

3 Material und Methoden

3.1 Patientenerfassung und Statistik

Ausgewertet wurden 3065 pränatale Chromosomenanalysen aus dem Institut für Human-genetik der Charité, Campus Virchow-Klinikum. Die Chromosomenanalysen wurden nach einer Chorionzottenbiopsie durchgeführt. Die Chorionzottenbiopsien und die Ultraschalluntersuchungen wurden in 29 zuweisenden Zentren erbracht³, die auf Ultraschall- und Pränataldiagnostik spezialisiert sind.

Auf die Vorteile der Chorionzottenbiopsie gegenüber der Amniozentese im ersten Trime-non wurde im Kapitel 1.1. ausführlich eingegangen. Es wurde jedoch auch auf die Abortrate nach Chorionzottenbiopsie und das Risiko von Extremitätenreduktionsdefekten verwiesen. Chorionzottenbiopsien, welche von erfahrenen Pränataldiagnostikern durchgeführt werden, dürften die angegebene Abortrate von 1-2% deutlich unterschreiten. Lau et al. beschrieben im Jahr 2005 nach Auswertung von 1355 transabdominalen Chorionzottenbiopsien eine prozedurbedingte Abortrate von maximal 0,74% (Lau et al., 2005). Nanal et al. errechneten in einer Auswertung von 436 Chorionzottenbiopsien die prozedurbedingte Abortrate durch Abzug der Aborte bei Feten mit bekannten letalen Fehlbildungen und der Aborte, welche erst nach 2 Wochen auftraten, von der Gesamtabortrate und erhielten dadurch sogar eine Rate von 0,23%. Wie bereits angeführt ist eine genaue prozentuale Angabe der durch Chorionzottenbiopsie bedingten Abortrate schwierig, da die Spontanabortrate berücksichtigt werden muss.

Eine Aussage, warum in den in der vorliegenden Arbeit ausgewerteten Fällen der Chorionzottenbiopsie gegenüber einer Amniozentese der Vorzug gegeben wurde, kann anhand der Zuweisungsunterlagen und des Überweisungsauftrages, die im Institut für Human-genetik der Charité, Campus Virchow-Klinikum, vorlagen nicht getroffen werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass der Wunsch der Mutter/ der Eltern nach einer schnellen Karyotypisierung im Vordergrund stand. Der Befund einer Chorionzotten-Kurzzeitkultur liegt oft bereits nach 1 bis 2 Tagen vor, der Befund der Langzeitkultur etwa nach 1 bis 3 Wochen. Auch kann bei höherem Schwangerschaftsalter das Risiko eines vorzeitigen Blasensprunges nach Amniozentese zur Entscheidungsfindung geführt haben. Zusätzlich könnte die Plazentalage (Vorderwandplazenta) in die Wahl des Untersuchungsverfahrens mit einbezogen worden sein.

Folgende Daten wurden erfasst:

- Mütterliches und väterliches Alter

³ davon 28 Zuweiser aus Berlin

- Schwangerschaftswoche z. Z. der Entnahme/ z. Z. des auffälligen Befundes (rechnerisch/ Ultraschall)
- Durchgeführte Entnahmemethode, weiterführende Untersuchungsverfahren
- Indikation (Mehrfachnennungen möglich);

Die Indikation „auffälliger Ultraschallbefund“ wurde wie folgt unterteilt:

- (1) Plexus-choroideus-Zyste
- (2) Ventrikulomegalie/ Hydrozephalus internus
- (3) Sonstige Hirnauffälligkeit
- (4) Auffällige Kopfform
- (5) Gewebsneoplasien des Kopfes
- (6) Gesichtsauffälligkeit
- (7) Nackentransparenz, früher häufig Nackenödem/ Nackenfalte
- (8) Hygroma colli
- (9) Sonstige Halsauffälligkeit
- (10) White spot
- (11) ASD (Vorhofseptumdefekt)
- (12) VSD (Ventrikelseptumdefekt)
- (13) AV-Kanal (Atrioventrikular-Kanal)
- (14) Vitium cordis ohne nähere Angabe
- (15) Zwerchfellhernie
- (16) Sonstige Thoraxauffälligkeit
- (17) Duodenalstenose/-atresie
- (18) Echogener Darm
- (19) Sonstige Auffälligkeit des Gastrointestinaltraktes
- (20) Sonstige abdominelle Auffälligkeit
- (21) Exomphalozele
- (22) Sonstige Auffälligkeit der vorderen Bauchwand
- (23) Pyelektasie
- (24) Sonstige Auffälligkeit des Urogenitaltraktes

- (25) Spina bifida
 - (26) Polydaktylie Hand/ Fuß
 - (27) Sonstige Skelettauffälligkeit
 - (28) Generalisierter Hydrops
 - (29) Anhydramnie
 - (30) Oligohydramnie
 - (31) Polyhydramnie
 - (32) Sonstige Fruchtwasserveränderung (z. B. Farbveränderungen)
 - (33) Singuläre Umbilikalarterie
 - (34) Sonstige Nabelschnurveränderung
 - (35) Plazentaveränderung
 - (36) Wachstumsretardierung
 - (37) Sandalenlücke
 - (38) Sonstige
- Zytogenetische Analyse (Material, Befunddauer, Befund, ggf. auch von weiterführenden Untersuchungsverfahren)
- In der Auswertung der vorliegenden Daten wurde der Befund der Langzeitkultur als Ergebnis der Chorionzottenkaryotypisierung genutzt, weil dieser als repräsentativer für die fetale Chromosomenkonstitution gilt. In Fällen nicht angelegter Langzeitkulturen diente der Befund der Kurzzeitkultur als Grundlage.
- Schwangerschaftsausgang

3.2 Techniken der Chorionzottenbiopsie

Bei einer Chorionzottenbiopsie werden Teile der Plazenta, die Chorionzotten, entnommen und untersucht. Das heranwachsende Kind und die Plazenta bilden sich aus einer gemeinsamen Ursprungszelle, der Zygote. Chromosomale Abweichungen zwischen placentaren und embryonalen/ fetalen Zellen sind daher möglich, wenn auch selten. Chromosomale Mosaik (mindestens zwei verschiedene Zelllinien in einem Individuum) können durch postzygotische Non-Disjunction oder den postzygotischen Verlust eines Chromosoms entstehen. Abhängig von der Verteilung der abweichenden Zelllinie kann das Mosaik auf die Plazenta beschränkt sein oder auch im Embryo/ Fetus auftreten (Grati et al., 2006). In einer Auswertung von 62865 karyotypisierten Chorionzottenbiopsien durch

Hahnemann und Vejerslev (Hahnemann und Vejerslev, 1997) wurde ein Anteil von 1% ausschließlich auf die Plazenta begrenzter Mosaik gefunden. Der Anteil ausschließlich auf die Plazenta begrenzter Mosaik in der vorliegenden Arbeit beträgt 0,46% (14 Fälle unter 3065 ausgewerteten Untersuchungen).

Eine genaue Aussage, ob es sich bei Mosaikbefunden um plazentabegrenzte Veränderungen handelt, ist jedoch oft schwierig und erfordert in der Regel zusätzliche Untersuchungen zur weiteren Abklärung. Des Weiteren müssen Mosaikbefunde abhängig vom betroffenen Chromosom, das monosom oder trisom vorliegt, bewertet werden. So sind häufig auftretende Mosaik wie z. B. Trisomie 2 Mosaik und Trisomie 7 Mosaik fast immer Plazenta-begrenzt und bei lebend Geborenen nur extrem selten beschrieben. Für Trisomie 20 Mosaik gilt grundsätzlich dasselbe, es besteht aber eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass das Mosaik auch in den Nieren und den Harn ableitenden Gefäßen des Embryos vorliegt, sodass sich eine Risikoerhöhung auf ca. 10% ergibt. Ein deutlich höheres Risiko ergibt sich, wenn Chromosomen betroffen sind, die als volle Trisomien mit einer Lebendgeburt vereinbar sind, wie die für die Chromosomen 13, 18, 21. Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die im betrachteten Kollektiv festgestellten Mosaikbefunde.

Einteilung der Mosaikbefunde unter Berücksichtigung der Zusatzuntersuchungen	Anzahl der Fälle, <i>ggf. Kommentar zu Besonderheiten</i>
Kurzzeitkultur unauffällig, Langzeitkultur auffällig, Amniozentese oder Chordozentese ohne pathologischen Befund	11 <i>2 dieser Fälle wiesen ein Trisomie 2 Mosaik bzw. ein Trisomie 2 -Mosaik auf, diese Mosaik sind in der Regel Plazenta begrenzt.</i>
Kurzzeitkultur und Langzeitkultur auffällig, Amniozentese oder Chordozentese ohne pathologischen Befund	3 <i>In einem Fall lag ein Trisomie 20 Mosaik in der Kurzzeitkultur vor, eine Langzeitkultur wurde nicht angelegt.</i>
Kurzzeitkultur, Langzeitkultur und Amnio-	1

zentese auffällig	<i>In diesem Fall lag ein Trisomie 20 Mosaik vor</i>
Sehr wahrscheinlich „echte“ Mosaik	13 <i>Ein Fall zeigte ein Trisomie 15 Mosaik in beiden Langzeitkulturen und im fetalen Nabelschnurgewebe, unauffällige Befunde in der Amniozentese und Chordozentese sowie einen 69, XXX-Befund im fetalen Lungengewebe bei multiplen fetalen Fehlbildungen (AV-Kanal, Hygroma colli, singuläre Umbilikalarterie). In einem weiteren Fall fand sich ein 69, XXX Mosaik, dieser Befund kann aufgrund seiner Genese nicht plazentabegrenzt sein</i>
Kurzzeitkultur ohne pathologischen Befund, Langzeitkultur auffällig, keine weitere Abklärung erfolgt.	7 <i>3 dieser Fälle waren Trisomie 2 Mosaik</i>
Kurzzeitkultur und Langzeitkultur auffällig, keine weitere Abklärung erfolgt	7
Unklare Fälle	4

Die Entnahme der Chorionzotten kann entweder transabdominal oder transzervikal erfolgen.

- Transabdominale Methode: Zunächst wird die Plazenta sonographisch beurteilt und ihre Dicke gemessen. Der Ultraschallkopf wird so aufgesetzt, dass die Plazentapunktion an einer maximal dicken Plazentastelle ermöglicht wird. Mütterliche Blase und Darm sind im Passageweg zu meiden. Die Bauchdecke wird an der Punktionsstelle desinfiziert. Unter kontinuierlicher Ultraschallsicht wird nun die Punktionsnadel⁴ bis in die Plazenta eingeführt, der Mandrin durch eine Spritze ersetzt und unter vorsichtigem Vor- und Rückwärtsbewegen der Nadel Chorionzottengewebe aspiriert (Becker et al., 1995).
- Transzervikale Methode: Auch hier erfolgt zunächst eine sonographische Orientierung. Nach Desinfektion der Zervix mit einem breit wirkenden Antiseptikum wird unter Ultraschallkontrolle ein Katheter in die Plazenta eingeführt. Die geringsten Traumata wer-

⁴ verwendet wird meistens eine 20G Spinalnadel

den durch Plastikkatheter⁵ verursacht (Sohn und Holzgreve, 1995). Durch Aspiration in eine Spritze kann nun Chorionzottengewebe gewonnen werden. (Holzgreve, 1987).

3.3 Transportmedium für Chorionzotten

Das Transportmedium für Chorionzotten setzt sich wie folgt zusammen:

- 250 ml MEM Dulbecco
- 250 ml HAM's F12
- 7,5 ml L-Glutamin (200mM)
- 10 ml Hepes-Puffer (1M)
- 7,5 ml Liquemin 25000 IE
- 0,25 ml Streptomycin (0,2 g/ml)
- 0,25 ml Penicillin (200000 IE)

3.4 Kurzzeit-Chorionzottenaufbereitung

Die Chorionzotten werden in einer Petrischale⁶ mit Medium⁷ über Nacht im Brutschrank inkubiert. Vor Vorbereitung der Aufarbeitung wird ein Tropfen Colcemid zugegeben und für 1,5 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wird das Medium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und für 15 Minuten hypotone Na-Citrat-Lösung (1%ig) bei Raumtemperatur zugegeben.

In der Zwischenzeit wird Fixativ frisch hergestellt, bestehend aus Eisessig und Methanol eisgekühlt⁸.

Nach der entsprechenden Zeit wird die Na-Citrat-Lösung abgesaugt und Fixativ⁹ bei Raumtemperatur zugegeben. Dieses wird nach 10 Minuten durch frisches Fixativ ersetzt.

Nach weiteren 10 Minuten wird das Fixativ entfernt und die Chorionzotten werden zur Rehydrierung mit folgenden Lösungen gespült: abs. Ethanol für 30 Sekunden, 70% Ethanol für 30 Sekunden, 50% Ethanol für 30 Sekunden, A. dest. für 30 Sekunden und A. dest. für 2 Minuten.

Nach gründlichem Absaugen des letzten A. dest. wird mit Filterpapier gut trocken getupft, die Petrischale mit 10 bis 15 Tropfen frisch hergestellter Essigsäure (60%ig, d. h. 3 ml

⁵ z.B. Portex-Katheter von Ward, Angiomed-Katheter der Arbeitsgruppe um Holzgreve

⁶ Durchmesser 3 cm

⁷ 2ml Earle's und 5% FSK

⁸ 1:4, d.h. 10ml + 30 ml

⁹ aus dem Gefrierfach

konzentrierte Essigsäure und 2 ml A. dest.) aufgefüllt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur leicht schräg gestellt, sodass die Zotten an einer Ecke freischwimmen.

Anschließend wird je 1 Tropfen der Suspension auf einen Objektträger gegeben, der bereits vorher auf die Wärmeplatte des Ausstreichgerätes gelegt wurde. Das Material wird darin gut verteilt. Die Zähnchen des Ausstreichgerätes müssen benetzt sein. Sie führen den Tropfen über den Objektträger, setzen dabei aber nicht auf. Während des Ausstreichens über 3 Minuten muss das Material immer wieder zum Zähnchen gebracht werden.

Im Anschluss daran wird das Präparat getrocknet und mit Giemsa gefärbt.

3.5 Chorionzotten-Ansatz der Langzeitkulturen

Die Zotten liegen in einer Petrischale¹⁰ mit 3 ml Earle's ohne Zusatz vor und werden nun in ein Röhrchen mit 2 ml Trypsinlösung überführt. Das Röhrchen wird für 60 Minuten in ein Wasserbad (37°C) gestellt und zwischendurch gut geschüttelt. In der Zwischenzeit wird Collagenase aus dem Gefrierfach entnommen und aufgetaut.

Nach der Inkubation im Wasserbad muss das Röhrchen für 10 Minuten bei c.a. 1000 U/min zentrifugiert werden. In dieser Zeit wird die Collagenase in einer Konzentration von 10 % angesetzt. Das Sediment aus dem Trypsinröhrchen kann nun in das Collagenaseröhrchen überführt, mit diesem gut gemischt und für 90 Minuten in ein Wasserbad (37°C) gestellt werden, in dem es zwischendurch leicht geschüttelt werden muss.

Nach der Inkubation wird das Röhrchen mit Eagle's bis zur 10 ml-Markierung aufgefüllt und für 10 Minuten bei c. a. 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf c. a. 1 ml abgesaugt und das Röhrchen wieder bis auf 10 ml mit Eagle's aufgefüllt.

Anschließend erfolgt eine erneute 10-minütige Zentrifugierung bei 1000 U/min. Der Überstand wird wieder bis auf 1 ml abgesaugt und das Sediment mit der Pasteurpipette gut resuspendiert. Von dieser Zellsuspension werden gut 2/3 in eine beschriftete Zellkulturflasche und 1/3 in eine beschriftete Ambitube gegeben. Der Zellkulturflasche werden 2 Pipetten voll AmnioMax (A-Kultur) und der Ambitube 1 Pipette voll DHU-Medium (B-Kultur) zugefügt.

Nach 2 Tagen muss ein Mediumwechsel erfolgen, um totes Zellmaterial¹¹ zu entfernen.

3.6 Färbungen und Chorionzottenbeurteilung

Die Chorionzottenpräparate werden üblicherweise nach Giemsa gefärbt¹².

¹⁰ Durchmesser 6 cm

¹¹ Zottenreste

¹² 5 bis 10-minütige Färbung mit 10 ml Phosphatpuffer-Stammlösung und 3 bis 5 ml Giemsa

Zur besseren Beurteilung können noch weitere Färbungen erfolgen, wie G-Banden-Färbung, Q-Banden-Färbung, C-Banden-Färbung oder Silberfärbung¹³.

Mikroskopisch wird anschließend der Karyotyp bestimmt. Bei pathologischen Befunden können numerische und strukturelle Veränderungen, sowie Mosaik erkannt werden.

¹³ AG-NOR