

# Konstruktion und Etablierung einer Klimakammer für die Untersuchung der embryonalen Herzentwicklung

Stephan Baron<sup>1</sup>, Gülay Orhan<sup>2</sup>, Oliver Hornung<sup>1</sup>, Holger Blume<sup>1</sup>,  
Judith Misske<sup>2</sup>, Kambiz Norozi<sup>2</sup>, Armin Wessel<sup>2</sup>, Talât Mesud Yelbuz<sup>2</sup>  
und Bodo Heimann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mechatronik-Zentrum Hannover, Universität Hannover,  
Appelstraße 11, 30167 Hannover

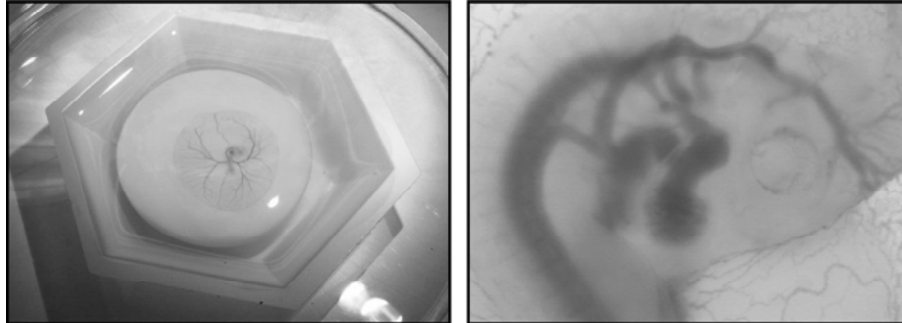
<sup>2</sup>Medizinische Hochschule Hannover, Kinderklinik,  
Abt. Pädiatrie III - Pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin,  
Carl-Neuberg-Straße 1, 30623 Hannover  
Email: baron@mzh.uni-hannover.de

**Zusammenfassung.** Die Herzentwicklung ist ein sehr dynamischer Vorgang, der in einer hoch komplexen Art und Weise abläuft und bei dem alle Entwicklungsschritte strikt im Einklang stehen müssen. Die einzelnen Prozesse gehen sowohl mit strukturellen als auch funktionellen Veränderungen einher. Schon kleinste, scheinbar unbedeutende Einflüsse und Fehlsteuerungen können kritische Prozesse während der Herzentstehung so stören, dass verschiedene Formen von Herzfehlbildungen resultieren. Ziel dieses Projektes ist, die Herzentwicklung in Hühnerembryonen in sog. „schalenlosen Kulturen“ (SK) über einen definierten Zeitraum von bis zu 145 Stunden nach Inkubation direkt *live* zu filmen, um kritische Veränderungen während der normalen und pathologischen Herzentwicklung visualisieren und dokumentieren zu können. Der entstandene Aufbau stellt ein neues Verfahren zur Visualisierung der embryonalen Herzentwicklung dar.

## 1 Stand der Forschung

In der Vergangenheit wurden eine Reihe unterschiedlicher bildgebender Verfahren angewandt, um die komplexe embryonale Herzentwicklung in zwei bzw. drei Dimensionen zu visualisieren [1, 2]. Ziel ist es, ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen für die Entstehung kongenitaler Herzdefekte während der embryonalen Entwicklung zu erreichen. Bislang war es aufgrund des enormen experimentellen Aufwandes nicht möglich, die Herzentwicklung über einen längeren Zeitraum direkt *live* zu filmen. Für die Durchführung solcher Untersuchungen ist eine Umgebung unabdingbar, in der ein Embryo lange Zeit außerhalb der Eischale überleben und sich entwickeln kann. Frühere Studien konnten die Entwicklungsphasen nicht über eine längere Periode dokumentieren, weil entweder nicht schlagende bzw. tote Herzen untersucht wurden oder zwischen den Aufnahmen stundenlange Unterbrechungen notwendig waren, in denen der

**Abb. 1.** Links: Schalenlose Kultur eines 3 Tage alten Hühnerembryos in einer Petri-schale. Rechts: Mikroskopaufnahme.



Embryo wieder inkubiert werden musste und dadurch viele Entwicklungsschritte nicht erfasst werden konnten. Eigene Vorversuche der *in vivo*-Visualisierung der Herzentwicklung mit großen Zeitabständen erlaubten keine differenzierten Diagnosen aufgrund der methodischen Einschränkungen und den daraus resultierenden unzulänglichen und unstabilen Versuchsbedingungen [3, 4].

## 2 Zielsetzung

Ziel dieses Projektes ist, hochauflösende Bildaufnahmen eines schlagenden Hühnerembryo-Herzens über einen Zeitraum von bis zu 145 Stunden zu ermöglichen. Dazu ist es nötig, die klimatischen Bedingungen an die Bedürfnisse eines Hühnerembryos in einer schalenlosen Kultur (Abb. 1) anzupassen und mit hoher Qualität dauerhaft bereitzustellen.

Durch Versuchsreihen gegenüber geschlossenen Eiern in einem herkömmlichen Inkubator soll die schalenlose Kultur als Untersuchungsmethode etabliert werden. Eine Messwarterfassung und -speicherung soll zudem die Dokumentation der Versuchsabläufe erleichtern.

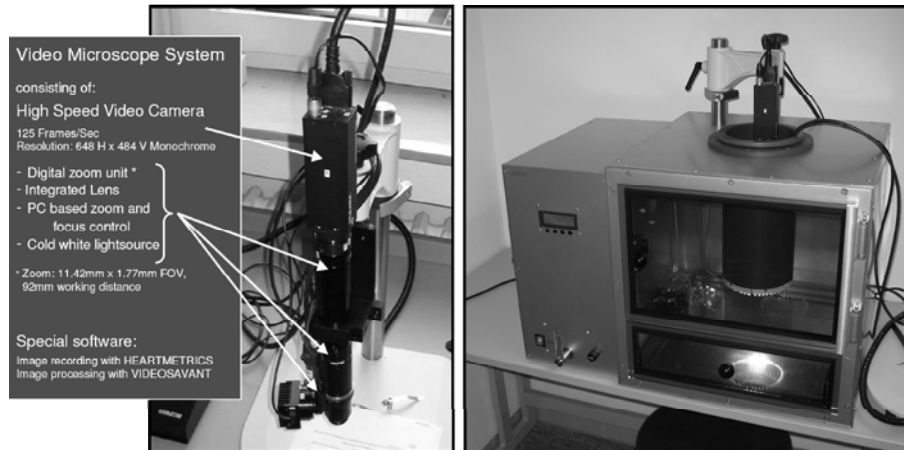
Zur Visualisierung und Analyse der Herzentwicklung ist ein High-Speed-Videomikroskopsystem so in eine Klimakammer zu integrieren, dass eine ständige Beobachtung ohne störende Einflüsse auf den Embryo erfolgen kann.

## 3 Aufbau und Etablierung

### 3.1 Technik

Im Rahmen der in [5] beschriebenen Arbeit wurde eine Klimakammer (Abb. 2) entwickelt, mit der es möglich ist, vergleichbar mit einem Brutkasten dauerhaft angepasste und beständige Umweltbedingungen bei einer Temperatur von ca. 38 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60 % zu sichern. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Stabilität der Temperatur gelegt, da diese einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des Embryos hat. Durch den Einsatz

**Abb. 2.** Links: Das verwendete Videomikroskop-System *Pulnix TM-6710 CL*. Rechts: Klimakammer mit integrierter Kamera.



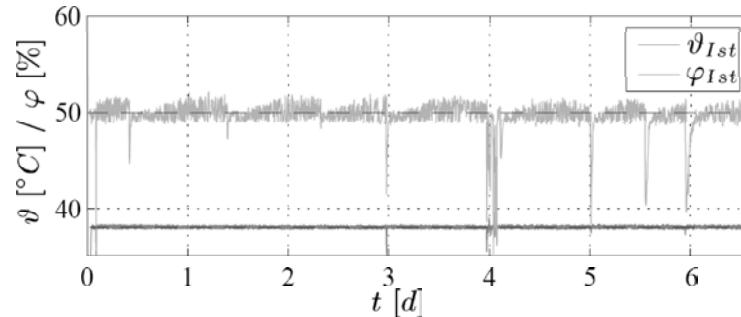
eines kontinuierlichen Reglers ist es möglich die durchschnittliche Abweichung über einen Zeitraum von mehreren Tagen unter  $\pm 0,2^\circ\text{C}$  zu halten (Abb. 3). Eine genügend hohe Luftfeuchtigkeit verhindert ein Austrocknen des schalenlosen Hühnereis. Zusätzlich wird der Sauerstoffgehalt im Innern der Kammer gemessen und eine ausreichende Versorgung wird durch einen großzügigen Luftaustausch mit der Umgebung realisiert. Eine spätere Weiterentwicklung soll auch die Regelung des Luftsauerstoffgehaltes ermöglichen.

Um die Beständigkeit der Umweltverhältnisse zu gewährleisten, wurden moderne Komponenten eingesetzt. Die Temperatur und Luftfeuchte werden mit kalibrierten digitalen Sensoren gemessen. Als Wärmeübertrager kommen Peltierelemente mit einer Wärmeleistung von ca. 200 Watt zum Einsatz. Die Luftfeuchte wird mittels Aerosolgewinnung über einen Piezoschwinger erzeugt. Axialventilatoren leiten die Luft durch ein Rohrsystem, in dem die erforderlichen Klimaverhältnisse erzeugt werden. Alle Sensordaten werden von einem Mikrocontrollerboard (Synertronixx GmbH, Hannover) verarbeitet. Dieses bietet durch seinen modularen Aufbau genügend Potential für Erweiterungen jeglicher Art und ermöglicht durch ein Linux-Betriebssystem eine schnelle Anpassung an die geforderten Bedürfnisse. Benutzereingaben werden über ein Frontpanel vorgenommen. Messwertverläufe können über eine Netzwerkschnittstelle auf einen PC übertragen und archiviert werden.

### 3.2 Schalenlose Kultur

Um das Herz eines Hühnerembryos beobachtbar zu machen, werden befruchtete Hühnereier (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) im Alter von 72 Stunden in der Mitte aufgebrochen und mit komplettem Inhalt in hexagonale Wägeschalen aus Styropor gegeben. Diese wird in eine Petrischale gestellt, die teilweise mit Wasser gefüllt ist, somit kann die SK im Laborbereich transportiert werden.

**Abb. 3.** Messdatenverlauf für Temperatur  $\vartheta$  und Luftfeuchte  $\varphi$  über 7 Tage (Sollwerte sind gestrichelt dargestellt). Die Einbrüche entstanden durch das Öffnen der Tür.



Gleichzeitig ermöglicht die schalenlose Aufbewahrung einen direkten Einblick in die extra- und intraembryonale Entwicklung.

### 3.3 Bilddatenerfassung und -analyse

Zur Analyse der kardialen Funktion im embryonalen Herzen sollen während des Beobachtungszeitraumes multiple Aufnahmen der Herzaktion in relevanten Entwicklungsstadien mit einer Hochgeschwindigkeitskamera gemacht werden. Die in einem isolierenden Kunststofftubus (Abb. 2) integrierte digitale Hochgeschwindigkeitsvideokamera (Pulnix TM-6710 CL, Jai Pulnix Inc., Sunnyvale, Ca, USA) erlaubt Aufnahmen mit einer Bildrate von 120 Bildern/s. Die Videobilder der Hochgeschwindigkeitskamera werden von einem Bildverarbeitungsrechner gespeichert und können mit einer speziell entwickelten Software-Lösung (HeartMetrics, Physimetrics Inc., Roswell, GA, USA und Video Savant, IO Industries Inc., London, Ontario, Ca) aufbereitet und weiterverarbeitet werden. Neben dem Herzzeitvolumen (CO) können auch andere kardiale Funktionsparameter wie Verkürzungsfraktion des Herzdurchmessers (SF) oder die systolische Flächenverkleinerung (FAC) aus markierten Landmarken errechnet werden [6].

### 3.4 Etablierung

Messwertaufnahmen über mehrere Tagen zeigen eine äußerst geringe Regeldifferenz der Klimawerte (Abb. 3). Vergleichsversuche mit einem handelsüblichen Inkubator (BSS 420, Grumbach Brutgeräte GmbH, Aßlar) ergeben keine signifikanten Unterschiede in den Entwicklungsphasen nach Hamburger-Hamilton [7] der Hühnerembryonen. Tab. 1 zeigt dazu die Ergebnisse eines exemplarischen Versuchsablaufs. Das vorgestellte System kann somit die schalenlose Kultur als Mittel zur Beobachtung von Hühnerembryonen oder ähnlichem Probenmaterial, wie z.B. Zebrafisch etablieren.

**Tabelle 1.** Vergleich Inkubator - Klimakammer

	inkubierte Eier	befruchtete und entwickelte Eier	Stadium entsprechend Hamburger-Hamilton (Inkubationszeit)
Inkubator BSS 420	20	18	$15.61 \pm 1.35$ (50-55 h)
Klimakammer	20	16	$16.38 \pm 0.94$ (51-56 h)

## 4 Ergebnisse und Ausblick

Die gewonnenen Bilddaten erlauben neue Einblicke in die normale und abnormale Herzentwicklung. Insbesondere früheste Phasen der Entwicklung von Fehlbildungen des Herzens können mit Hilfe des entwickelten Systems über mehrere Tage hinweg beobachtet und ihre Auswirkungen auf die kardiale Funktion analysiert werden. Dabei ist der gesamte Versuchsaufbau sehr kompakt und einfach zu bedienen. Mit Hilfe der Klimakammer konnten bis jetzt erstmals Videosequenzen über einen Zeitraum von 3 Tagen aufgenommen werden. Danach wird die Sicht auf die interessierenden Bereiche durch die oberen Extremitätsknospen und später die Allantois verschlechtert.

Die aktuellen Aufnahmen (Abb. 1) zeigen Strukturen, die dicht unter der Oberfläche der Ei-Membran liegen. In einem nächsten Schritt soll der Einbau eines Optischen Kohärenz-Tomographen (OCT) erfolgen. Hiermit können Daten in drei dimensionaler Form akquiriert werden, um die Herzentwicklung in räumlicher Ausdehnung zu analysieren.

## Literaturverzeichnis

1. Efimov IR, Nikolski VP, Salama G. Optical imaging of the heart. *Circ Res* 2004;95(1)(95(1)):21–33.
2. Yelbuz TM, Zhang X, Choma MA, et al. Approaching cardiac development in three dimensions by magnetic resonance microscopy. *Circulation* 2002;106(106):e154–5.
3. Yelbuz TM, Leatherbury L, Wolfe RR, et al. Time-lapse study with high speed video camera in the early embryonic chick heart to visualize a time window of normal and abnormal heart development. *Circulation* 2002;106(10)(106(10)):e44–5.
4. Tutarel O, Norozi K, Hornung O, et al. Cardiac failure in the chick embryo resembles heart failure in humans. *Circulation* 2005;112(112):e352–e353.
5. Baron Stephan. Entwicklung und Aufbau einer Klimakammer für die Analyse der kardialen Funktion im embryonalen Herzen. Diplomarbeit, Universität Hannover, Mechatronik-Zentrum Hannover; 2004. - unveröffentlicht.
6. Yelbuz TM, Uribe R, Hayden S, et al. Quantitative Analyse der Ventrikel- und Myokardfunktion im frühen embryonalen Herzen mittels eines neu entwickelten Video-Mikroskop-Systems. *Z Kardiol* 2005;94(88):Suppl 1, V1205.
7. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1951;88(88):49–92.