die Zielsetzung der Arbeit dargestellt. Anschließend werden die kongenitalen Herzfehler und die möglichen Therapieoptionen beschrieben. Im Speziellen wird die intrauterine ultraschallgesteuerte Punktion erläutert. Danach wird die Herzentwicklung des Menschen und die des Huhnes beschrieben und beide miteinander verglichen. Im letzten Unterpunkt dieser Einleitung wird erläutert, weshalb der Hühnerembryo als Tiermodell gewählt wurde und welche Probleme dieses Tiermodell mit sich bringt.

1,1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein Tiermodell zu entwickeln und zu optimieren, an dem untraschallgesteuerte intrauterine Herzpunktionen simuliert werden können. Mit diesem Modell sollten technische Probleme erkannt und gelöst werden und ein Übungsobjekt geschaffen werden.

Es sollte ein Modell entstehen, bei dem, beginnend bei der Einschalenpräparation, über die sonographische Darstellung und Herzpunktion durch ein Fenster im Ei bis zur Nachuntersuchung die bestehenden Probleme aufgezeigt und Lösungen dargestellt werden. Die Küken sollten nach der Punktion einige Stunden im Ei weiterleben bevor die Nachuntersuchung durchgeführt wurde.

Das Herz mit dem Stichkanal sollte nach der Punktion am Stereomikroskop wie auch histologisch untersucht werden, um damit die Auswirkung der Punktion darzustellen, sowie einen Nachweis über die Treffsicherheit zu erbringen.

Zukünftige Forschung könnte die weitere Entwicklung und Verbesserung der Technik zur intrauterinen Intervention beim Menschen bei Stenosen oder Atresien der Pulmonal- bzw. Aortenklappe sowie dem daraus resultierenden hypoplastischem Linksherzsyndrom zum Ziel haben.

1.2 Kongenitale Herzfehler und mögliche Therapieoptionen

Die aktuellen Mortalitätsziffern von Neugeborenen in Deutschland und Europa zeigen, dass etwa 20 % der Todesursachen beim Säugling und 50 % der durch Fehlbildungen verursachten kindlichen Todesfälle kardiovaskulären Ursprungs sind (Uebing et al, 2006; Subirana, 2005; Meyer-Wittkopf et al, 2003b).

Werden Herzfehlbildungen bereits pränatal mittels Echokardiographie erkannt, so sinkt durch das Optimum des perinatalen Managements die Mortalität und auch die postnatale Morbidität (Wilkins-Haug et al, 2005, Meyer-Wittkopf et al, 2003c). Mit Hilfe neuester Techniken ist es in der Zwischenzeit möglich, eine diagnostische Fetalechokardiographie schon zum Ende des ersten Trimenons, ab der 13. Schwangerschaftswoche, durchzuführen (Meyer-Wittkopf et al, 2003c; Haak et al, 2002).

In der folgenden Tabelle wird die prozentuale Häufigkeit der pränatal mittels Echokardiographie erkannten Herzfehlbildungen, bei denen eine ultraschallgesteuerte Intervention denkbar ist, in Relation zu allen kongenitalen Herzfehlern dargestellt.

<u>Herzfehler</u>	<u>Lebendgeburten mit Herzfehler in %</u>	<u>Fehl- und Totgeburten mit Herzfehler in %</u>
<u>Pulmonalstenose</u>	9	1
<u>Aortenklappenstenose</u>	3	0,5
<u>Hypoplastisches-Linksherz-Syndrom</u>	4	5
<u>Pulmonalklappenatresie bei intaktem Ventrikelseptum</u>	2	2

Tab. 1: Prozentualer Anteil der Herzfehlersubtypen, bei denen eine sonographisch gesteuerte kardiale Intervention denkbar ist, in Bezug auf alle kongenitalen Herzfehler
Quelle: Modifiziert nach Meyer-Wittkopf et al, 2003b

Die postnatale Behandlung intrauterin diagnostizierter Herzfehlbildungen kommt bei den oben angegebenen Herzfehlertypen nach Ansicht der Experten zu spät, da diese Krankheitsbilder im Laufe der fetalen Entwicklung einen progredienten Verlauf aufweisen und auf Grund der veränderten intrakardialen und intravaskulären Hämodynamik zu irreversiblen Sekundärschäden führen (Wilkins-Haug et al, 2005; Meyer-Wittkopf et al, 2003c; Friedman et al, 2002; Cohen, 2001; Hornberger et al, 1995). Der verminderte Blutfluss bei hochgradigen Klappenstenosen/-atresien führt unbehandelt zu vermindertem, asymmetrischem Gefäßwachstum mit sekundärer Gefäßhypoplasie sowie zu einer Hypoplasie des betroffenen Ventrikels und somit zu einem funktionell univentrikulären Herzen (Wilkins-Haug et al, 2005; Meyer-Wittkopf et al, 2003b). Über 50 % der mit Herzfehlbildungen lebend geborenen Kinder versterben in den ersten Lebenstagen (Arzt et al, 2003).

Das hypoplastische Linksherzsyndrom wird derzeit postpartal intensivmedizinisch mit frühzeitiger Intubation und Beatmung sowie medikamentös mit Prostaglandin behandelt (Rychid, 2005; Hofbeck et al, 1997). In den darauf folgenden Tagen wird, je nach Schweregrad, interventionell mittels Herzkatheter eine Ballondilatation der stenosierten Klappe durchgeführt oder herzchirurgisch therapiert, häufig mittels einer Norwood-Operationsfolge (Rychid, 2005; Wilkins-Haug et al, 2005; Wloch et al, 2004; Meyer-Wittkopf et al, 2003b; Hofbeck et al, 1997; Simpson et al, 1997). Ohne Behandlung versterben die meisten der Kinder innerhalb der ersten Tage nach der Geburt (Wilkins-Haug et al, 2005; Hofbeck et al, 1997).

Die Prognose kongenitaler Herzfehler ist derzeit noch schlecht, da häufig neben dem hypoplastischen Ventrikel eine schlechte Ventrikelfunktion, Arrhythmien, extrakardiale Anomalien oder ein retrograder Blutfluss in den Aortenbogen vorliegen. Häufig sind mehrere Operationen nötig, viele der Kinder versterben präoperativ in utero oder postnatal an ihrer Erkrankung (Wloch et al, 2004; Meyer-Wittkopf, 2002; Hofbeck et al, 1997; Simpson et al, 1997).

1.3 Die intrauterine untraschallgesteuerte Punktion

1.3.1 Indikation, therapeutisches Ziel

In postnatal durchgeführten kinder-kardiologischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die meisten Herzfehler während der Fetalperiode progredient verlaufen, nur die wenigsten heilen oder verbessern sich spontan (Axt-Fliedner et al, 2006; Meyer-Wittkopf et al, 2003c; Friedman et al, 2002; Cohen, 2001; Hornberger et al, 1995). Stenosen und Atresien der Pulmonal- bzw. Aortenklappe sowie das hypoplastische Linksherzsyndrom werden als mögliche Indikation für eine intrauterine, untraschallgesteuerte Herzpunktion angesehen.

In vielen dieser Fälle treten schwerwiegende Sekundärschädigungen auf. Diese äußern sich sowohl in endo- als auch in myokardialen Schädigungen des Herzens. Dadurch erhöhen sich die postnatale Mortalität und Morbidität, in Folge dessen sinkt der Erfolg der postnatalen Behandlungsoptionen und Prognosen (Kohl, 2002). Auf Grund dieser Erkenntnisse gewinnt die frühzeitige, pränatale Behandlung angeborener Herzfehler immer mehr an Bedeutung.

Um größere Schäden zu vermeiden, wäre es wichtig, nach möglichst früh gestellter Diagnose eine zeitnahe Behandlung anzustreben, was jedoch erst nach der 18. Schwangerschaftswoche möglich ist (Meyer-Wittkopf et al, 2003c). Das Ziel einer frühen Intervention wäre es, die Sekundärschädigung weitestgehend zu minimieren, evtl. ein kompensatorisches Wachstum des geschädigten Ventrikels zu erreichen und die postnatalen weiterführenden Behandlungsmöglichkeiten sowie die Prognose zu verbessern.

Bisher wurde nur über eine geringe Anzahl erfolgreich durchgeführter intrauteriner Punktionen berichtet. Daher wurde noch in keiner Studie die in utero durchgeführte Ballondilatation mit der postpartalen Standardtherapie verglichen.

1.3.2 Bisherige Experimente und Ergebnisse beim Tiermodell Schaf

Auf Grund der bestehenden Probleme, die bei der intrauterinen, kardialen Intervention beim menschlichen Fet auftreten, wurde bereits am Tiermodell Schaf nach dem geeigneten Vorgehen geforscht. Dies war nach Kenntnis der Autorin das bisher einzige Tiermodell für diese Art der Intervention.

Es werden fetoskopische Eingriffe, Katheterisierung des Herzen über die Umbilicalarterie unter fetaler transösophagealer Ultraschallkontrolle, offene fetale Herzchirurgie, offene transumbilicaler Herzkatheterisierungen sowie ultraschallgesteuerte kardiale Katheterinterventionen transhepatisch über die V. cava inferior beschrieben. Als Komplikationen bei traten Blutungen, technische Probleme, Verletzungen des Chorions oder Septikämien auf (Jouannic et al, 2005; Kohl et al 2000b; Kohl et al 2000c; Kohl et al 1997).

Die durchgeführten Eingriffe entsprechen weder der am Menschen bisher durchgeführten Herzkatheterisierung noch der am Hühnerembryo ausgeführten Interventionen.

Das Tiermodell Schaf bringt einen hohen Aufwand an Arbeit, Zeit und Kosten mit sich. Wird mit Schafen experimentiert, so treten ethische Probleme auf, da es sich um ein Tierexperiment handelt. Durch das Experiment wird das Mutter-schaf und ein gesunder Fet hohen Belastungen und Schmerzen ausgesetzt.

1.3.3 Bisherige Ergebnisse intrauteriner Herzklappeninterventionen zur Korrektur angeborener Fehlbildungen in der Humanmedizin

Kongenitale Fehlbildungen wie Zwechfellhernien, Myelomeningozelen oder Harnwegsobstruktionen werden heutzutage bereits erfolgreich pränatal therapiert (Green et al, 2005; Jung et al, 2005; Meyer-Wittkopf et al, 2003b; Walsh et al 2003, Meyer-Wittkopf, 2002; Walsh et al, 2000). Derzeit gibt es auf dem Gebiet der pränatalen minimalinvasiven Herzpunktion, abgesehen von experimentellen Einzelfallberichten, noch keine etablierten pränatalen Behandlungsmöglichkeiten. Auch bisher durchgeführte Tierversuche auf diesem Gebiet sind rar und weisen deutliche Lücken auf

Darstellung der Vorgehensweise zur intrauterinen Dilatation von stenosierten Pulmonal- oder Aortenklappen aus der Literatur

Nach Sedierung von Mutter und Kind wird durch das mütterliche Abdomen unter sonographischer Kontrolle eine Nadel transthorakal in den Ventrikel des Feten vorgeschoben und in die Nähe der zu dilatierenden bzw. zu eröffnenden Herzklappe gebracht. Nach Entfernen des Mandrins wird über die verweilende Kanüle ein Führungsdraht vorgeschoben, mit dem die Klappe perforiert wird. Über die gesetzte Perforation wird anschließend die Ballondilatation der stenosierten oder atretischen Klappe durchgeführt. In der nach der Dilatation erfolgten Farbdopplerdarstellung der Herzens wird das Perfusionsergebnis kontrolliert. (nach Galindo et al, 2006 ; Tworetzky et al, 2004; Arzt et al, 2003; Tulzer et al, 2002; Kohl et al, 2000a; Lopes et al, 1996; Allan et al, 1995; Maxwell et al, 1991).

Ballondilatation der Pulmonalklappe

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt liegen drei Veröffentlichungen über eine Ballondilatation der Pulmonalklappe bei Pulmonalstenose und –atresie vor.

Galindo et al (2006), Arzt et al (2003) und Tulzer et al (2002) berichten über insgesamt vier behandelte Feten in der 25. bis 30. Schwangerschaftswoche, jeweils mit Pulmonalatresie bzw. hochgradiger Pulmonalstenose bei intaktem Septum interventrikulare. Teilweise lag ein imminenter Hydrops fetalis vor, es bestand zusätzlich ein erhöhter arterieller und zentralvenöser Blutdruck.

Die kardiale Punktion und die Dilatation waren in allen Fällen erfolgreich. Nach der Dilatation zeigte sich bei allen Feten eine Verbesserung der rechtsventrikulären Herzfunktion mit Verbesserung der Effizienz und Abfall des arteriellen und zentralvenösen Blutdrucks auf ein angemessenes Level.

Bei allen Kindern hatte sich der rechte Ventrikel nach dem Eingriff gut entwickelt und es entstand ein biventrikulärer Kreislauf, die Schwangerschaftsdauer konnte in allen Fällen bis über die 30. Schwangerschaftswoche hinaus verlängert werden. Zum Zeitpunkt der Publikationen hatten drei dieser Kinder

ein Alter zwischen 12 und 18 Monaten erreicht, über das Überleben des vierten Kindes wurde vom Autor keine Angaben gemacht.

(nach Galindo et al, 2006; Arzt et al, 2003; Tulzer et al, 2002).

Aufgetretene Komplikationen bei der Dilatation der Pulmonalklappe

Galindo et al (2006) berichten über eine Restenose mit Anzeichen einer Zirkulationsstörung in der 34. Schwangerschaftswoche. Dies führte zu einer vorzeitigen Entbindung mit postpartal erfolgreich durchgeführten Valvuloplastik (Galindo et al 2006).

Tulzer et al (2002) berichten über eine nach der Punktion aufgetretene perikardiale Blutung, die sich spontan verschloss. Außerdem blieb bei zwei Feten die gesprengte Herzklappe nur wenige Wochen geöffnet bevor ein Wiederverschluss in beiden Fällen zur Entbindung in der 35. bzw. 38. Schwangerschaftswoche zwang, die Entbindungen verliefen unproblematisch, bei keinem der Kinder wurde eine Einstichstelle in der Brust gefunden (Tulzer et al, 2002).

Arzt et al (2003) beschreiben eine über die Punktion hinaus bestehende Bradykardie, die erfolgreich mit Atropin behandelt wurde (Arzt et al, 2003).

Alle Kinder wurden mit Prostaglandin behandelt, in allen vier Fällen erfolgte eine erneute Dilatation der Klappe post partem. Zusätzlich wurde bei den Neugeborenen ein Blalock-Taussig-Shunt gelegt, um die Lungenperfusion zu gewährleisten (Galindo et al, 2006; Arzt et al, 2003; Tulzer et al, 2002).

Ballondilatation der Aortenklappe

Intrauterine Dilatationen der Aortenklappe wurden zwischen 1989 und 2000 von unterschiedlichen Teams in sieben internationalen Zentren durchgeführt. Insgesamt wurde bei 40 Feten mit stenosierter bzw. atretischer Aortenklappe und daraus resultierender hochgradiger linksventrikulärer Dysfunktion eine kardiale Punktion zur Ballondilatation der erkrankten Klappe durchgeführt. Die Punktion erfolgte in allen Fällen zwischen der 21. und 33. Schwangerschaftswoche, ein bis neun Wochen nach Diagnosestellung.

Die Punktion war in 25 Fällen technisch erfolgreich. Bei 14 Patienten wurde in den Wochen nach der Dilatation mittels Doppler-Sonographie ein signifikantes Wachstum der Aorten- sowie der Mitralklappe festgestellt, allerdings bei nicht-signifikantem Wachstum des linken Ventrikels. Es konnte auch eine Verbesserung der linksventrikulären Leistung nachgewiesen werden, welche sich gegen Ende der Schwangerschaft jedoch häufig wieder verschlechterte.

Von den erfolgreich punktierten Feten haben langfristig elf überlebt, nur drei mit biventrikulärem Kreislauf. Bei fast allen überlebenden Feten war eine erneute Ballondilatation oder eine chirurgische Intervention nach der Geburt nötig.

(nach Wilkins-Haug, 2005 ; Tworetzky et al, 2004 ; Kohl et al, 2000a ; Lopes et al 1996 ; Allan et al, 1995 ; Maxwell et al, 1991)

Aufgetretene Komplikationen bei der Dilatation der Aortenklappe

Bei der Aortenklappe trat in einigen Fällen das Problem auf, dass das Überwinden der Klappe mit dem Führungsdraht nicht möglich war und sie somit nicht dilatiert werden konnte. Diese Kinder verstarben häufig intrauterin oder wenige Tage nach der Geburt (Tworetzky et al, 2004; Maxwell et al, 1991).

Bei einigen Feten wurde der Ballon im Ausflusstrakt und nicht auf Höhe der Klappe dilatiert, so dass keine Verbesserung der Ausflussrate erzielt werden konnte (Maxwell et al 1991).

Als ein weiteres häufig aufgetretenes Problem stellte sich der Ballonabriss dar. Dabei sind beim Zurückziehen des Ballons in die Nadel an deren scharfer Spitze Teile des Ballons abgerissen und im Herzen, im Herzmuskel oder der Lunge verblieben. Embolien sind dadurch in keinem der Fälle entstanden (Tworetzky et al, 2004; Lopes et al, 1996; Allan et al 1995).

Viele Feten verstarben im Mutterleib oder nach der Geburt an den Folgen von Blutungen, persistierenden Bradykardien, kardialer Dysfunktion, Pleuraergüssen, Amnionitiden oder an der postpartalen chirurgischen Intervention. Maternale Komplikationen wurden nicht beschrieben (Tworetzky et al, 2004 ; Kohl et al, 2000a ; Lopes et al 1996 ; Allan et al, 1995 ; Maxwell et al, 1991).

1.4 Herzentwicklung

1.4.1 Herzentwicklung beim Menschen

Die Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems beginnt in der 2. – 3. Woche, es nimmt als erstes embryonales Organsystem im Carnegie-Stadium 10 (am 22. Tag post ovulationem) seine Funktion auf, am 23. Tag können Herzaktionen bereits sonographisch nachgewiesen werden (Drews, 2006; Sohn et al, 2000).

Vor der Prächordalplatte bilden sich Kapillarinseln aus primitiven Blutzellen und Endothelzellen. Aus diesen Inseln entwickeln sich Endothelschläuche, aus denen sich bei der lateralen Abfaltung ein einheitlicher Herzschlauch formt. Die Perikardhöhle entsteht zum gleichen Zeitpunkt (Chinchilla et al, 2006 ; Drews, 2006; Gittenberger-de Groot et al, 2005 ; Sadler, 2003; Arey, 1965).

Am 23. Tag wächst der an der Einfluss- und Ausflussbahn in der Perikardhöhle fixierte Herzschlauch weiter und es bildet sich bis zum 25. Tag die s-förmige Herzschnleife. Bei der Entwicklung der Herzschnleife treten Asymmetrien auf, durch die zwei laminare Blutströme entstehen, die das Herz funktionell in rechts und links teilen (Chinchilla et al, 2006; Drews, 2006; Gittenberger-de Groot et al, 2005; Moorman et al 2003; Sadler, 2003; Arey, 1965).

Durch die Entwicklung eines Vorhof- und eines Kammerseptums zwischen dem 28. und 34. Entwicklungstag p.o. werden die Blutströme endgültig voneinander getrennt. In der 5. Woche bildet sich im Truncus und Conus des Herzens das Septum aorticopulmonale, das die Aorta und den Truncus pulmonalis voneinander trennt (Drews, 2006; Anderson et al, 2003a, Sadler; 2003).

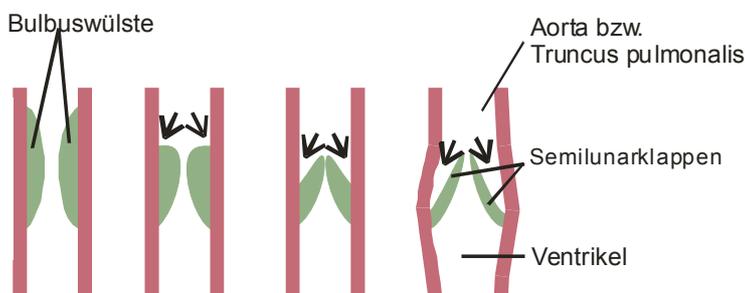


Abb. 1: Embryologische Entwicklung der Semilunarklappen
Quelle: Modifiziert nach Armstrong et al, 2004; Anderson et al, 2003b; Sadler, 2003; Wessels et al, 1996

Durch Mesenchymproliferation im Atrioventrikularkanal und anschließende Aushöhlung der entstandenen Polster auf der Ventrikelseite bilden sich die Segelklappen heraus (Drews, 2006; Armstrong et al, 2004; Anderson et al, 2003b; Sadler, 2003; Wessels et al, 1996; Teal et al 1986).

Bei der Ausbildung der Taschenklappen entstehen kleine Höckerchen an den Ursprüngen von Aorta und Truncus pulmonalis. Es treten jeweils drei subendokardiale Polster auf, die in die Bahn der Aorta und des Truncus pulmonalis hinein ragen. Durch den diastolischen Blutrückfluss werden die Höckerchen allmählich ausgehöhlt, es entstehen die Taschen der Aorten- und Pulmonalklappe (Abb. 1) (Drews, 2006; Armstrong et al, 2004; Anderson et al, 2003b; Sadler, 2003; Schröder et al, 2003; Oosthoek et al 1998; Teal et al 1986).

1.4.2 Störungen in der Entwicklung der Semilunarklappen

Wenn bei der im oberen Abschnitt beschriebenen Entstehung der Aorten- bzw. Pulmonalklappe die Semilunarklappen teilweise miteinander verschmolzen sind, entsteht eine Aortenklappenstenose bzw. eine Stenose der Pulmonalklappe. Die Klappen erscheinen dann klein, deformiert und partiell verwachsen. Dies kann soweit gehen, dass bei der Aortenstenose nur eine stecknadelkopfgroße Öffnung bestehen bleibt. Der Ventrikel ist auf Grund dieses Befundes häufig zu klein ausgebildet, selten ist er vergrößert und hypokinetisch. Dies hat Auswirkungen auf die die Größe und das Lumen der absteigenden Aorta, sie wird als hypoplastisch oder kontrahiert beschrieben. Häufig finden sich ein retrograder Blutfluss in der Aorta sowie eine deutlich reduzierte linksventrikuläre Funktion.

Bei der Aortenklappenatresie sind die Semilunarklappen komplett miteinander verschmolzen. Dies hat zur Folge, dass sowohl der linke Vorhof und der linke Ventrikel als auch die Aorta deutlich unterentwickelt sind, es besteht ein funktionell univentrikuläres Herz. Die Körperperfusion wird vom rechten Ventrikel getragen und ist, vor allem postpartal, abhängig vom Ductus arteriosus Botalli und einem offenen Foramen ovale. Postpartal erfolgt eine

Parallelschaltung von großem und kleinem Kreislauf. Wird nun in der Fetalperiode intrauterin die atretische Klappe dilatiert, hat das Herz und auch die Aorta die Möglichkeit sich bis zur Geburt zu entwickeln und zu kräftigen.

Bei der Pulmonalstenose hingegen ist der Stamm des Truncus pulmonalis eng oder atretisch, so dass das offene Foramen ovale für das Blut aus dem rechten Herzen die alleinige Ausflussbahn darstellt. Der Ductus arteriosus ist immer offen, weil nur über diesen Weg die Lungen durchblutet werden können.

(nach Wilkins-Haug et al, 2005; Wloch et al, 2004; Meyer-Wittkopf et al, 2003b; Sadler, 2003, Collins-Nakai et al, 2002, Simpson et al, 1997; Berishvili et al, 1995, Hornberger et al, 1995 ; Okada 1991)

Derzeit wird die molekulare und morphogenetische Grundlage der Klappenentwicklung erforscht, um somit Rückschlüsse auf Ursachen von Herzklappenfehler ziehen zu können (de Lange et al, 2004; Lincoln et al, 2004).

1.4.3 Herzentwicklung beim Huhn

Die Entwicklung von Hühnerembryonen im Ei, die 21 Tage umfasst, wird nach Hamburger und Hamilton (HH, 1951) in 46 Stadien eingeteilt. Die Stadieneinteilung richtet sich nach den einzelnen Entwicklungsschritten; das für jedes Entwicklungsstadium benötigte Zeitintervall wird angegeben. Im Folgenden werden die wichtigsten Stadien in der Herzentwicklung des Huhns dargestellt.

Die Entwicklung der Herzanlage beim Huhn beginnt mit der Abfaltung des Embryos im Stadium 9 nach Hamburger und Hamilton (HH, 1951). Dies entspricht einer Bebrütungszeit von etwa 29 Stunden.

Der Ablauf der Herzentwicklung entspricht ungefähr der des Menschen. Innerhalb der nächsten zehn Stunden (HH 10, 33 – 38 Stunden) entwickelt sich der Herzschlauch, im Stadium 15 nach HH (50-55 Stunden) hat sich die s-förmige Herzschleife bereits vollständig ausgebildet.

Die Septierung des Herzens beginnt im Stadium 15 HH (50-55 Stunden) mit der Vorhofseptierung, kurz darauf, im Stadium 19-20 HH (68 – 72 Stunden) beginnt die Kammerseptierung und in Stadium 25 HH (4,5 – 5 Tage) schließlich die

Septierung des Ausflusstraktes. Der Vorgang der Vorhof- und Kammerseptierung ist im Stadium 34 HH (8 Tage) abgeschlossen.

Im Stadium 21 HH (3,5 – 4 Tage) beginnt die Entwicklung der Atrioventrikularklappen. Am Tag 6,0 (Stadium 29 HH) sind die Mitral- und Trikuspidalklappe vollständig entwickelt. Die Ausbildung der Semilunarklappen beginnt im Stadium 28 (5,5 Tage) und endet im Stadium 34 HH (8,0 Tage), leichte Umbauvorgänge finden aber noch bis zum 14. Tag (Stadium 40 HH) statt.

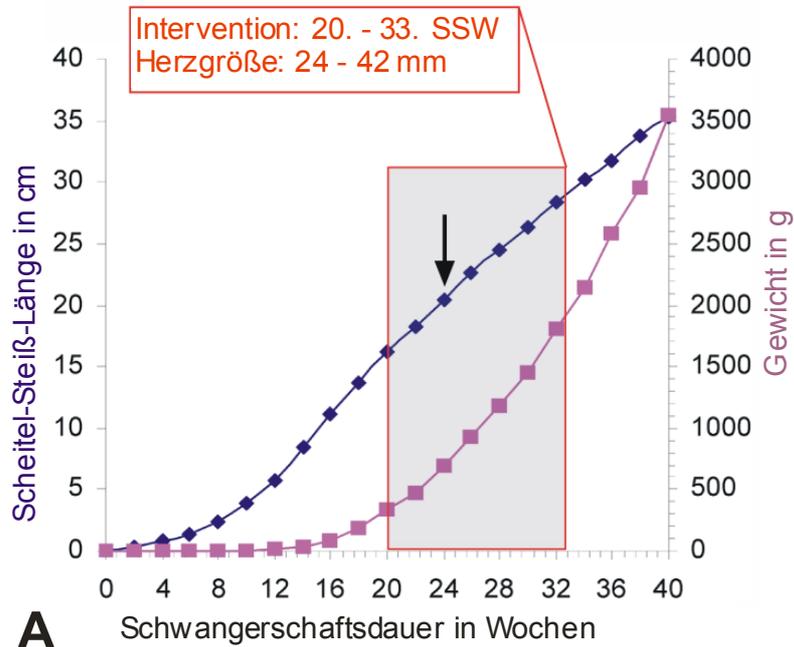
Die Herzentwicklung ist am Tag 14 (Stadium 40 HH) abgeschlossen, anschließend folgt die Reifung und das Wachstum bis zum Schlüpfen am 21. Tag. (nach Martinsen, 2005; de la Cruz et al, 1983; Patten, 1974; Arey, 1965)

1.4.4 Vergleichende Herzentwicklung Mensch und Huhn

Die humane Embryonalperiode mit der Organogenese endet in der 8. SSW p.o.. In der darauf folgenden Fetalperiode erfolgt das Größenwachstum des Embryos und die Ausreifung der Organsysteme (Drews, 2006; Sadler, 2003). Das Huhn befindet sich bis zum Schlüpfen in der Embryonalperiode, das Herz ist bereits nach 100 Stunden Bebrütung voll ausdifferenziert, die Lungenatmung beginnt zwischen dem 12. und 16. Bebrütungstag (Bezzel et al, 1990).

Beim Menschen findet die Katheterintervention in der 20. – 33. SSW p.o. statt. Der Fetus hat zu diesem Zeitpunkt eine Scheitel-Steiß-Länge von 17 – 27 cm (Abb. 2A) sowie eine Herzlänge von 24 – 42 mm und eine Herzbreite von 17 – 35 mm (Drews, 2006; Sohn et al, 2000). Das entsprechende Stadium ist beim Hühnerembryo nach 11 Tagen Bebrütung erreicht. Der Hühnerembryo hat eine Scheitel-Steiß-Länge von 3 – 4 cm (Abb. 2B). Da derzeit keine adäquaten Instrumente für ein so kleines Tiermodell auf dem Markt sind, war es unmöglich die Herzkatheterintervention zu diesem Zeitpunkt durchzuführen. Daher wurde die Punktion beim Küken am 18. Bebrütungstag (Stadium 44 HH) mit den kleinsten verfügbaren Instrumenten durchgeführt. Das Hühnerherz hat etwa $\frac{1}{4}$ der Größe des menschlichen Herzens im respektiven Stadium und weist eine Länge von 8,5 – 9,8 mm und eine Breite von 6,7 – 7,8 mm auf (Romanoff, 1960).

Wachstumskurve des menschlichen Embryos



Wachstumskurve des Hühnerembryos

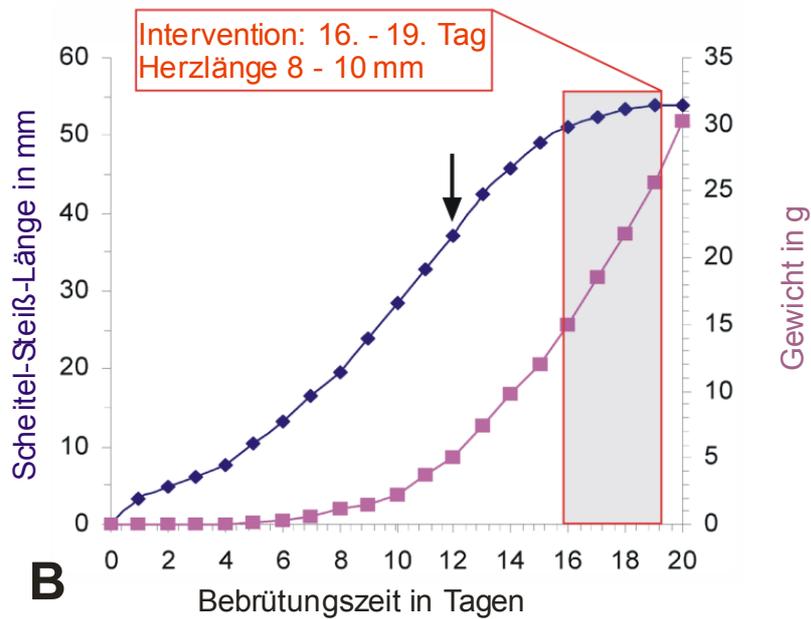


Abb. 2: Wachstums- und Gewichtskurven von menschlichem und Hühnerembryo. Die roten Kästen in A und B markieren den möglichen Interventionszeitraum. Die Pfeile in A und B zeigen den gleichen Entwicklungsstand von menschlichem Fetus (24 SSW) und Hühnerembryo (12 Tage)

A: Wachstumskurve des menschlichen Embryos und Fetus (Drews, 2006; Sohn et al, 2000).

B: Wachstumskurve des Hühnerembryos (Romanoff, 1960).

Zum jeweiligen Punktionszeitpunkt, aber auch nach der Geburt bzw. dem Schlüpfen bestehen Unterschiede im Kreislaufsystem zwischen Mensch und Huhn. Im fetalen Kreislauf des Menschen wird das Blut aus der V. cava inferior über das Foramen ovale im Vorhofseptum in den linken Vorhof und weiter die linke Kammer geleitet. Bei der Geburt verschließt sich das Foramen ovale auf Grund einer Druckdifferenz im rechten und linken Herzen (Drews, 2006). Beim Hühnerembryo finden sich anstatt eines Foramen ovale eine Vielzahl an irregulär auftretenden Perforationen im interatrialen Septum, die auf Grund ihres Aufbaus mit sich überlappenden Gewebesträngen die gleiche Funktion wie das Foramen ovale besitzen. Bereits am 12. – 16. von 21 Bebrütungstagen erfolgt die Umstellung auf die Lungenatmung nachdem der Hühnerembryo mit seinem Eizahn die Schalenhaut zur Luftkammer durchstoßen hat. Dabei verschließen sich die Perforationen wie auch beim Menschen das Foramen ovale bei der Geburt (Drews, 2006; Bezzel et al, 1990).

Neben dem Kreislaufsystem bestehen auch makroskopische Unterschiede. Das menschliche Herz besteht aus je zwei Vorhöfen und Kammern und kommt zwischen den Lungenflügeln im Mediastinum zu liegen. Das Herz des Huhnes liegt in der Mittellinie der Brusthöhle und ist, da die Lungen hoch dorsal gelegen sind, beidseits von der Leber umschlossen. Es weist die gleiche Aufteilung in Vorhöfe und Ventrikel auf wie das menschliche Herz. Ein Unterschied ist nur in spezifischen Strukturen erkennbar. Die V. cava cranialis und die V. cava caudalis münden in einen erkennbaren, aber nicht sehr deutlich abgesetzten Sinus venosus, der nicht in die rechte Vorhofwand eingegliedert ist. Er ist durch zwei zarte muskuläre Klappen, die linke und rechte Sinuatrialklappe, vom rechten Vorhof getrennt. Des Weiteren wird die rechte Atrioventrikularklappe durch eine starke und breite Muskelklappe ersetzt, sie besitzt keine Chordae tendineae. Die linke Atrioventrikularklappen sowie die Semilunarklappen ähneln den menschlichen. Beim Huhn vereinigen sich die rechte und linke Lungenvene und münden mit einem gemeinsamen Stamm in die linke Atrioventrikularöffnung ein, dort werden sie von einer Lungenvenenklappe begrenzt, die den

1 Einleitung

Blutfluss in den linken Ventrikel leitet und den Rückfluss verhindert (Bezzel et al, 1990; King et al, 1978).

Die aufgezeigten Unterschiede sind für die vorliegende Arbeit nicht relevant, für die Punktionen und Nachuntersuchungen waren die Ventrikel von Bedeutung.

Die folgende Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung der wichtigsten Punkte der Herzentwicklung beim Menschen und beim Huhn.

<u>Herzentwicklung</u>	<u>Mensch</u>		<u>Huhn</u>		
	<u>Alter</u> <u>p.o.</u>	<u>Größe</u> <u>mm</u>	<u>Stadium</u> <u>HH</u>	<u>Alter</u>	<u>Größe</u> <u>mm</u>
<u>Beginn</u> <u>Herzentwicklung</u>	2 – 3 Wochen	< 2	9+	> 29 hr	3,7
<u>Erste</u> <u>Herzkontraktion</u>	22 Tage	2	10	33 hr – 38 hr	> 3,7
<u>Erster Blutfluss</u>	24 Tage	2,5 - 3	12+	> 45 hr	4,9
<u>Ausbildung s-</u> <u>förmige</u> <u>Herzschleife</u>	25 Tage	2,5 - 3	15	50 hr – 55 hr	6,1
<u>Entwicklung</u> <u>Vorhof- und</u> <u>Kammerseptum</u>	28 – 34 Tage	4 - 10	15 - 34	50 hr – 8 d	6,1 - 19
<u>Bildung</u> <u>Semilunarklappen</u>	39 – 60 Tage	17 - 40	28 - 34	5 ½ d - 8 d	13 – 19
<u>Frühest mögliche</u> <u>diagnostische</u> <u>Fetalechokardio-</u> <u>graphie</u>	ab 13. SSW	> 80	---*	---*	---*
<u>Frühest mögliche</u> <u>therapeutische</u> <u>Interventionen</u> <u>(allgemein)</u>	18 SSW	> 130	---*	---*	---*
<u>Zeitraum für</u> <u>Herzpunktionen</u>	20. – 33. SSW	167 – 310 mm	42 - 44	16 – 18 d	> 22,5

Tab. 2: Wichtige Punkte der Herzentwicklung beim Menschen und beim Huhn

* derzeit sind keine Angaben verfügbar

Quelle: Nach Martinsen, 2005; Anderson et al 2003a, Anderson et al 2003b, Meyer-Wittkopf et al, 2003c; Moorman et al, 2003; Drews, 1993; Sissman, 1970

1 Einleitung

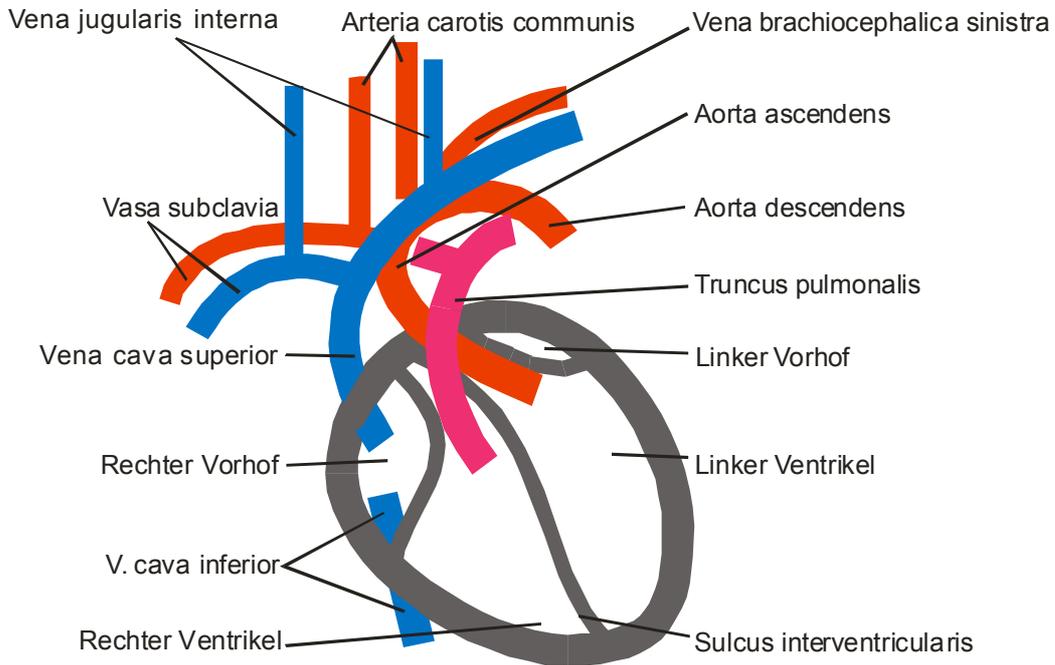


Abb. 3: Schematische Darstellung des menschlichen Herzens
 Quelle: Modifiziert nach Netter, 2000

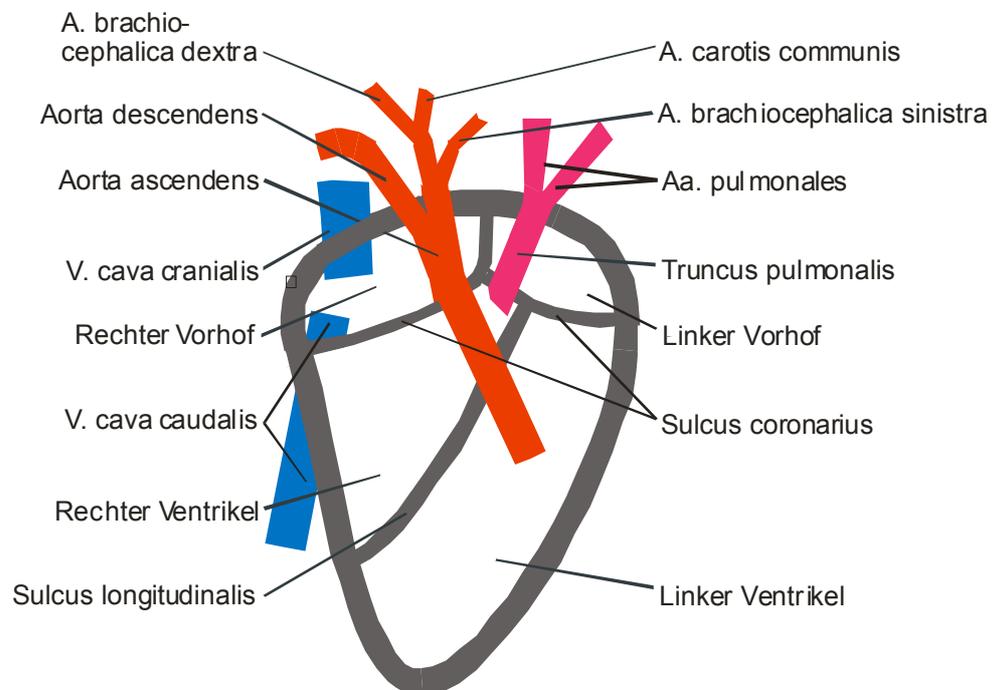


Abb. 4: Schematische Darstellung des Hühnerherzens
 Quelle: Modifiziert nach Bezzel et al, 1990; King et al, 1978; Herzog, 1968

1.5 Wahl des Tiermodells Hühnerembryo und vorbestehende Probleme

Der Hühnerembryo ist ein klassisches Modell um die embryonale Entwicklung zu verfolgen und zu untersuchen. Wir gebrauchten den 18 Tage alten Hühnerembryo als Modell für ultraschallgesteuerte intrauterine Herzkatheterinterventionen um das technische Vorgehen zu verbessern und um mögliche negative Auswirkungen auf das Herzgewebe zu untersuchen.

Das Tiermodell wurde nach folgenden Merkmalen ausgewählt: 1. gute und kostengünstige Verfügbarkeit in großer Anzahl, 2. einfach im Umgang, keine zeitintensive Anzucht, gute optische Kontrolle des Entwicklungsstadiums, 3. schnelle Entwicklung, 4. individuelles Wachstum (kein weiterer Embryo wird während der Intervention in Mitleidenschaft gezogen), 5. kein Muttertier, das für die Experimente geopfert werden muss, 6. ähnliche Herzanatomie Mensch – Huhn, 7. ethische Vertretbarkeit (es handelt sich um ein ungeschlüpftes Tier, das zum Interventionszeitpunkt noch nicht lebensfähig ist).

Als vorbestehende Probleme wurden vor allem die Größe des Embryos und die seines Herzens angesehen, da diese in einem deutlich kleineren Verhältnis zur Punktionskanüle stehen als das menschliche fetale Herz. Bei Kanülen mit kleinerem Durchmesser stellt sich die Ultraschalldarstellung und Punktion als schwierig dar. Des Weiteren waren sowohl die Kalkschale als auch die Schalenhaut ein Problem für die Ultraschalldarstellung, da die Schallwellen reflektiert werden und keine Bildeinstellung möglich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Bebrütung

Als Modell zur Simulation intrauteriner Herzpunktionen dienten im Ei befindliche Hühnerembryonen der Gattung *Gallus gallus domesticus* am 18. Bebrütungstag. Die Bruteier des Stammes Braunes Leghorn, Hybride, wurden von der Firma Anton Weiß, Vermehrungszucht GmbH, Hauptstraße 2 in 88486 Kilchberg/Iller bezogen.

Die Hühner wurden in einem kleinen Brutschrank (Grumbach compact 584, Firma Ehret, 79312 Emmendingen) bei einer Temperatur von 37,8 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 85 % für 18 Tage inkubiert.

Zur regelmäßigen Kontrolle des Wachstums der Hühnerembryonen im Ei wurde eine Eilampe aus eigener Herstellung eingesetzt.

2.2 Eischalenpräparation

Zur Präparation der Eischale wurden unterschiedliche Techniken eingesetzt.

Nach gründlicher Desinfektion der Eioberfläche mit 70%igem Alkohol wurde die Eischale mittels eines handelsüblichen Eierstechers seitlich eröffnet um 2 ml Eiklar zu entfernen. Das entstandene Loch in der Eischale wurde mit Isolierband (Scotch Super 88, Firma 3M, St. Paul, MN, USA) verschlossen. Zur Präparation wurden die Eier in Paraffinhalter aus eigener Herstellung gelegt. Mit einer Metallsäge (Stanley High Speed Flexible, Firma The Stanley Works, New Britain, CT, USA) wurde ein ungefähr 2,5 x 2,0 cm großes Rechteck in die Eischale gesägt. Das entfernte Eiklar wurde durch sterile Tyrode-Lösung ersetzt um eine Adhäsion des Hühnerembryos durch Dehydratation zu vermeiden. Das entstandene Fenster wurde mit Isolierband oder steriler Folie (3M Tegaderm™ HP Transparentverband, Firma 3M Medica, 41460 Neuss) abgeklebt.

In einigen Fällen wurde die Eischale erst nach 18 Tagen Bebrütung direkt vor der Punktion gefenstert. In diesen Fällen wurde die Schale vorsichtig entfernt

ohne die darunter liegende Schalenhaut und Chorioallantois zu verletzen. Die entstandenen Fenster wurden erst nach der Ultraschalldarstellung mit Isolierband beklebt.

2.3 Ultraschallgerät, Schallkopf, Kontaktgel, Tyrode-Lösung

Für die Ultraschalldarstellung nach 18 Tagen Bebrütung wurde die Luftblase unterhalb des Isolierbandes mit steriler Tyrode-Lösung aufgefüllt. Die Darstellung des Hühnerembryos im Ei vor der Punktion erfolgte mittels 2-D-Ultraschall (Ultraschallgerät: Aplio 50; vaginaler Schallkopf: Toshiba PVT-661VT, Frequenz 6 MHz; Schallkopf zur Anwendung in der Neonatologie: Toshiba PST-65AT, Frequenz 6,5 MHz, alles Firma Toshiba Medical Systems GmbH, 41460 Neuss – 1) durch das Fenster in der Eischale. Das schlagende Herz wurde durch Duplex-Sonographie farbcodiert dargestellt.

2.4 Punktionssysteme

Unter duplexsonografischer Kontrolle wurde die kardiale Punktion transthorakal mit einer 22 G-Kanüle (Spinocan, Größe 0,70 x 88 mm/22 G x 3½", Firma B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen) durchgeführt. Zur Markierung des Stichkanals wurde entweder Tusche oder Nilblausulfat injiziert. Bei drei Herzen wurde ein 18 G-Katheter (Spinocan, Größe 1,3 x 88 mm/18 G x 3½", Firma B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen) zur Punktion verwendet. In diesen Fällen wurde ein Mikrokatheter aus Teflon eingebracht (Excelsior SL 10) über den mittels Führungsdraht (Synchro™ Hydrophilic M 00313010 Guidewire) ein Coil (Matrix Detachable Coil Standard/SR, helikale Form, alle Firma Boston Scientific International B.V., Paris, Frankreich) ins Herz platziert wurde.

2.5 Nachuntersuchung des punktierten Herzens

Zur Nachuntersuchung des punktierten Herzens wurde dieses mit Mikroinstrumenten aus dem Thorax herauspräpariert. Unter dem Stereomikroskop (Stemi 2000, Firma Zeiss, 72447 Oberkochen) wurde das Herz und der Stichkanal untersucht. Zur histologischen Analyse wurden die Herzen in Paraffin gebettet. Anschließend wurden am Mikrotom (Leitz 1515, jetzt Firma Leica Microsystems AG, 35578 Wetzlar) 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Das Gewebe wurde mit Hämalaun und Eosin gefärbt und anschließend mit dem Mikroskop (Axiolab, Firma Zeiss, 73447 Oberkochen) untersucht.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die in den Versuchsreihen erzielten Ergebnisse dargestellt. Zu Beginn werden die Techniken der Eischalenpräparation und die Probleme der Schalenhaut dargestellt. Des Weiteren werden in diesem Kapitel die Ultraschalldarstellung des Hühnerembryos im Ei, die Herzpunktion sowie die Markierung des Stichkanals aufgeführt. Das letzte Unterkapitel befasst sich mit der mikroskopischen Darstellung des Stichkanals.

3.1 Experimentalablauf

Die Tabelle 3 stellt den Ablauf der Experimente in einer kurzen Übersicht dar.

<u>Vorgehen</u>	<u>Zeitdauer/Zeitpunkt</u>	<u>Unterkapitel</u>	<u>Seite</u>
<u>Bebrüten der Hühnereier</u>	18 Tage	2.1	18
<u>Präparation der Eischale</u>	nach 48 h Bebrütung bzw. am Tag der Punktion	3.3	23
<u>Ultraschalldarstellung des Embryos</u>	18. Bebrütungstag	3.5	27
<u>Punktion des Herzens unter Ultraschallkontrolle</u>	am Tag der Ultraschalldarstellung	3.6	31
<u>weitere Beobachtung nach Punktion</u>	Stunden bis Tage nach der Punktion, Schlüpfen eines Kükens am 20. Tag	3.7	35
<u>Präparation und Nachuntersuchung des Herzens in situ und am Stereomikroskop</u>	abhängig von der Überlebenszeit nach der Punktion	3.8	36

Tab. 3: Übersichtliche Darstellung des Experimentalablaufs

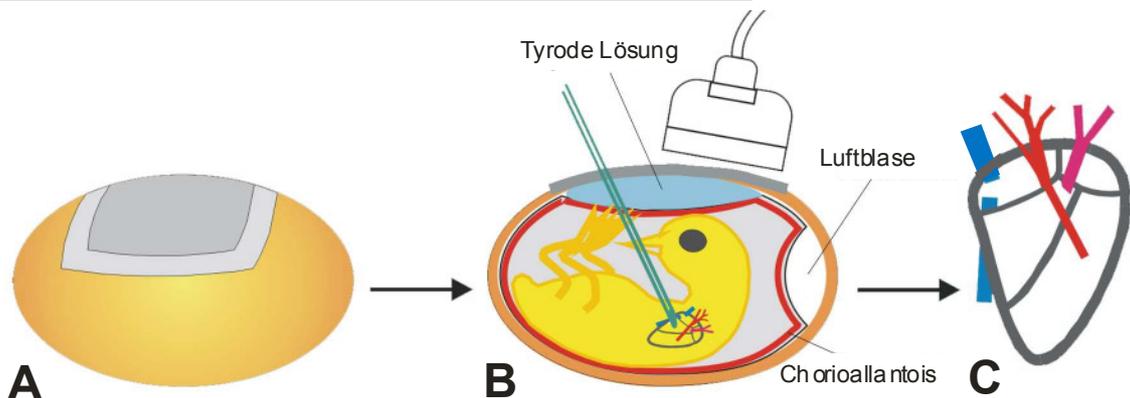


Abb. 5: Design und Aufbau des Experimentes

A: gefensteretes Ei, das Fenster ist mit Tegadermfolie abgeklebt

B: Nach 18 Tagen Bebrütung wurde die ultraschallgesteuerte Herzpunktion durch das Fenster in der Eischale durchgeführt.

C: Nachuntersuchung des embryonalen Hühnerherzen nach Entfernung aus dem Thorax

In Abbildung 5 werden das Experimentaldesign sowie die wichtigsten Schritte des Ablaufs graphisch dargestellt. Das gefensterete Ei wurde mit Tegadermfolie oder Isolierband abgeklebt. Nach 18 Tagen Bebrütung wurde durch das Fenster in der Eischale die ultraschallgesteuerte Herzpunktion durchgeführt. Nach 3 – 24 h Überleben nach der Punktion wurden die Tiere geopfert um das Herz vom Thorax zu isolieren und stereomikroskopisch und histologisch zu untersuchen.

3.2 Anzahl der Experimente, Menge der Hühnereier

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden elf Experimentalserien durchgeführt, hierfür wurden insgesamt 120 Hühnereier bebrütet. Von den bebrüteten Embryonen wurden 42 im Ultraschall dargestellt und 38 waren am Ende für die Punktion geeignet.

3.3 Eischalenpräparation

Im folgenden Abschnitt werden die unterschiedlichen Möglichkeiten aufgezeigt, wie eine Eischale präpariert werden kann. Es werden die Techniken zur Schalenpräparation am Tag der Punktion und zum Fenstern am zweiten Bebrütungstag dargestellt.

Die Schale der Hühnereies hat ungefähr eine Dicke von 0,2 mm und besteht vor allem aus Kalk und nur zu ungefähr 3 % aus organischem Material, wobei der Kalkgehalt der Schale im Verlauf der Bebrütung, durch Einbau in die sich bildenden Knochen des Embryos, absinkt. Die Schale besitzt zahlreiche Poren, durch die ein Gasaustausch stattfindet, der für die Atmung des Embryos notwendig ist. Des Weiteren können Wassermoleküle austreten. Durch ihren Aufbau ist die Schale für Ultraschallwellen nicht durchdringbar; daher musste die Schale vor der sonographischen Darstellung präpariert – gefenstert – werden.

3.3.1 Präparation der Eischale am Tag der Punktion

In den ersten Versuchsreihen wurden die Eier nach 18 Tagen Inkubation direkt vor der Katheterintervention gefenstert. Das Küken hat zu diesem Zeitpunkt bereits die gleiche Größe wie das Ei erreicht und liegt mit Kopf und Nacken gegen den stumpfen Eipol, der Thorax mit dem Herzen ist also unter der länglichen Eiachse zu finden. Das Küken dreht sich automatisch mit dem Rücken zur Eiunterseite, so dass es keine Rolle spielt, wo genau gefenstert wird, die Punktion kann in jedem Falle transthorakal durchgeführt werden.



Abb. 6: Ei am Punktionstag mit angesägten Sollbruchstellen

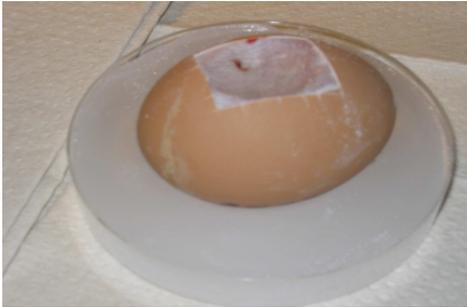


Abb. 7: Blick auf die Schalenhaut bei am Punctionstag präpariertem Ei, kleine Einrisse der Haut sichtbar

Die Eischale wurde wie in Kapitel 2.2 beschrieben gefenstert. Das angesägte Rechteck hatte eine Größe von ca. 2,5 x 2,0 cm. Zur Vereinfachung der Präparation wurde die Fläche des großen Rechteckes durch Ansägen der Eischale in kleine Rechtecke mit einer Seitenlänge von maximal 0,3 – 0,4 cm unterteilt (Abb. 6). Dies erleichterte das Abheben der Eischale

und gewährleistete, dass die darunter liegende Schalenhaut und Chorioallantois intakt blieben (Abb. 7). Ein Einreißen der Chorioallantois hätte unkontrollierbare Blutungen und den Tod des Hühnerembryos zur Folge.

Die Überlebensrate der Hühnerembryonen war bei dieser Methode weit aus höher als bei der Präparation am zweiten Bebrütungstag. Es wurden insgesamt für diese Technik 58 Hühnereier inkubiert, in 30 Hühnereiern wuchsen Hühnerembryonen heran. Dies entspricht einer Überlebensrate von 51 %. Die Ursache für das Absterben der 28 Embryonen ist nicht bekannt und wurde für die vorliegende Arbeit nicht untersucht.

3.3.2 Präparation nach 48 h Bebrütung, Isolierband

Die Eischalenpräparation nach 48 Stunden Bebrütung wurde wie in Kapitel 2.2 dargestellt durchgeführt.

In diesem frühen Stadium liegt die Schalenhaut noch direkt an der Eischale an und wird bei der Präparation mit entfernt. Die zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig entwickelte Chorioallantois und die kleine Größe des Embryos erlaubten eine Schalenfensterung ohne Verletzung und Blutung. Das Gefäßnetz der Chorioallantois bildet sich auch bei Vorhandensein des Fensters in der Eischale normal aus.

Nachdem die Eischale präpariert war, wurde das Fenster mit Isolierband dicht verschlossen und das Ei konnte weiter bebrütet werden.

3 Ergebnisse

Für diese Arbeit wurden 42 Hühnereier am zweiten Tag der Inkubation gefenstert, nur 12 konnten für die Punktion verwendet werden. Dies entspricht einer Überlebensrate von 29 %. Die Gründe für den Verlust von 30 Eiern waren Fehler bei der Eischalenpräparation, Probleme bei der Inkubation (Temperatur- oder Luftfeuchtigkeitsschwankungen) oder Infektionen im Ei.

3.3.3 Präparation nach 48 h Bebrütung, Folie

Bei dieser Variante der Eischalenpräparation wurde die Schale wie oben beschrieben gefenstert. Anstatt das entstandene Fenster mit Isolierband abzukleben, wurde die durchsichtige, sterile Folie von TegadermTM-Pflastern verwendet (Abb. 8). Diese Pflaster werden im klinischen Gebrauch zur Fixierung peripherer Venenverweilkatheter verwendet.

Der Hühnerembryo konnte auf diese Weise für weitere 16 Tage bebrütet werden, der Entwicklungsverlauf konnte durch das transparent abgeklebte Fenster problemlos ohne Öffnen des Eies beobachtet werden.

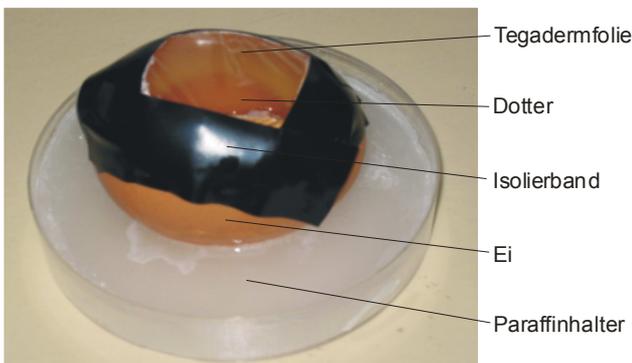


Abb. 8: gefenstertes Ei abgeklebt mit TegadermTM-Folie

3.4 Probleme der Schalenhaut

Im Rahmen dieser Arbeit traten häufig Probleme mit der Schalenhaut des Eies auf, da über diese keine Ultraschalldarstellung des Kükens möglich war.

Ein Experiment diente dazu, die Ultraschallundurchlässigkeit der Eischalenhaut zu beweisen und zu zeigen, dass keine anderen Einstrukturen die Ultraschallausbreitung hemmen. Vier Tage alte Hühnerembryonen in einer Abdampfschale dienten als Modell, das im Ultraschall dargestellt werden sollte. Von 18 Tage bebrüteten Hühnereiern wurde die Schalenhaut entfernt und für die Ultraschalldarstellung auf die Abdampfschale gelegt. Anschließend wurde über die Schalenhaut versucht, eine sonographische Darstellung des Embryos zu erzielen. Der vier Tage alte Hühnerembryo in der Abdampfschale konnte auf Grund starker Reflexionen in keinem der durchgeführten Versuche abgebildet werden. Wurde die Eischalenhaut entfernt, konnte der Embryo deutlich dargestellt werden.

Histologische Untersuchungen der Schalenhaut zeigten ein kompaktes Netz kollagener Fasern, das für die Impermeabilität der Ultraschallwellen verantwortlich ist.

Da es trotz intensiver Bemühungen nicht möglich war, während den durchgeführten Versuchsreihen eine adäquate Lösung für das Problem der Schalenhaut zu finden, wurde diese bei den 30 Hühnereiern, die am Punktionsstag gefensteret wurden, direkt vor der Ultraschalldarstellung mit einer Pinzette entfernt. Da die Chorioallantois mit ihrem Gefäßnetz direkt unter der Schalenhaut liegt, war die Entfernung der Schalenhaut unvermeidbar mit einem Einriss des Gefäßnetzes verbunden. Dies hatte für den Embryo Blutverluste zur Folge, so dass dieser je nach Menge des Verlustes innerhalb von Minuten bis Stunden verendete.

3.5 Ultraschalldarstellung

Im Folgenden wird die Durchführung und Verbesserung der Ultraschalldarstellung beschrieben. Es werden nachfolgend die verschiedenen Möglichkeiten zur sonographischen Darstellung des Kükens im Ei und die dabei erzielten Ergebnisse aufgeführt.

Um die Hühnerembryonen mittels Ultraschall darstellen zu können, mussten die Hühnereier im vorliegenden Fall ungefähr einen Kilometer weit vom Anatomischen Institut zur Universitätsfrauenklinik mit dem Pkw transportiert werden. Zum Transport wurden die Hühnereier in Zellstoff eingepackt und in eine Isolierbox gelegt, die zuvor mit auf 40 °C erhitzten Wärmeakkus ausgelegt wurde. Dies sollte eine Unterkühlung der ungeschlüpften Küken vermeiden. Der Transport gelang auf diese Weise immer problemlos. In der Frauenklinik wurden die Hühnereier bis zur Punktion und auch danach bis zum Rücktransport in das Anatomische Institut im dortigen Labor im Inkubator bei 37 °C aufbewahrt bzw. mit Hilfe einer handelsüblichen Infrarotlampe warm gehalten.

3.5.1 Wahl des Ultraschallkopfes

Zu Beginn der Versuchsreihen wurden für die Ultraschalldarstellungen der Toshiba-Schallkopf PVT-661VT, mit einem Frequenzbereich von 6 MHz, der



Abb. 9: Während der Ultraschalldarstellung, Ei liegt in Paraffinhalter, zu sehen ist der Toshiba-Schallkopf aus der Neonatologie

transvaginalen Sonographie verwendet. Diese Schallköpfe haben mit 2,5 x 1,5 cm eine kleine Kopfgröße und sind somit für die Größe des Eies und die Fläche des Fensters gut geeignet. Jedoch hat der Schallkopf eine zu große Länge, so dass präzises Steuern und eine angemessene Druckverteilung auf das Ei nicht möglich waren. Die nächsten Versuche wurden mit einem deutlich kleineren Schallkopf,

Toshiba PST-65AT, mit einem Frequenzbereich von 6,5 MHz, durchgeführt (Abb.9), der normalerweise in der Kinderneonatalogie zum transkraniellen Ultraschall verwendet wird. Dieser hat einen vergleichbar kleinen Kopfdurchmesser und liegt gut in der Hand, so dass damit ein präzises Arbeiten möglich ist. Dieser Schallkopf wurde ab der zweiten Versuchsreihe ausschließlich für die Darstellungen und die Punktionen verwendet.

3.5.2 Durchführung und Ergebnisse der Ultraschalldarstellung

Die Durchführung der Ultraschalldarstellung entsprach dem herkömmlichen Umgang mit diesem Gerät. Das schlagende Herz war im Normalfall gut zu erkennen (Abb. 10), genauso wie die Wirbelsäule und der Schnabel des Kükens. Zur Verdeutlichung des schlagenden Herzens wurde am Ultraschallgerät die Duplexfunktion eingestellt (Abb. 11), mit der strömendes Blut farblich dargestellt wurde. Im vorliegenden Fall wurde auf den Schallkopf zuströmendes Blut rot, vom Schallkopf wegströmendes Blut blau unterlegt.

Nachdem das schlagende Herz des Kükens dargestellt war, konnte die Herzpunktion begonnen werden. Bei den Ultraschalldarstellungen konnte erkannt werden, ob der Embryo im Ei noch lebte.

Bereits durch leichten Druck oder Verkanten des Schallkopfes brach die Eischale im Bereich des Fenster ein, häufig bildeten sich Risse über die gesamte Eischale hinweg.

Für die vorliegende Arbeit wurden 42 ungeschlüpfte Küken im Ultraschall dargestellt, die im Ei herangereift waren. Bei der sonographischen Darstellung zeigte sich, dass zwei dieser Küken im Ei abgestorben waren, bei zwei weiteren Eiern lag keine Befruchtung vor.

3 Ergebnisse

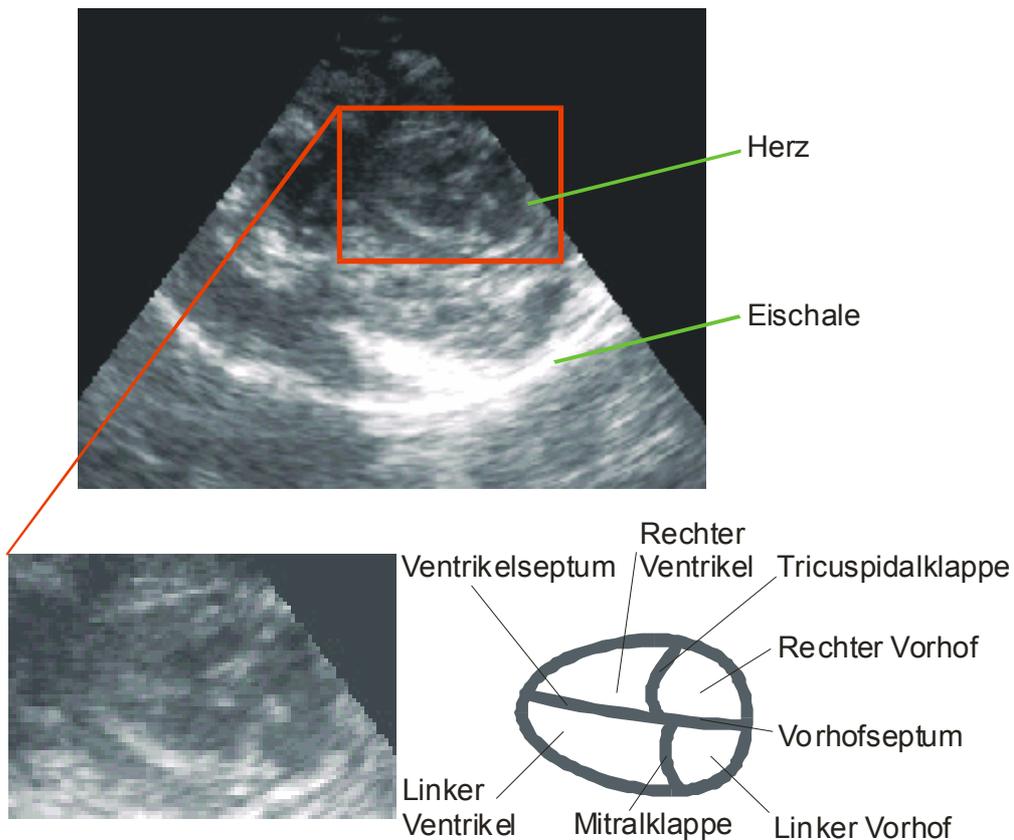


Abb. 10: Ultraschalldarstellung des embryonalen Hühnerherzens in der Übersicht und vergrößert

3.5.3 Darstellung der am Tag zwei präparierten Hühnereier

Bei den zwölf Hühnereiern, die bereits am zweiten Bebrütungstag präpariert wurden, erfolgte die sonographische Darstellung anfangs durch das Isolierband hindurch. Der mit Luft gefüllte Raum, der sich zwischen der Chorioallantois und dem Klebeband befindet, wurde mit Tyrode-Lösung aufgefüllt.

Mit dieser Methode konnte der Embryo im Ei dargestellt werden, jedoch reflektierte das Isolierband einen Teil der Schallwellen, so dass eine einwandfreie Darstellung nicht gelang. Aus diesem Grund wurden mit dieser Methode nur vier Hühnerembryonen sonographisch dargestellt.

3 Ergebnisse

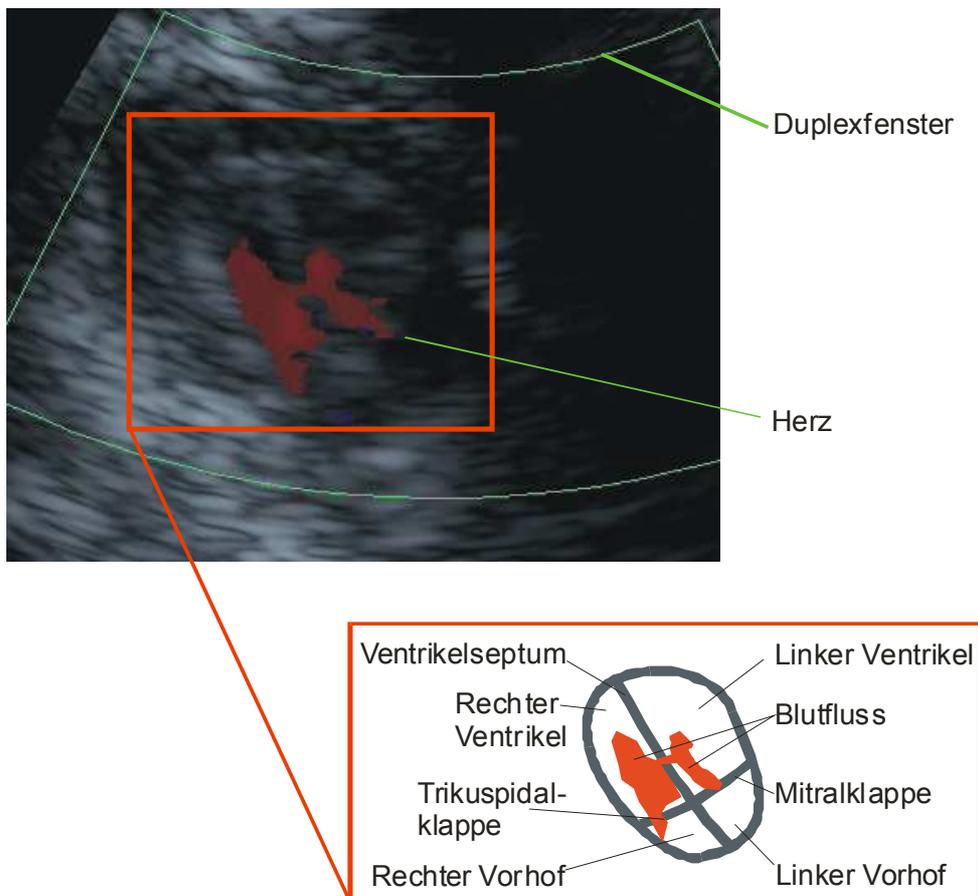


Abb. 11: Farbdopplerdarstellung des embryonalen Hühnerherzen
rot = auf den Schallkopf zu strömendes Blut,
blau = vom Schallkopf weg strömendes Blut

Bei den restlichen acht Hühnereiern, die am zweiten Inkubationstag, Stadium 19 HH, gefenstert wurden, wurde zur Ultraschalldarstellung am 18. Bebrütungstag (Stadium 44 HH), das Isolierband entfernt und das Ultraschallgel vorsichtig direkt auf die darunter liegende Chorioallantois gegeben, um den Embryo zu schallen. Mit dieser Methode wurden gute, schärfere Darstellungen erzielt.

Durch leichten Druck oder Verkanten des Schallkopfes riss die Chorioallantois mit dem darunter liegenden Gefäßplexus auf Grund mangelnder Stabilität in einigen Fällen ein, es kam zu starken, unkontrollierbaren Blutungen.

3 Ergebnisse

Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn das Fenster im Ei mit Tegadermfolie verschlossen wurde. Sie erlaubte eine besser Transparenz und war für die Ultraschalldarstellung kein Hindernis, es traten keine Reflexionen ein. Dadurch konnte die Folie zur Ultraschalldarstellung belassen werden, was bessere Stabilität sowie Sterilität im Eiinneren zur Folge hatte.

3.6 Punktion des Herzens

Im folgenden Ergebnisteil wird die Punktion des embryonalen Hühnerherzens aufgezeigt. Des Weiteren wird auf Möglichkeiten zur Markierung des Stichkanals sowie auf die sonographische Beurteilung des Überlebens direkt nach erfolgter Punktion eingegangen.

3.6.1 Vorgehen

Sobald das Herz des Hühnerembryos deutlich im Ultraschallfenster eingestellt war, konnte die Punktion durchgeführt werden. Dabei wurde unter permanenter sonographischer Sicht die Kanüle durch das Fenster im Ei (Abb. 12) in Richtung des schlagenden Herzens geführt. Sobald eine unmittelbare Nähe zum Herzen erreicht war, wurde – wie das beim menschlichen Fet auch geschehen soll – das Herz transthorakal punktiert. Diese Bewegung wurde zügig durchgeführt, denn das Küken war in der Lage auszuweichen.



Abb. 12: Punktion des embryonalen Herzens unter Ultraschalldarstellung mit dem Toshiba-Schallkopf aus der Neonatologie

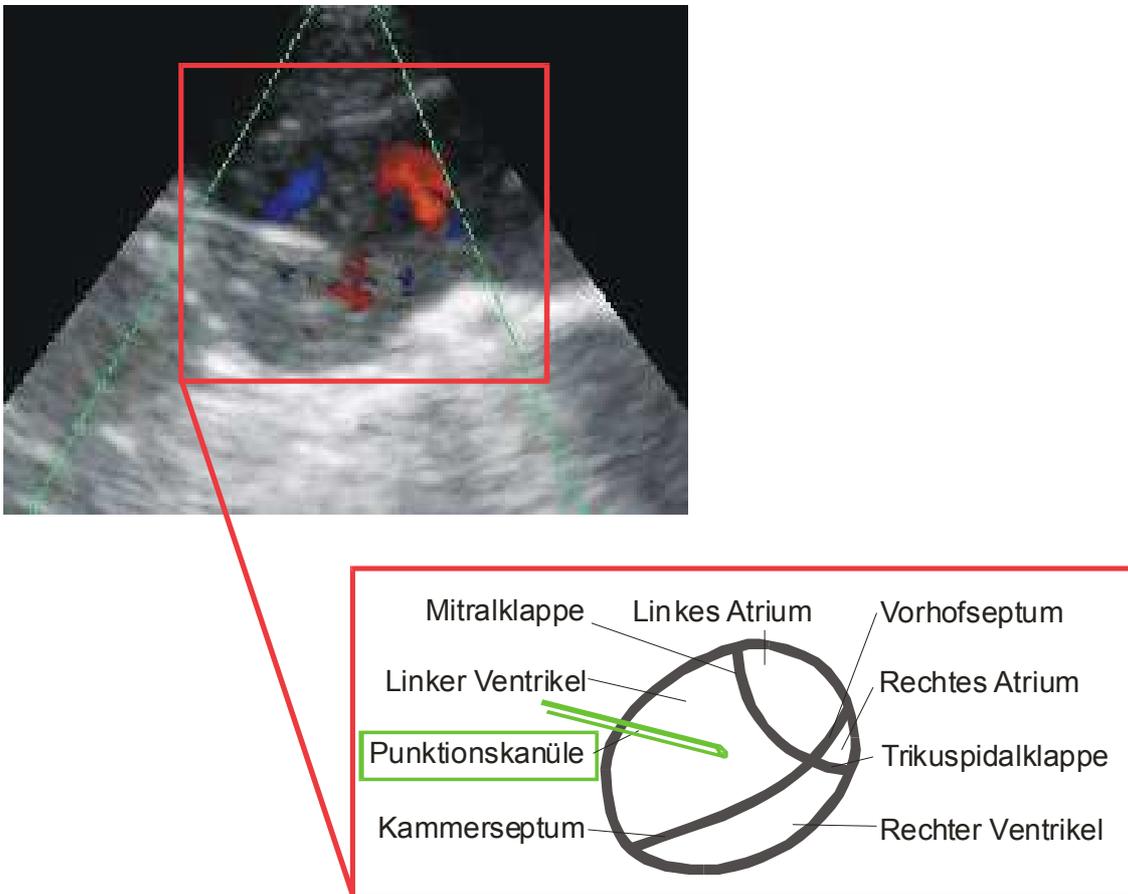


Abb. 13: Sonographisch gesteuerte Punktion des embryonalen Hühnerherzens
Farbdopplerdarstellung: rot = auf den Schallkopf zu strömendes Blut, blau = vom
Schallkopf weg strömendes Blut

Sobald sich der Sonographieur sicher war, einen der Ventrikel getroffen zu haben (Abb. 13 und Abb. 14) und keine Methoden zur Markierung des Stichkanals geplant waren, wurde die Kanüle wieder entfernt. Der Punktionsvorgang war abgeschlossen. Das Ei wurde anschließend, nachdem das Ultraschallgel grob entfernt wurde, wieder mit Isolierband verschlossen, denn die ungeschlüpften Küken sollten nach der Punktion noch einige Stunden überleben.

Die Punktion an sich stellte während der Versuche nie ein Problem dar, nach sonographischer Beurteilung glückte sie in allen 38 Fällen. Direkt nach der Intervention wurde eine kurzzeitige Tachykardie als Punktionsfolge beobachtet. In Folge der Abkühlung des Embryos außerhalb des Inkubators konnte in vielen Fällen eine Bradykardie festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 12 Hühnerembryonen ohne weitere Maßnahmen zu Sichtbarmachung des Stichkanals punktiert.

3.6.2 Markierung des Stichkanals mit Tusche oder Nilblausulfat

Um nach der Punktion bei der Präparation des Kükenherzens die Einstichstelle aufzufinden, wurde entweder Tusche oder Nilblausulfat verwendet.

Tusche besteht aus feinen Kohlenstoffpartikeln, die mit Schellackseife und Wasser versetzt werden, sie ist also aus organischen Inhaltsstoffen zusammengesetzt. Sie eignet sich gut für die Markierung im Herzen, da ihre feinen Partikel teilweise mit dem Blut weitertransportiert werden. Somit konnte bei der Präparation des Herzens im Anschluss an die Punktion dargestellt werden, dass das Herz getroffen wurde und dass ein Blutfluss während und nach der Punktion durch das Herz stattgefunden hatte, d.h. dass das Küken die Punktion primär überlebt hatte. Nilblausulfat hat die Eigenschaft, das Gewebe, mit dem es in Verbindung kam, einzufärben. Dies erleichtert bei der Herzpräparation das Auffinden der Einstichstelle am Herzen. Für die Experimente wurde willkürlich entschieden, ob Tusche oder Nilblausulfat verwendet wird.

Zur Markierung des Stichkanals wurde eine geringe, nicht definierte Menge an Tusche oder Nilblausulfat durch den Katheter gespritzt. Die Injektion konnte auf dem Ultraschallmonitor verfolgt werden.

Auf diese Weise wurden 23 Embryoherzen markiert.

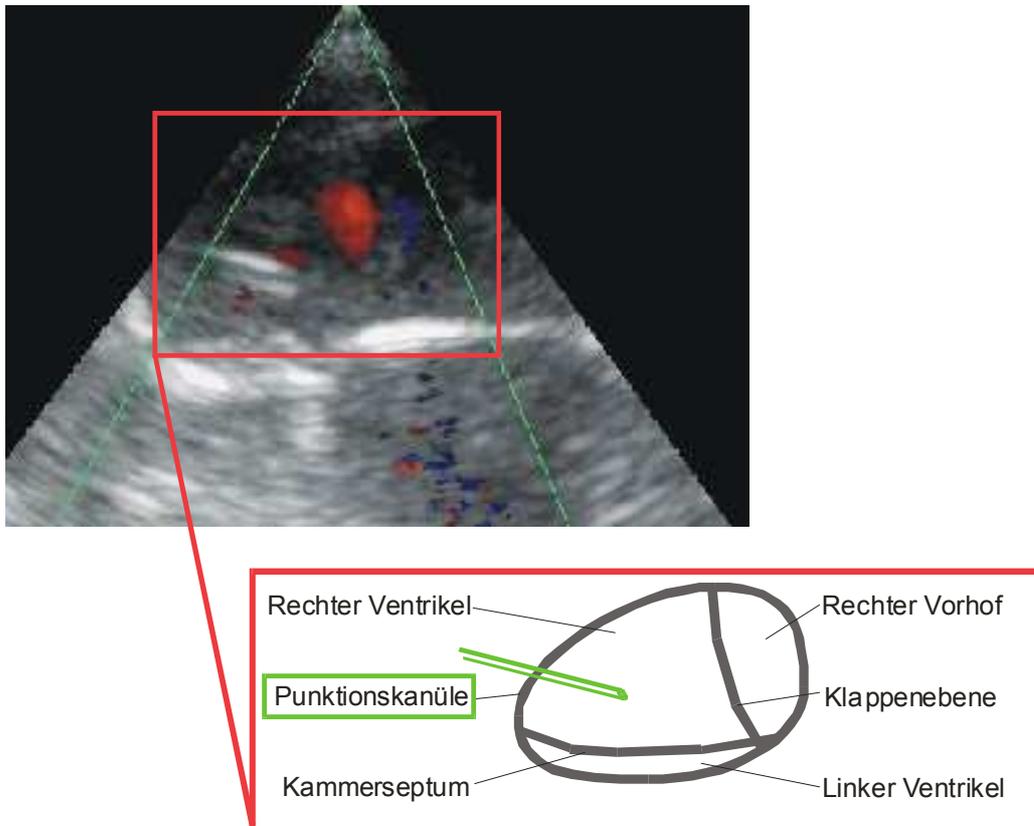


Abb. 14: Sonographisch gesteuerte Punktion des embryonalen Hühnerherzen
Farbdopplerdarstellung: rot = auf den Schallkopf zu strömendes Blut,
blau = vom Schallkopf weg strömendes Blut

3.6.3 Einsetzen eines Coils

Eine weitere Möglichkeit, die Punktionsstelle zu kennzeichnen, bietet das Setzen eines Coils mittels Katheter.

Für die vorliegende Arbeit wurde der kleinstmögliche auf dem Markt befindliche Katheter verwendet, der normalerweise in der Neuroradiologie zum Einsatz kommt. Dieser Katheter ist der einzige, der durch die 18 G-Kanüle passt. Er hat einen Außendurchmesser von 1,7 Fr. und ein Innenlumen von 0,0165 in., dies ermöglicht die Verwendung von 0,014 in. Führungsdrähten und ist daher mit Matrix™ Detachable Coils kompatibel. Es wurde der Matrix™ Detachable Coil Standard S/R in der helikalen Form verwendet.

Ein erster Versuch, in dem der komplette Coil platziert werden sollte, misslang. Der Coil stand in einem zu großen Verhältnis zum embryonalen Hühnerherzen. Für die nächsten beiden Versuche wurde nur eine Windung der Coilspirale verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in ein Herz der vollständigen Coil implantiert, zwei Hühnerembryonen wurde auf die zuletzt beschriebene Weise punktiert. Alle drei Embryonen sind schon während der Punktion verendet. Selbst die gekürzten Coils waren für das Herz des ungeschlüpften Kükens noch zu groß, so dass sie nicht korrekt im Herzen zu liegen kamen und bei der nachfolgenden Präparation nicht lokalisiert werden konnten. Durch das Kürzen der Coils und ihre daraus resultierende Form wurde das Abwerfen der Coils stark erschwert.

3.6.4 Sonographie nach der Punktion

Direkt im Anschluss an die Punktion wurde mittels Ultraschall beobachtet, ob das Herz des ungeschlüpften Kükens weiter schlägt. Nur sieben der 38 punktierten Hühnerembryonen haben die Punktion nicht überlebt.

3.7 Überleben der Embryonen nach der Punktion

31 von 38 Hühnerembryonen haben die Katheterintervention überlebt. Die überlebenden Embryonen wurden nach drei ($n = 22$) oder nach sechs Stunden ($n = 8$) geopfert um die Auswirkungen der Intervention auf das Herzgewebe zu untersuchen. Einer der punktierten Embryonen aus einem am zweiten Bebrütungstag gefenstereten Ei wurde nach der Punktion am 18. Tag nicht präpariert, ihm wurde nach 24 Stunden zum Schlüpfen verholpen. Dieses Küken hat die Punktion überlebt, es wurde für weitere sechs Monate beobachtet. Das Herz dieses Kükens wurde nicht präpariert, da das Tier nach dem Schlüpfen aus Tierschutzgründen nicht getötet wurde.

Langzeituntersuchungen zum Überleben der Hühnerembryonen nach der Punktion wurden in dieser Studie nicht durchgeführt.

Die Ursache des Absterbens der sieben Hühnerembryonen konnte in der postinterventionellen Untersuchung nicht immer ausreichend geklärt werden. In diesen Fällen sind Verletzungen der Chorioallantois, Hypothermie oder Bradykardie als Todesursache zu nennen. Es konnten aber auch unterschiedliche Überlebensraten abhängig von der Jahreszeit festgestellt werden.

3.8 Nachuntersuchung des punktierten Herzens

Um die Folgen der kardialen Punktion untersuchen zu können, wurde nach dem Absterben des Hühnerembryos das Herz aus dem Thorax herausgelöst und anschließend am Stereomikroskop wie auch histologisch untersucht.

3.8.1 Präparation des Herzens

Zur Präparation des Herzens wurde das Küken aus dem Ei genommen und auf einer Korkplatte fixiert. Mit einer feinen Schere wurde der Thorax längs eröffnet, so dass das Herz deutlich zwischen den beiden Lungenflügeln erkannt wurde (Abb. 15). Das Herz wurde von den Hauptstämmen gelöst und aus dem Thorax isoliert.

Bei der Präparation wurde bei drei der 38 Herzen, durch nicht vollständiges Lösen des Herzens von den Gefäßen, der dorsale Teil von Vorhöfen und Ventrikeln aufgerissen. Damit konnte bei der Nachuntersuchung dieser Herzen kein gesichertes Ergebnis gefunden werden.

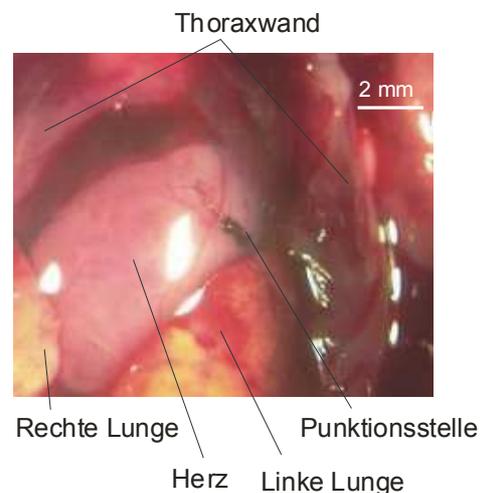


Abb. 15: Herz in situ, Einstichstelle sichtbar

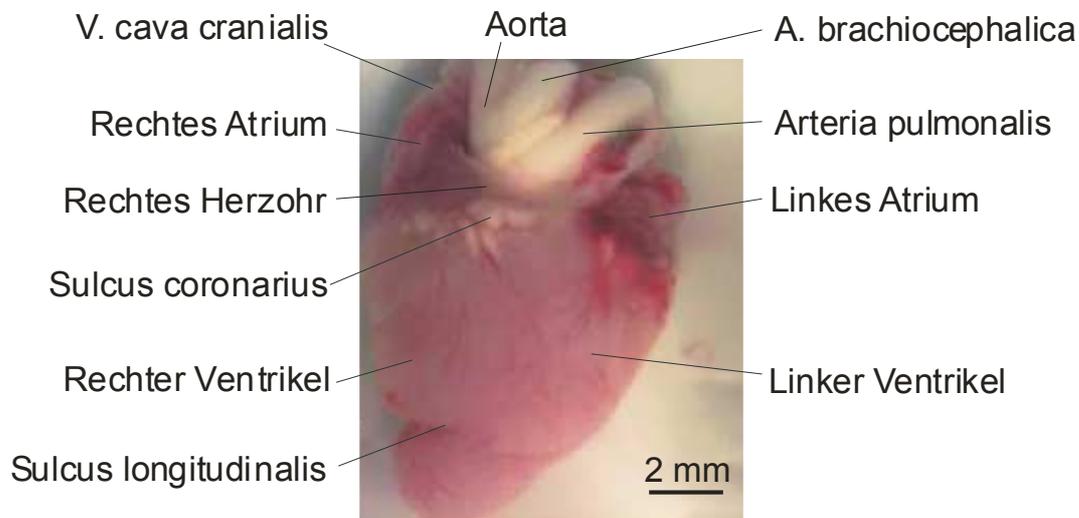


Abb. 16: Isoliertes Herz unter dem Stereomikroskop betrachtet

3.8.2 Nachuntersuchung am Stereomikroskop

Bei der folgenden Untersuchung der 35 verbliebenen Herzen am Stereomikroskop (Abb. 16) mit Videodokumentation wurde zu erst die Herzaußenseite nach den Punktionsstellen abgesucht. Dabei wurde bei sechs Herzen die Einstichstelle an Hand der Farbmarkierung aufgefunden, in sechs Fällen wurde zu viel Tusche bzw. Nilblausulfat injiziert, so dass keine Aussage über den Stichkanal gemacht werden konnte. Zwölf Herzen wiesen äußerlich keine erkennbaren Veränderungen auf. Bei sieben wurde eine Herzbeutelamponade erkannt, drei Herzen wurden mit einem Coil versorgt. Ein Küken wurde nach 24 Stunden aus dem Ei geholt, das Herz wurde aus Tierschutzgründen nicht untersucht.

Anschließend wurden die Vorhöfe und Kammern eröffnet. Die coronare Schnittführung gab einen guten Überblick in die Atrien und Ventrikel. Der erste Schnitt wurde an der Herzbasis gesetzt um die Klappenebene beurteilen zu können. In dieser Region wurden keine Auffälligkeiten gefunden.

Auf Grund der Tusche- oder Nilblausulfat-Färbung konnte festgestellt werden, ob und in welchem Teil des Herzens sich dieses Gemisch befindet (Abb. 17).

3 Ergebnisse

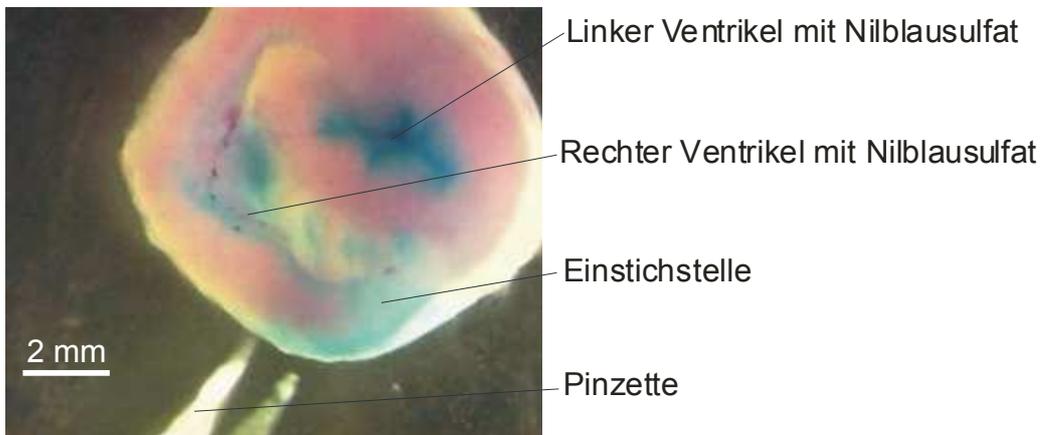


Abb. 17: Herz im Querschnitt, Nilblausulfat in beiden Ventrikeln, Nilblausulfat als Stichkanalmarkierung im Myokard des rechten Ventrikels sichtbar

Daraus ließen sich Rückschlüsse auf den Erfolg der Punktion, den Punktionsort sowie, an Hand der Verteilung der Tusche, über die Herzaktion ziehen.

Wurde mittels Längsschnitten die Atrien und Ventrikel eröffnet, so konnten die Vorhöfe und Kammern genauso untersucht werden. Aus Übersichtsgründen wurde aber für diese Arbeit die coronare Schnittführung bevorzugt.

Nachdem die Vorhöfe und Ventrikel dargestellt waren, wurde der Bereich der Punktionsstelle präpariert (Abb. 18). Diese Stellen fielen durch erhöhte Konzentrationen an Tusche oder Nilblausulfat auf, in manchen Fällen konnten Spuren von Blut in der Myokardwand gefunden werden. Es konnte jedoch kein transmuraler Myokarddefekt ausgemacht werden. In den 12 Fällen, in denen weder Tusche noch Nilblausulfat injiziert wurde, konnte trotz positiver Ultraschallkontrolle kein kompletter transmuraler Stichkanal gefunden werden. Das Myokard hatte sich nach der Intervention ohne sichtbare Gewebsschädigung wieder verschlossen. Der einzige Anhalt auf eine erfolgreiche Punktion war eine geringe, punktförmige Blutung, die den Stichkanal markierte.

3 Ergebnisse

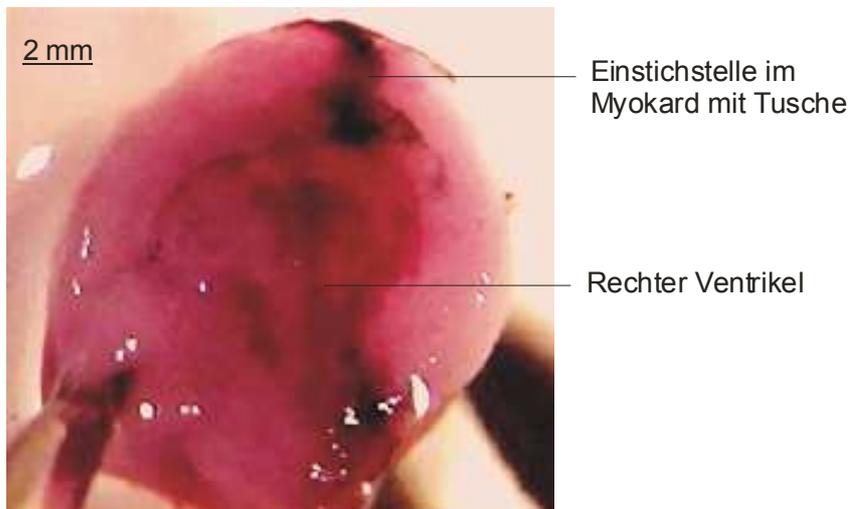


Abb. 18: Herz im Querschnitt, Einstichstelle im rechten Ventrikel sichtbar, Tusche im rechten Ventrikel

In fünf Fällen fanden sich keine Spuren von Tusche oder Nilblausulfat im Myokard, im Herzinieren war aber je nach Injektion Färbemittel als Beweis für eine geglückte Punktion nachzuweisen.

In vier Fällen ist die Punktion ins Herz trotz positiver sonographischer Kontrolle nicht geglückt. In diesen Fällen wurde bei der Punktion Tusche oder Nilblausulfat injiziert, welches aber im Herzen nicht nachzuweisen war.

In drei Fällen kann keine Aussage über die Punktion gemacht werden, da bei der Punktion weder Tusche noch Nilblausulfat verwendet wurde.

Bei fünf Herzen wurde ein Hämoperikard gefunden. Dies wird als erfolgreiche Punktion gesehen. Das Hämoperikard tritt als Komplikation des Eingriffes auf. Weitere Auffälligkeiten am Myokard oder im Herzinieren wurden nicht entdeckt. Auf Grund der Technik zur Markierung der Punktionsstelle mit Tusche oder Nilblausulfat war es nicht möglich, in jedem Fall das gleiche Volumen an Farbstoff zu injizieren. Bei der Nachuntersuchung stellte sich heraus, dass das Myokard von vier Herzen durch eine zu große Menge an Tusche bzw. Nilblausulfat überfärbt war. Die Herzen konnte nicht beurteilt werden, es war jedoch gesichert, dass bei der Punktion das Herz getroffen wurde.

3 Ergebnisse

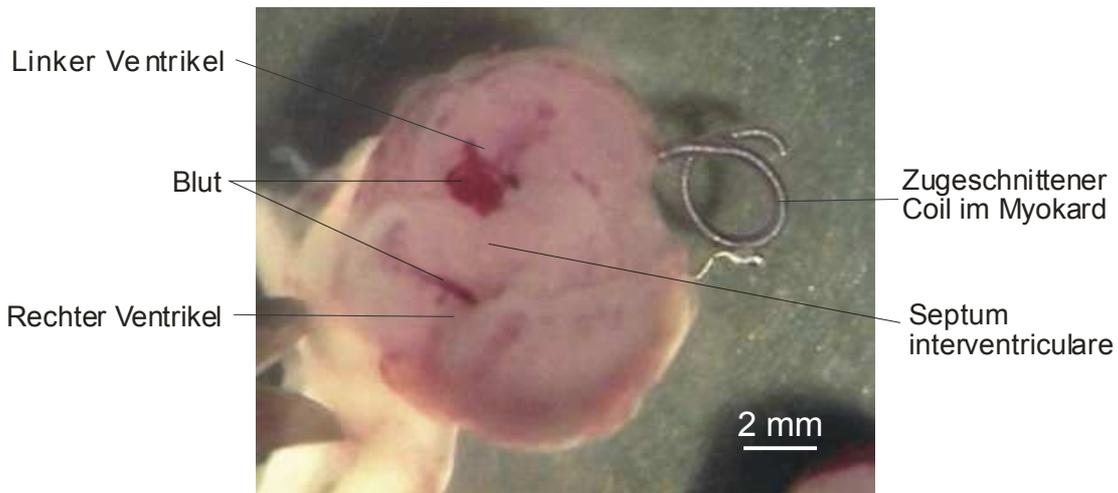


Abb. 19: Herz im coronaren Schnitt, Coil der sich in der äußeren Herzwand befindet

In acht Fällen konnte makroskopisch vor der Herzpräparation die Einstichstelle auf Grund der Tusche- bzw. Nilblausulfat-Färbung oder auf Grund von kleinen, punktförmigen myokardialen gefunden werden. Diese Herzen wurden auf die oben beschriebenen Weisen präpariert wobei besonders Wert auf das Gebiet um den Stichkanal gelegt wurde. Es wurden aber keinerlei Auffälligkeiten am Myokard oder in den Ventrikeln gefunden.

Die drei Herzen, bei denen die Katheterpunktion durchgeführt wurde, wurden ebenfalls präpariert. Das Herz, bei dem der ungekürzte Coil verwendet wurde, wies einen zerstörten Ventrikel auf, der Coil wurde in Herznähe gefunden. Die beiden Herzen, die mit dem gekürzten Coil markiert wurden, wiesen beide ebenfalls beschädigte Ventrikel auf. Bei einem dieser Herzen hatte sich der Coil in der äußeren Herzwand verhakt (Abb. 19), beim anderen Herzen wurde er nicht wieder gefunden. Zwei Herzen wurden nicht eröffnet, sie wurden zur histologischen Untersuchung in Paraffin gebettet. Das Herz des überlebenden Kükens wurde nicht untersucht.

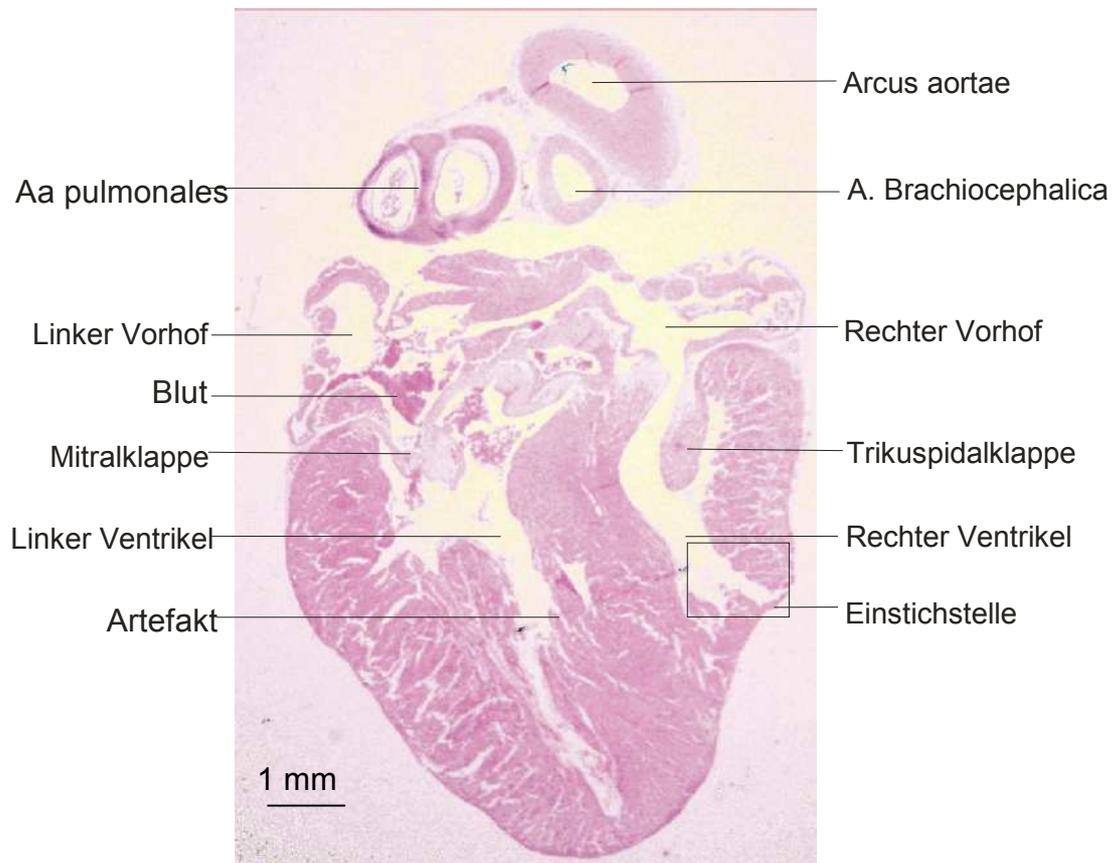


Abb. 20: Längsschnitt durch das Herz eines Embryos 6 Stunden nach Punktion (ohne Stichkanalmarkierung), die Einstichstelle ist als fibrinüberzogene Diskontinuität im Myokard zu sehen (Kasten)

3.8.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Zwei Hühnerembryonen wurden sechs Stunden nach der Intervention (ohne Stichkanalmarkierung) geopfert, die Herzen wurden zur histologischen Untersuchung in Paraffin gebettet. Es wurden 5 µm dicke Längsschnitte angefertigt, das Herzgewebe wurde mit Hämalaun-Eosin (HE) gefärbt.

Es zeigte sich eine fibrinüberzogene transmurale Unterbrechung der Kontinuität des Myokards im Bereich der Punktionsstelle im rechten Ventrikel (Abb. 20). Weitere histologische Veränderungen wurden nicht gefunden, es fand noch keine Narbenbildung statt.

Auf Grund des Kathetergröße trat bei der Punktion eine 0,7 mm breite Myokardschädigung auf. Die histologische Untersuchung zeigte, dass das Myokard sich sechs Stunden nach der Punktion bis auf ca. 250 µm wieder verschlossen hatte. Jedoch können auch Fixation und die Einbettung in Paraffin den bestehenden Injektionskanal künstlich geweitet haben.

3.9 Bewertung der sonographischen Treffsicherheit

Es wird festgesetzt, dass das Herz als getroffen gilt, wenn die Punktion sonographisch gesichert ist und sich Tusche bzw. Nilblausulfat im Herzen finden lässt bzw. wenn ein Hämoperikard vorliegt.

Die Präparation der Herzen ergab, dass in 26 der 38 Fälle das Herz getroffen wurde. In drei Fällen traten Präparationsfehler auf, vier Punktionen verfehlten das Herz, drei Herzen konnten nicht ausgewertet werden, da keine Markierung des Stichkanals durchgeführt wurde,

in einem Fall wurde der Coil nicht wieder gefunden. Ein Embryo wurde, 24 Stunden nach sonographisch erfolgreicher Intervention, am 19. Bebrütungstag vorsichtig aus dem Ei geholt. Das Herz dieses Embryos wurde nicht nachuntersucht. Zwei Herzen wurden zur histologischen Untersuchung in Paraffin gebettet, bei beiden Fällen konnte der Stichkanal nachgewiesen werden
Tabelle 4 zeigt diese Ergebnisse nochmals auf.

Anzahl Punktionen	38
Erfolgreiche Punktion	26
davon:	
Tusche oder Nilblausulfat im Herz ohne Einstichstelle	5
Hämoperikard	6
zu viel Tusche/Nilblausulfat	4
Einstichstelle äußerlich sichtbar	8
Coil im/am Herzen	2
Histologie	2
Überleben	1
Präparationsfehler	3
Nicht-erfolgreiche Punktion	4
Keine Bewertung möglich	3
Verlust des Coils	1

Tab. 4: Bewertung der Treffsicherheit

4 Diskussion

Die Ergebnisse der Entwicklung und Optimierung des Versuchstiermodells sowie die dabei aufgetretenen Limitationen werden diskutiert, dazu werden die einzelnen Unterpunkte aus dem Ergebniskapitel jeweils separat aufgegriffen und erläutert. Dies sind im Einzelnen die intrauterine, ultraschallgesteuerte Punktion, das Huhn als Modell sowie die Diskussion des geeigneten Vorgehens. Am Ende dieses Kapitels wird eine Schlussfolgerung aus der Arbeit gezogen sowie ein kurzer Ausblick gegeben.

4.1 Intrauterine, ultraschallgesteuerte Punktionen in der Humanmedizin

Die bisher durchgeführten intrauterinen kardialen Punktionen bei kongenitalen Pulmonal- oder Aortenstenosen bzw. –atresien sowie dem daraus resultierenden hypoplastischen Linksherzsyndrom waren der Einstieg in eine neue Behandlungsoption. In Anbetracht der geringen Anzahl an durchgeführten Versuchen in der Humanmedizin und den dabei aufgetretenen Problemen ist der Bedarf nach einem adäquaten, einfach zu handhabenden Tiermodell offensichtlich.

Ohne postnatale Operationen verschlimmern sich die Herzfehlbildungen und rufen schwerwiegende Sekundärschädigungen hervor. Die Langzeitüberlebenschancen betroffener Kinder sind sehr gering. Spontanheilungen wurden bisher nicht beschrieben.

11 – 45 % der Feten mit strukturellen Herzfehlern werden abgetrieben. Von den verbleibenden Kindern versterben 8 – 26 % in utero sowie 43 – 53 % direkt nach der Geburt (palliative Versorgung), während Herzoperationen oder im Neugeborenenalter. Langzeitüberleben kann bei 21 – 45 % aller betroffener, nicht abgetriebener Kinder festgestellt werden (Galindo et al, 2006; Golombeck et al, 2006; Kohl et al, 2000; Fesslova et al, 1999). Im speziellen Fall des hypoplastischen Linksherzsyndroms werden 44 – 55 % der betroffenen Feten

abgetrieben, während 75 – 94 % der verbleibenden Feten in utero oder postpartal versterben. Nur 6 – 25 % überleben für lange Zeit (Lary et al, 2001; Lopes et al, 1996).

Eine große Anzahl der abgetriebenen Feten oder Kinder, die in utero, postpartal oder während des chirurgischen Eingriffs versterben, könnten von einer therapeutischen intrauterinen Intervention profitieren. In Anbetracht der schlechten Überlebenschancen der Kinder mit hypoplastischem Linksherzsyndrom stellt sogar eine Therapie, mit dem Risiko den fetalen Patienten zu töten, eine akzeptable Option dar. Bisher durchgeführte intrauterine Herzinterventionen wurden durch technische Probleme, wie die Unüberwindbarkeit der zu dilatierenden Herzklappe oder Dilatation des Ballons im Ausflusstrakt distal des gewünschten Gebiets limitiert. Daneben bestanden Risiken wie persistierende Bradykardien beim Fetus oder Verletzungen, die zu Notsectiones führten. Dennoch verbessert die pränatale Herzintervention die Überlebenschancen und reduziert postpartale Komplikationen. Eine einzige Intervention führt nicht unbedingt zur Heilung des betroffenen Kindes, verbessert aber den fetalen Blutfluss durch das Herz und die Herzentwicklung und erhöht damit die Chancen auf eine erfolgreiche postpartale Behandlung.

Wird vor der Anwendung in der Humanmedizin an einem passenden Tiermodell (z.B. Hühnerembryo) trainiert, so können technische Komplikationen weitestgehend minimiert werden. Nebeneffekte der Punktion auf den Embryo können im Tiermodell untersucht und mögliche Therapieoptionen entwickelt werden.

Wenn man sich zur pränatalen Herzpunktion entscheidet, müssen auch die maternalen Risiken in Betracht gezogen werden. Bisher wurde von keinen maternalen Komplikationen nach der intrauterinen Herzintervention berichtet. Mütterliche Komplikationen nach anderen pränatalen Interventionen (z.B. Amniozentese, Chordozentese) oder intrauterinen fetalen Operationen (z.B. Meningomyelozele, saccrooccygeales Teratom, Lungenfehlbildung oder fetofetales Transfusionssyndrom) sind vergleichsweise niedrig. Eine kürzlich

veröffentlichte Studie berichtet über 0 % maternaler Mortalität in einem Kollektiv von 187 Frauen, die sich maternal-fetalen Operationen (offene Hysterotomie, fetoskopische Eingriffe und perkutane Techniken) unterzogen. Maternale Komplikationen waren in 22 % Lungenödeme, in 13 % postinterventionelle Behandlung auf der Intensivstation und Bluttransfusionen in 7 %. In der postinterventionellen Fortsetzung der Schwangerschaft trat bei 27 % frühzeitige Wehentätigkeit auf, die zur Entbindung führte, in 44 % ein frühzeitiger Blasensprung, in 5 % eine Chorioamnionitis, 7 % vaginale Blutungen und in 6 % eine Plazentalösung. Für die intrauterine Herzintervention kann mit ähnlichen Komplikationsraten gerechnet werden.

4.2 Das Huhn als Modell

Wie bereits aufgezeigt, bietet das Huhn als Versuchstiermodell einige Vor- aber auch Nachteile. Diese werden in diesem Unterkapitel nochmals kurz zusammengefasst.

Im Vergleich zu anderen möglichen Tiermodellen (z.B. Schaf, Schwein, Ratte) ist der Hühnerembryo ein leicht zu handhabendes Tiermodell. Die Anatomie des Hühnerherzens ist – wie in Kapitel 1.5.1 dargestellt – in vielen Punkten der des menschlichen Herzens sehr ähnlich. Die bestehenden Abweichungen am Ein- und Ausflusstrakt, dem Foramen ovale oder der rechten AV-Klappe stellen keinerlei Nachteile für die sonographische Darstellung wie auch für die Punktion dar.

Ein großer Vorteil ist die unbegrenzte Verfügbarkeit sowie einfache Darstellung und Wachstumskontrollen der sich entwickelnden Hühnerembryonen. Wie bereits aufgeführt, sind Versuche mit den ungeschlüpften Küken im Ei ethisch bedenkenlos und gelten nicht als Tierversuche. Es muss kein Muttertier geopfert werden. Die geringe Größe des Hühnerembryos war in Bezug auf die sonographische Darstellung des Herzens und die Punktion von Nachteil, für die stereomikroskopische und histologische Nachuntersuchung von Vorteil.

Der Nachteil des Tiermodells besteht im Verhältnis von Katheter und Hühnerherz. Dies macht die Intervention im Hühnchen selbst mit kleinst möglichem Katheter schwieriger als beim menschlichen Feten. Der geringe Abstand zwischen Fenster und der embryonalen Thoraxwand bedarf einer exakten Positionierung und Einstellung des Katheters. Erfahrene Pränataldiagnostiker (PD Dr. med. M. Meyer-Wittkopf) sind der Meinung, dass selbst das Manövrieren des Katheters im Hühnerembryo schwieriger ist. Wiederholtes Training führte zur besseren Positionierung des Katheters und zum geübteren Umgang damit. Daher könnten Pränataldiagnostiker von den erlernten Fähigkeiten am Tiermodell in ihrer täglichen Arbeit profitieren.

Ein weiterer Nachteil des Modells wird durch die unterschiedlichen Punktionszeiträume beim menschlichen Feten und beim Hühnerembryo hervorgerufen. Die bisher beschriebenen intrauterinen Herzinterventionen in der Humanmedizin wurden zwischen der 20. und 33. Schwangerschaftswoche durchgeführt. Strukturelle Herzfehler können nicht vor der 13. Schwangerschaftswoche diagnostiziert und nicht vor der 18. Schwangerschaftswoche therapiert werden. Nach der 33. Schwangerschaftswoche können irreversible Herzscheidungen auf Grund struktureller Herzfehler und dem pathologischen Blutfluss erwartet werden. Daher ist die Herzintervention beim Menschen zwischen der 18 und 33. Schwangerschaftswoche denkbar. Auf Grund fehlender Mikroinstrumente, die für eine Intervention am Hühnerembryo in vergleichbaren Stadien nötig wären, wurde die Punktion nach 18 Tagen Bebrütung durchgeführt. Dies entspricht der 36. Schwangerschaftswoche beim menschlichen Feten. Falls feinere Instrumente auf den Markt kommen, ist eine Intervention im Hühnerembryo nach 10 – 16 Tagen Bebrütung (entsprechend der 20. – 32. Schwangerschaftswoche beim Menschen) denkbar.

Im Modell „Hühnerembryo“ kann die funktionelle Behebung des strukturellen Herzfehlers nicht simuliert werden, außer wenn eine künstliche Schädigung vor der eigentlichen Katheterintervention gesetzt wird. Dies wäre nach der Fensterung am zweiten Tag leicht möglich.

Das Modell kann helfen, die Katheterführung unter Ultraschallkontrolle zu trainieren und die myokardialen Schädigungen nach der Intervention zu untersuchen. Das Tiermodell kann ein hilfreiches Modell für Pränataldiagnostiker sein, um sich für die menschliche Anwendung vorzubereiten.

4.3 Experimentalablauf

Im Folgenden werden einzelne Unterkapitel des Ergebnisteils aufgegriffen und diskutiert. Es werden Vor- und Nachteile einzelner Methoden erörtert sowie Probleme und Beobachtungen aufgezeigt. Teilweise wird die zu bevorzugende Methode für weitere Versuche dargestellt.

4.3.1 Eischalenpräparation

Die verschiedenen Techniken zur Präparation der Eischale wurden im Kapitel 3.3 ausführlich dargestellt. Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden aufgeführt.

Eischalenpräparation am Tag der Punktion

Der größte Vorteil dieser Präparationsmethode ist das Bestehenbleiben der natürlichen Barrierefunktion der Schale bis zum Punktionstag, so dass sich das Küken ohne äußere Störeinflüsse in seinem Ei entwickeln kann. Eine Infektion des Eies kommt somit weit aus seltener vor. Die Schale schützt den Hühnerembryo auch besser vor leichten Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen.

Der Nachteil dieser Technik ist, dass zur sonographischen Darstellung die Schalenhaut entfernt werden muss. Dabei reißt der empfindliche Gefäßplexus der Chorioallantois ein und der Embryo verblutet. Damit ist ein möglichst langes Überleben nach der Punktion nicht gewährleistet.

Eischalenpräparation nach 48 h Bebrütung mit und ohne Folie

Bei der Präparation nach 48 h Bebrütung kann die Schalenhaut ohne Folgen entfernt werden, da die Chorioallantois der Schalenhaut noch nicht direkt anliegt. Die Chorioallantois entwickelt sich trotz des Fensters in der Schale und der Schalenhaut normal und befindet sich am Tag der Punktion als erste Schicht im Fenster.

Durch die Präparation der Eischale nach dieser kurzen Bebrütungszeit ist die biologische Oberfläche schon in einem frühen Stadium zerstört. Der Keimling ist somit Erregern aus der Umwelt viel stärker ausgesetzt, dadurch besteht die Gefahr des frühzeitigen Absterbens. Der Embryo ist auch empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen. Die Folie des TegadermTM-Pflasters ist im Gegensatz zum Isolierband steril, dadurch wird die Infektionsgefahr gemindert.

Da die sonographische Darstellung durch das Isolierband nicht möglich war, wurde dieses entfernt und die Sonographie direkt über die Chorioallantois durchgeführt. Diese und der darin enthaltene Gefäßplexus wurden häufig durch den Schallkopf bzw. den ausgeübten Druck verletzt. Die Ultraschalldarstellung war durch die TegadermTM-Folie nur in geringem Maß behindert, das sich entwickelnde Küken konnte mit geringem Schärfeverlust dargestellt werden. Da die Folie nicht entfernt wurde, bestand mehr Sterilität im Eiinneren und auch die Gefahr der Chorioallantoisverletzung war auf Grund höherer Stabilität geringer.

4.3.2 Ultraschalldarstellung

Das sonographische Darstellen des ungeschlüpften Kükens im Ei stellte, nach erfolgreicher Schalenpräparation, in keinem der durchgeführten Fälle ein Problem dar, sofern eine normale Embryonalität und Vitalität vorhanden war. Die Organstrukturen und vor allem das schlagende Herz waren sehr gut zu erkennen.

Schwierigkeiten bereitete der Umgang mit dem Ei. Bei der Sonographie wurde mit dem Schallkopf Druck auf den zu untersuchenden Bereich gebracht, damit

möglichst wenig Schallwiderstand zwischen dem Ultraschallkopf und dem Objekt war und somit das sonographische Bild schärfer wurde. Das Ei reagierte sehr empfindlich, so dass schon wenig Druck oder ein leichtes Verkanten des Schallkopfes im Schalenfenster ausreichte, um Risse in der Eischale entstehen zu lassen und Schalenhaut sowie die Chorioallantois mit ihrem Gefäßnetz zu zerstören. Bei vorsichtigerem Vorgehen hatte das dargestellte Bild nicht der optimalen Schärfe. Bei der Durchführung weiterer Experimente an Hühnerembryonen muss also ein Mittelweg gefunden werden, zwischen optimalem Ultraschallbild und Erhaltung der Eischale. Wird jedoch ein anderes Versuchstier eingesetzt, ist dieses Problem wahrscheinlich nicht mehr relevant. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, in wie fern das auf die Schalenhaut bzw. Chorioallantois aufgetragene Ultraschallgel dem ungeschlüpften Küken schadet. Das Ei wurde nach der sonographischen Darstellung grob vom Gel gereinigt, doch zum Schutz der Chorioallantois konnte nicht alles aufgetragene Gel entfernt werden. Über den Gefäßplexus der Chorioallantois können Inhaltstoffe des Gels in den Kreislauf des Hühnerembryos gelangen und diesen schädigen.

4.3.3 Punktion

Die kardiale, ultraschallgesteuerte Punktion konnte bei allen vitalen Embryonen in allen Versuchen durchgeführt werden. Das Herz des ungeschlüpften Kükens sowie die Punktionsnadel waren sonographisch zu erkennen, so dass jeder Schritt der Punktion im Ultraschall darstellbar war und verfolgt werden konnte. Der Hühnerembryo ist geeignet, um die intrauterine Punktion zu simulieren und anschließend den Stichkanal zu untersuchen. Die Größe der Punktionskanüle steht in einem größeren Verhältnis zum Hühnerherz als zum menschlichen, dennoch hat die Mehrzahl der Hühnerembryonen die Punktion primär überlebt, so dass auch der menschliche Fet oder andere Versuchstiere, bei denen das Verhältnis der Kanüle zum Herzen geringer ist, die Punktion ebenso überleben können. Während der Punktion trat in vielen Fällen eine Tachykardie auf, die

anschließend zu einer Bradykardie wurde. Dies ist, wie bereits dargestellt, ein Problem, das bei menschlichen Feten den Tod nach sich gezogen hatte. Da dies eine bekannte Komplikation ist, sollte in weiteren Versuchstierreihen nach einer geeigneten Therapie dieser Herzrhythmusstörung, speziell im Embryo, geforscht werden. Als Komplikation der Punktion trat in einigen Fällen ein Hämoperikard auf, dies muss auch als Risiko bei der intrauterinen fetalen Punktion genannt werden, dafür bestehen keine möglichen Therapieoptionen.

Markierung des Stichkanals mit Tusche oder Nilblausulfat

Die Injektion von Tusche oder Nilblausulfat eignet sich, um den Stichkanal zu markieren und um die Punktionsstelle bei der Präparation am Stereomikroskop wieder aufzufinden. Diese Methode sollte bei der Durchführung weiterer Versuche beibehalten werden. Zukünftig wäre es hilfreich, eine definierte Menge des Gemisches zu injizieren, um eine Überfärbung des Myokards zu vermeiden.

Einsetzen eines Coils

Ursprünglich war geplant, bei der Katheterintervention mittels eines Ballons das Sprengen einer Herzklappe zu simulieren, auf dieselbe Art wie das beim menschlichen Feten durchgeführt wurde. Dabei sollte auch das Verhalten des Ballonkatheters im Herzen untersucht werden.

Es stellt sich als große Schwierigkeit heraus, einen geeigneten Katheter für das vorliegende Modell zu finden. Es ist derzeit noch kein Ballonkatheter auf dem Markt, der klein genug ist, um durch die 1,3 x 88 mm (22 G) große Punktionskanüle zu passen. Eine Punktionskanüle mit einem größeren Lumen wäre zu groß für das Herz des ungeschlüpften Kükens geworden. Es ist jedoch zukünftig mit einer Miniaturisierung der Technik zu rechnen, so dass weitere Punktionsserien mit einem Prototypen denkbar wären.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher auf einen Coilkatheter zurückgegriffen, der normalerweise in der Neuroradiologie zum Einsatz kommt. Dieser Katheter

passte als einziger durch die genannte Punktionskanüle. Für die Intervention am Hühnerembryo mit diesem speziellen Katheter war der kleinste Coil noch zu groß. Für das Modell Hühnerembryo sollten Ballonkatheter verwendet werden, bei dem die Größe des Ballons durch die Injektion von definierten Mengen an Luft teilweise selbst bestimmt werden kann.

Wird ein Tier eingesetzt, dessen Größe der des menschlichen Feten entspricht, können mit den Katheterherstellern Verhandlungen über die Produktion eines kleinen Ballonkatheters aufgenommen werden, da sich in diesem Fall mehr Einsatzmöglichkeiten bieten und sich eine Verwendung in der Humanmedizin abzeichnet.

4.3.4 Nachuntersuchung des punktierten Herzens

Bei der Nachuntersuchung des punktierten Herzens wurde herausgefunden, dass sich das Myokard in den ersten Stunden nach der Punktion wieder weitestgehend verschließt. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für die Katheterintervention in der Humanmedizin.

In weiteren Versuchsreihen soll nun untersucht werden, wie diese Erkenntnis auf andere Tierarten und auch auf das fetale Herz übertragen werden kann.

Langfristige Auswirkungen der Punktion auf den Herzmuskel wurden in dieser Studie nicht untersucht. Es wäre angebracht, die langfristigen Folgen der Punktion am Tiermodell zu untersuchen, bevor Punktionen am menschlichen Feten durchgeführt werden.

4.4 Fazit

Neben dem Schaf ist auch das Huhn geeignet, als eines der ersten Modelle für derartige Eingriffe zu fungieren.

Hier wurde gezeigt, dass die sonographische Darstellung des ungeschlüpften Kükens im Ei gut gelingt. Auch die kardiale Punktion konnte erfolgreich im Hühnermodell umgesetzt werden. Es traten keine technischen Schwierigkeiten

auf. Der gesamte Punktionsvorgang wurde sonographisch verfolgt. Die Grundfragen zur Treffsicherheit und zur Beschädigung des Myokards durch die Punktion konnten geklärt werden. Es zeigte sich, dass die Punktion in 26 von 38 Fällen erfolgreich durchgeführt wurde, dies entspricht einer Erfolgsrate von 68 %. In den Nachuntersuchungen am Stereomikroskop zeigte sich, dass sich der Herzmuskel nach erfolgreicher Punktion weitestgehend verschließt. Die histologische Aufarbeitung bestätigte dieses Ergebnis.

4.5 Ausblick

Die intrauterine, ultraschallgesteuerte Herzpunktion zur Dilatation stenosierter und atretischer Klappen ist eine Behandlungsoption, die in der Zukunft der pränatalen Behandlung ihre Bedeutung unter Beweis stellen muss. Bevor diese Methode vermehrt in der humanen Situation angewendet werden kann, ist jedoch noch Grundlagenforschung und Training am Tiermodell zu betreiben. Auf Grund ethischer Grundsätze muss vor Beginn der Behandlung des Menschen Forschung an weiteren Versuchstieren betrieben werden.

Als alternative Versuchstiermodelle könnten schwangere Kaninchen in Frage kommen. Mäuse sind nach Ansicht der Verfasserin, insbesondere wegen der ebenfalls geringen Herzgröße, zu klein. Die Anzucht und die Vermehrung stellen kein Problem dar. Die Kosten sind relativ gering. Diese Gründe erlauben die Durchführung einer größeren Zahl an Experimenten. Ethische Fragen müssen zuvor geklärt werden. Die sonographische Darstellung sowie die Punktion können intrauterin vorgenommen werden.

Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, ist auch das Schaf ein geeignetes Modell. Bis auf die Anzucht treffen die oben genannten Vorteile auch auf diese Tiermodell zu, des weiteren haben Schafembryonen eine vergleichbare Größe zu menschlichen Feten und eine ähnliche Herzanatomie, so dass die Punktion unter guten Grundvoraussetzungen durchgeführt werden kann. Die erzielten Ergebnisse wären somit gut auf den Menschen übertragbar.

5 Zusammenfassung

Für Kinder mit einer pränatal diagnostizierten Aorten- oder Pulmonalklappenstenose oder einem hypoplastischen Linksherzsyndrom kommt die derzeit durchgeführte postnatale Behandlung häufig zu spät. Die Krankheitsbilder verlaufen progredient. Durch die veränderte intrakardiale und intravaskuläre Hämodynamik treten irreversible Sekundärschädigungen auf. Die Langzeitüberlebenschancen sind trotz postpartaler chirurgischer Maßnahmen gering, Spontanheilungen wurden bisher nicht beschrieben. Daher gewinnt die frühzeitige pränatale Behandlung immer mehr an Bedeutung.

Derzeit gibt es auf dem Gebiet der pränatalen, minimalinvasiven, ultraschallgesteuerten Herzpunktion zur kathetergesteuerten Ballondilatation, abgesehen von experimentellen Einzelfallberichten, noch keine etablierten Behandlungsmöglichkeiten. Auch bisher durchgeführte Tierversuche stehen weit hinter dem theoretisch Möglichen zurück.

Da minimalinvasive Behandlungen in der Zukunft der Pränatalmedizin eine wichtige Rolle spielen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Hühnerembryo als Tiermodell für ultraschallgesteuerte, intrauterine Herzpunktionen untersucht.

Beim menschlichen Feten ist eine Intervention zwischen der 18. und 33. Schwangerschaftswoche möglich, die Hühnerembryonen wurden nach 18 Tagen Inkubation punktiert.

Der Mensch hat zum Interventionszeitpunkt die Embryonalperiode mit der Organogenese bereits abgeschlossen und befindet sich in der Fetalperiode. In dieser erfolgen das Größenwachstum und die Ausreifung der Organanlagen. Das Hühnchen ist zum Zeitpunkt der Intervention noch nicht geschlüpft, die Herzentwicklung ist jedoch schon abgeschlossen und die Lungenatmung hat bereits eingesetzt. Die Herzen von Mensch und Huhn weisen eine ähnliche Aufteilung in Vorhöfe und Ventrikel auf. Unterschiede zeigen sich in den Ein- und Ausflussbahnen, im Foramen ovale und in der topographischen Lage des Herzens. Diese Unterschiede waren für diese Arbeit nicht relevant.

Um einen geeigneten Zugang zum Embryo durch die Eischale zu ermöglichen, wurde je nach Experimentalaufbau nach 48 Stunden Bebrütung oder am Tag der Punktion gefenstert. Durch diese Fenster wurde unter sonographischer Kontrolle in 38 von 42 Hühnerembryonen die Herzpunktion durchgeführt.

Zur Markierung des Stichkanals wurde während der Punktion in einer Serie Tusche, in der anderen Nilblausulfat injiziert. Bei drei Hühnerembryonen wurde versucht, mittels Katheterintervention einen Coil im Herzen zu platzieren.

Postinterventionell wurden die Hühnerembryonen nach drei bis sechs Stunden Überleben präpariert, um das Herz makroskopisch und histologisch zu untersuchen. Am Stereomikroskop wurde festgestellt, dass die Punktion in 26 von 38 Fällen erfolgreich war und ohne schwere Folgen am Myokard durchgeführt werden kann. Die histologische Untersuchung zeigte, dass sich das Myokard im Bereich des Stichkanals in den ersten sechs Stunden nach der Intervention wieder weitestgehend verschließt. Der aufgefundene Stichkanal war mit Fibrin überzogen.

Ein Hühnerembryo wurde 24 Stunden nach erfolgreicher Punktion ohne Anzeichen kardialer Dysfunktion vorzeitig aus dem Ei entnommen und für sechs Monate beobachtet.

Intrauterine, ultraschallgesteuerte Herzpunktionen am menschlichen Fetus können im Modell Hühnerembryo simuliert werden. Die Herzgröße des Hühnerembryos beträgt allerdings zum Zeitpunkt der Punktion etwa $\frac{1}{4}$ der Größe des menschlichen fetalen Herzens im für die pränatale Intervention geeigneten Stadium. Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Tiermodell Hühnerembryo ist für weitere experimentelle Ansätze zur ultraschallgesteuerten Intervention am embryonalen Herzen geeignet.

6 Literaturverzeichnis

- Allan, L.D., Maxwell, D.J., Carminati, M., Tynan, M.J., (1995)
Survival after fetal aortic balloon valvoplasty
Ultrasound Obstet Gynecol, 5: 90-91
- Anderson, R.H., Webb, S., Brown, N.A., Lamers, W., Moorman, A., (2003a)
Development of the heart: (2): Septation of the atriums and ventricles
Heart, 89: 949 - 58
- Anderson, R.H., Webb, S., Brown, N.A., Lamers, W., Moorman, A., (2003b)
Development of the heart: (3): Formation of the ventricular outflow tracts,
arteriel valves, and intrapericardial arterial trunks
Heart, 89: 1110 - 18
- Arey, L.B. (1965)
Developmental Anatomy
7. Auflage, W.B. Saunders Company - Philadelphia
- Armstrong, E.J., Bischoff, J., (2004)
Heart Valve Development
Circ Res, 95: 459.
- Arzt, W., Tulzer, G., Aigner, M., Mair, R., Hafner, E., (2003)
Invasive intrauterine treatment of pulmonary atresia/intact ventricular
septum with heart failure
Ultrasound Obstet Gynecol, 21:186-88
- Axt-Fliedner, R., Kreiselmaier, P., Schwarze, A., Krapp, M., Gembruch, U.,
(2006)
Development of hypoplastic left heart syndrome after diagnosis of aortic
stenosis in the first trimester by early echocardiography
Ultrasound Obstet Gynecol, 28: 106-09
- Berishvili, I.I., Sabirov, B.N., Vakhromeeva, M.H.
Embryogenesis of atrioventricular valve anomalies
Arkh Patol, 57: 92 - 95
- Bezzel, E., Prinzinger, R., (1990)
Ornithologie.
2. Auflage, Ulmer – UTB Stuttgart

- Chaoui, R., Bollmann, R., Goeldner, B., Rogalsky, V., (1994)
Aortic balloon valvuloplasty in the human fetus under ultrasound
guidance: a report of two cases
Ultrasound Obstet Gynecol, 4: 162 A
- Chinchilla, A., Franco, D., (2006)
Regulatory mechanisms of cardiac development and repair
Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 6: 101 - 12
- Cohen, M.S., (2001)
Fetal diagnosis and management of congenital heart disease
Clin Perinatol, 28: 11-29
- De la Cruz, M.V., Gimenez-Ribotta, M., Saravalli, O., Cayre, R., (1983)
The contribution of the inferior endocardial cushion of the atrioventricular
canal to cardiac septation and to the development of the atrioventricular
valves : study in the chick embryo
Am J Anat, 166: 63-72
- De Lange, F.J., Moorman, A.F., Anderson, R.H., Manner, J., Soufan, A.T., de
Gier-de Vries, C., Schneider, M.D., Webb, S., van den Hoff, M.J.,
Christoffels, V.M., (2004)
Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves
Circ Res, 95: 645-54
- Drews, U., (2006)
Taschenatlas der Embryologie.
Thieme-Verlag Stuttgart – New York
- Epstein, J.A., Buck, C.A., (2000)
Transcriptional regulation of cardiac development: implications for
congenital heart disease and DiGeorge syndrome
Pediatr Res, 48: 717-24
- Evans, M.I., Wapner, Z.J., (2005)
Invasive prenatal diagnostic procedures 2005
Semin Perinatol, 29: 215-58
- Fesslova, V., Narva, S., Villa, L., (1999)
Evolution and long term outcome in cases with fetal diagnosis of
congenital heart disease: Italian multicentre study. Fetal Cardiology
Study Group of Italian Society of Pediatric Cardiology
Heart, 82: 594-99

- Friedman, A., Kleinman C., Copel, J., (2002)
Diagnosis of cardiac defects: where we've been, where we are and
where we're going
Prenat Diagn, 22: 280-84
- Galindo, A., Gutierrez-Larraya, F., Velasco, J.M., de la Fuente, P., (2006)
Pulmonary balloon valvuloplasty in a fetus with critical pulmonary
stenosis/atresia with intact ventricular septum and heart failure
Fetal Diagn Ther, 21: 100-04
- Gittenberger-de Groot, A.C., Bartelings, M.M., Deruiter, M.C., Poelmann, R.E.,
(2005)
Basics of cardiac development for the understanding of congenital heart
malformations
Pediatr Res, 57: 169-76
- Golombeck, K., Ball, R.H., Lee, H., Farrell, J.A., Farmer, D.L., Jacobs, V.R.,
Rosen, M.A., Filly, R.A., Harrison, M.R., (2006)
Maternal morbidity after maternal-fetal surgery
Am J Obstet Gynecol, 19: 834-9
- Green, P., Alfirevic, Z., (2005)
The evidence base for fetal medicine
Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 19: 75-83
- Haak, M.C., Twisk, J.W., Van Vugt, J.M., (2002)
How successful is fetal echocardiographic examination in the first
trimester of pregnancy?
Ultrasound Obstet Gynecol, 20: 9-13
- Herzog, K., (1968)
Anatomie und Flugbiologie der Vögel
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Hofbeck, M., Beinder, E., Kirchgessner, E., Buheitel, G., Singer, H., (1997)
Perinatale Behandlung von Kindern mit pränatal diagnostiziertem
angeborenem Herzfehler
Z Geburtsh Neonatol, 201: 49-54
- Hornberger, L.K., Sanders, S.P., Rein, A.J., Spevak, P.J., Parness, I.A., Colan,
S.D., (1995)
Left heart obstructive lesions and left ventricular growth in the
midtrimester fetus. A longitudinal study.
Circulation, 92: 1531-38

- Jouannic, J.M., Boudjemline, Y., Benifla, J.L., Bonnet, D., (2005)
Transhepatic ultrasound-guided cardiac catheterization in the fetal lamb:
a new approach for cardiac intervention in fetuses
Circulation, 111: 736-41
- Jung, E., Won, H.S., Shim, J.Y., Lee, P.R., Kim, A., Kim, K.S., (2005)
Successful outcome following prenatal intervention in a female fetus with
bladder outlet obstruction
Prenat Diagn, 25: 1107-10
- King, A.S.; McLelland, J., (1978)
Anatomie der Vögel: Grundzüge und vergleichende Aspekte
Ulmer Verlag, Stuttgart
- Kohl, T., (2002)
Fetal echocardiography: new grounds to explore during fetal cardiac
intervention
Pediatr Cardiol, 23: 334-46
- Kohl, T., Sharland, G., Allan, L.D., Gembruch, U., Chaoui, R., Lopes, L.M.,
Zielinsky, P., Huhta, J., Silverman, N.H., (2000a)
World experience of percutaneous ultrasound-guided balloon
valvuloplasty in human fetuses with severe aortic valve obstruction
Am J Cardiol, 85:1230-33
- Kohl, T., Strumper, D., Witteler, R., Merschhoff, G., Alexiene, R., Callenbeck,
C., Asfour, B., Reckers, J., Aryee, S., Vahlhaus, C., Vogt, J., Van Aken,
H., Scheld, H.H., (2000b)
Fetoscopic direct fetal cardiac access in sheep: an important
experimental milestone along the route to human fetal cardiac
intervention
Circulation, 102: 1602-04
- Kohl, T., Szabo, Z., Suda, K., Petrossian, E., Ko, E., Kececioglu, D., Moore, P.,
Silverman, N.H., Harrison, M.R., Chou, T.M., Hanley, F.L., (1997)
Fetoscopic and open transumbilical fetal cardiac catheterization in sheep.
Potential approaches for human fetal cardiac intervention.
Circulation, 95: 1048-53
- Kohl, T., Witteler, R., Strumper, D., Gogarten, W., Asfour, B., Reckers, J.,
Merschhoff, G., Marcus, A.E., Weyand, M., Van Aken, H., Vogt, J.,
Scheld, H.H., (2000c)
Operative techniques and strategies for minimally invasive fetoscopic
fetal cardiac interventions in sheep
Surg Endosc, 14: 424-30

- Lary, J.M., Paulozzi, L.J., (2001)
Sex differences in the prevalence of human birth defects: a population-based study
Teratology, 64: 237-51
- Lincoln, J., Alfieri, C.M., Yutzey, K.E., (2004)
Development of heart valve leaflets and supporting apparatus in chicken and mouse embryos
Dev Dyn, 230: 239-50
- Lopes, L.M., Cha, S.C., Kajita, L.J., Aiello, V.D., Jatene, A., Zugaib, M., (1996)
Balloon dilatation of the aortic valve in the fetus. A case report
Fetal Diagn Ther, 11: 296-300
- Martinsen, B.J., (2005)
Reference Guide to the Stages of Chick Heart Embryology
Dev Dyn, 233: 1217-37
- Masshoff, W., Stoplmann, H.J., (1961)
Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Schalenhaut und Kalkschale des Hühnereies
Cell Tissue Res, 55: 818-32
- Maxwell, D., Allan, L., Tynan, M.J., (1991)
Balloon dilatation of the aortic valve in the fetus: a report of two cases
Br Heart J, 65: 256-58
- Meyer-Wittkopf, M., (2002)
Interventional fetal cardiac therapy – possible perspectives and current Shortcomings
Ultrasound Obstet Gynecol, 20: 527-31
- Meyer-Wittkopf, M., Hofbeck, M., (2003)
Pränatale Herzdiagnostik mittels zwei- und dreidimensionaler Fetalechokardiographie
Herz, 28:240-49
- Meyer Wittkopf, M., Kaulitz, R., Hofbeck, M., Walwiener, D. (2003b)
In-utero Diagnose und Therapie angeborener Herzfehler – Grenzen und Möglichkeiten.
Dtsch Arztebl, 50: 3308-13
- Meyer-Wittkopf, M., Walwiener, D. (2003c)
Intrauterine Herzfehlertherapie – Visionen und Möglichkeiten
Geburtsh Fraunheilk, 12: 449-50

- Moorman, A., Webb, S., Brown, N.A., Lamers, W., Anderson, R.H., (2003)
Development of the heart: (1): Formation of the cardiac chambers and
arterial trunks
Heart, 89: 806 - 14
- Netter, F.H., (2000)
Atlas der Anatomie des Menschen
2. Auflage, Novartis, Thieme-Verlag
- Okada, R., (1991)
Pathology of the cardiac valves
J Cardiol Suppl., 25: 35 - 41
- Oosthoek, P.W., Wenink, A.C., Vrolijk, B.C., Wisse, L.J., DeRuiter, M.C.,
Poelmann, R.E., Gittenberger-de Groot, A.C. (1998)
Development of the atrioventricular valve tension apparatus in the human
heart
Anat Embryol (Berl), 198: 317 - 29
- Patten, B.M., Carlson, B.M. (1974)
Foundations of embryology
3. Auflage, McGraw-Hill Book Company
- Romanoff, A.L. (1960)
The avian embryo, structural and functional development
The Macmillan Company, New York
- Rychid, J., (2005)
Hypoplastic left heart syndrome: from in-utero diagnosis to school age
Semin Fetal Neonatal Med, 10: 553-66
- Sadler, T.W., Langman, J., Drews, U. (deutsche Übersetzung), (2003)
Medizinische Embryologie – Die normale menschliche Entwicklung und
ihre Fehlbildungen
10. übersetzte Auflage, Thieme-Verlag
- Schroeder, J.A., Jackson, L.F., Lee, D.C., Camenisch, T.D., (2003)
From the function of developing heart valves: coordination by
extracellular matrix and growth factor signaling
J Mol Med, 81: 392 – 403
- Simpson, J.M., Sharland, G.K., (1997)
Natural history and outcome of aortic stenosis diagnosed prenatally
Heart, 77: 205-12

- Sissman, N.J., (1970)
Developmental Landmarks in Cardiac Morphogenesis: Comparative
Chronology
Am J Cardiol, 25: 141 - 148
- Sohn, C., Holzgreve, W., (2000)
Ultraschall in Gynäkologie und Geburtshilfe
Unveränderter Nachdruck der ersten Ausgabe, Thieme-Verlag
- Subirana, M.T., (2005)
Congenital heart disease: present situation and future prospects
Rev Esp Cardiol, 58: 1381 - 84
- Teal, S.T., Moore, G.W., Hutchins, G.M., (1986)
Development of aortic and mitral valve continuity in the human embryonic
heart
Am J Anat, 176: 447 - 60
- Tworetzky, W., Wilkins-Haug, L., Jennings, R., van der Velde, M., Marshall, A.,
Marx, G., Colan, S., Benson, C., Lock, J., Perry, S., (2004)
Balloon dilataion of severe aortic stenosis in the fetus
Circulation, 110: 2125-31
- Tulzer, G., Arzt, W., Franklin, R.C., Loughna, P.V., Mair, R., Gardiner, H.M.,
(2002)
Fetal pulmonary valvuloplasty for critical pulmonary stenosis or atresia
with intact septum
Lancet, 360: 1567-68
- Uebing, A., Steer, P.J., Yentis, S.M., Gatzoulis, M.A. (2006)
Pregnancy and congenital heart disease
BMJ, 10: 1136
- Walsh, D.S., Adzick, N.S., (2003)
Foetal surgery für spina bifida
Semin Neonatol, 8: 197-205
- Walsh, D.S., Adzick, N.S., (2000)
Fetal surgical intervention
Am J Perinatol, 17: 277-83
- Wessels, A., Markman, M.W.M., Vermeulen, J.L.M., Anderson, R.H., Moorman,
A.F.M., Lamers, W.H., (1996)
The development of the atrioventricular junction in the human heart
Circ Res, 78: 110-17

- Wilkins-Haug, L.E., Benson, C.B., Tworetzky, W., Marshall, A.C., Jennings, R.W., Lock, J.E., (2005)
In-utero intervention for hypoplastic left heart syndrome – a perinatologists perspective
Ultrasound Obstet Gynecol, 26: 481-86
- Wloch, A., Respondek-Liberska, M., Sysa, A., Moll, J., Goc, B., Krzystolik-Ladzinskaya, J., Szydlowski, I., Wloch, S., Sikora, J., (2004)
Significant aortic valve stenosis in the prenatal period – diagnosis, treatment, outcome
Przegl Lek, 61: 589-92

Anlagen

Die CD in der Anlage beinhaltet insgesamt sieben Videosequenzen, die mit dem Ultraschallgerät aufgezeichnet wurden. Es sind zum einen die sonographischen Darstellungen der Küken im Ei zu sehen, teilweise mit eingestellter Farbdopplerfunktion, zum anderen werden kardiale Funktionen unter Ultraschallkontrolle gezeigt.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die diese Dissertation ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Herrn PD Dr. med. Matthias Meyer-Wittkopf danke ich besonders für die freundliche Überlassung des Themas, seine exzellente Betreuung und für die hilfreiche, intensive Förderung dieser Arbeit.

Bei Herrn Professor em. Dr. med. Ulrich Drews möchte ich mich sehr für die nachträgliche Übernahme dieser Arbeit, seine konstruktive Kritik und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Dr. med. Matthias Oppitz danke ich für seine fachliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Untersuchungen sowie seinen Einsatz und seine Betreuung.

Ein Dankeschön geht auch an Herrn Dr. med. Christian Busch und an alle Mitarbeiter des Anatomischen Institutes, die mich unterstützt und mir häufig weitergeholfen haben.

Schließlich möchte ich besonders meinen Eltern Rosemarie und Günther Fechner danken. Sie haben mir nicht nur mein Studium ermöglicht, sondern mich stets liebevoll und unterstützend begleitet. Ich widme ihnen als Dank diese Arbeit.

Lebenslauf

Name: Sandra Fechner

Geburtstag: 17.07.1981

Geburtsort: Albstadt

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Günther Fechner, Lehrer
Rosemarie Fechner, geb. Kästle, Sekretärin

Schulausbildung: 1988 – 1992 Burgschule Meßstetten
1992 – 1998 Progymnasium Meßstetten
1998 – 2001 Gymnasium Ebingen, Abschluss: Abitur

Studium: seit 10/2001 Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-
Universität zu Tübingen
09/2003 Physikum
10/2003 Beginn der experimentellen Arbeiten zur
Dissertation an der Universitätsfrauenklinik
und dem Anatomischen Institut Tübingen
27.11.2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen: 03 - 04/2004 Famulatur, Chirurgie, Kreisklinik Reutlingen
08 - 09/2004 Famulatur, Gynäkologie und Geburtshilfe,
Kreiskrankenhaus Böblingen
03 - 04/2005 Famulatur, Pränataldiagnostik,
Universitätsklinik Tübingen
09 - 10/2005 Famulatur, Chirurgie, Universitätsklinik,
Tübingen
02 - 03/2006 Famulatur, Emergency Room, Las Palmas
Medical Center, El Paso, Texas, USA

Lebenslauf

- Praktisches Jahr: 08 - 12/2006 Chirurgie, Universitätsklinik und BG
Unfallklinik Tübingen
08 - 10/2006 Unfallchirurgie
10 - 11/2006 Allgemeinchirurgie
11 - 12/2006 Chirurgische Ambulanz und
Poliklinik
- 12/2006 - 04/2007 Allgemeinmedizin
Praxis Dres. med. Huber/ Dr. med. Holzwarth,
Fachärzte für Allgemeinmedizin, Leinfelden-
Echterdingen
- 04 - 07/2007 Innere Medizin, Universitätsklinik Tübingen
04 - 05/2007 Sportmedizin
05 - 06/2007 Nephrologie und Rheumatologie
06 - 07/2007 Hämatologie und Onkologie
- Aktivitäten: 1997/1998 dreimonatiger Schüleraustausch mit Ontario,
Kanada
- 1999 Teilnahme an der Deutschen
Schülerakademie zum Thema „Bioinformatik“
- 1999/2000 Teilnahme am Schülerforschungszentrum Bad
Saulgau zum Thema „Transmission of signals“
- 2003 - 2006 Tutorin am Anatomischen Institut Tübingen
-