

Fetal circulatory responses to acute hypoxaemia : studies in the chick embryo

Citation for published version (APA):

Mulder, A. L. M. (2002). *Fetal circulatory responses to acute hypoxaemia : studies in the chick embryo*. Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2002

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SAMENVATTING

Ondanks dat in de laatste decennia de perinatale zorg voor de ongeboren foetus en de pasgeborene sterk is verbeterd, ontstaat nog altijd bij 1 op de 1000 levend geboren kinderen spasticiteit ten gevolge van cerebrale schade. Dit kan slechts voor een klein deel (10%) verklaard worden door problemen rondom de geboorte. Momenteel groeit dan ook het inzicht dat de oorzaak van de cerebrale schade mogelijk ook in een vroeger stadium, voor de geboorte, gezocht moet worden. Bepaalde ziekten van de zwangere vrouw zoals hypertensie, pre-eclampsie en HELLP syndroom kunnen de functie van de placenta ernstig beperken. Hierdoor kan intra-uterien een ongunstig foetaal milieu ontstaan waardoor de foetus wordt blootgesteld aan ondervoeding en chronische hypoxie. Bovendien kunnen intra-uteriene afklemming van de navelstreng en uteriene contracties perioden van acute foetale hypoxie veroorzaken. Een goed begrip van de pathofysiologie van deze foetale bedreigingen in de baarmoeder, is een eerste begin in de preventie van cerebrale schade. Meerdere onderzoeksgroepen hebben zich bezig gehouden met de bestudering van de foetale reacties op hypoxie. Uit studies, voornamelijk bij zwangere schapen, is gebleken dat de foetus aan het eind van de zwangerschap op hypoxie reageert met een daling van de hartslag, een stijging van de bloeddruk en een herverdeling van de cardiac output ten gunste van vitale organen zoals het hart en de hersenen. Deze centralisatie van de cardiac output wordt veroorzaakt door vasoconstrictie van het perifere vaatbed in combinatie met vasodilatatie in de vitale organen. Hierbij spelen zowel neurogene factoren (het autonoom zenuwstelsel) als endocriene factoren (b.v. catecholamines, vasopressine) een belangrijke rol. Het betreft hier uitsluitend studies bij zoogdieren. Bij zoogdieren is het echter mogelijk dat maternale en ook placentale factoren invloed hebben op de foetale reactie. Bijvoorbeeld, tijdens hypoxie kunnen stresshormonen zoals catecholamines en glucocorticoïden, bij moeder vrijkomen. Deze kunnen via de placenta de foetus bereiken en de foetale reactie beïnvloeden. Ook vanuit de placenta kunnen tijdens hypoxie stoffen vrijkomen zoals prostaglandines en adenosine, die effect hebben op de foetus. Om deze reden werd besloten om in dit proefschrift de foetale reacties op hypoxie te beschrijven in een ander diermodel dat geen directe connecties met de moeder en geen placenta heeft: het kippenembryo.

BEVINDINGEN

Uit de studies in dit proefschrift werd duidelijk dat het kippenembryo een bruikbaar proefdiermodel is om het foetale cardiovasculair systeem te onderzoeken.

In hoofdstuk 2 wordt de verdeling van de cardiac output over de verschillende organen van het kippenembryo beschreven onder basale omstandigheden. Het bleek dat de verdeling van de cardiac output grote overeenkomsten toont met de verdeling zoals die beschreven is bij foetale lammeren. Een groot deel van de cardiac output werd geleid naar het chorioallantois membraan. Dit membraan bekleedt de binnenzijde van de eierschaal en verzorgt de gasuitwisseling van het embryo, vergelijkbaar met de placenta bij zoogdieren. Relatief kleine fracties van de cardiac output werden geleid naar het hart, hersenen, longen en abdominale organen. In vergelijking met foetale lammeren werd bij kippenembryo's gezien dat het deel van de cardiac output dat naar de longen gaat relatief klein is en dat dit niet toeneemt tegen het einde van de broedtijd. Bij foetale lammeren neemt dit deel wel toe tot ~ 10% van de cardiac output. Het is niet geheel duidelijk wat de fysiologische waarde hiervan is, aangezien de longen *in utero* en *in ovo* geen bijdrage leveren aan de gasuitwisseling. Met het verstrijken van de broedtijd neemt het deel van de cardiac output dat naar het embryo gaat toe en neemt het deel dat naar de extra-embryonale circulaties gaat (chorioallantois membraan en dooierzak) af; hetgeen ook bij foetale zoogdieren wordt beschreven.

In hoofdstuk 5 en hoofdstuk 6 wordt het effect van α -adrenerge receptor blokkade, respectievelijk autonoom zenuwstelsel blokkade, beschreven op de basale verdeling van de cardiac output in het kippenembryo. Na behandeling met phentolamine, een niet selectieve α_1 en α_2 adrenerge receptor blokker, werden kleine veranderingen in de basale verdeling van de cardiac output geconstateerd. Dit suggereert een beperkte invloed van α -adrenerge mechanismen op de basale vaattonus. Blokkade van het sympathisch zenuwstelsel door middel van hexamethonium, een ganglion blokker van het autonoom zenuwstelsel, gaf eveneens kleine veranderingen in de basale verdeling van de cardiac output, met name op dag 11 en 15 van de broedtijd.

Het effect van acute hypoxie op de verdeling van de cardiac output in het kippenembryo wordt beschreven in hoofdstuk 3. Acute hypoxie veroorzaakte een centralisatie van de cardiac output. Procentueel ging er meer bloed naar de hersenen en het hart, ten koste van de darmen, lever en karkas. Naast deze centralisatie van de cardiac output werd een stijging

geconstateerd van de plasma adrenaline en noradrenaline concentraties tijdens hypoxie (hoofdstuk 4). Verder toonde eerder onderzoek van onze groep bij kippenembryo's (van Golde 1997) aan dat acute hypoxie bovendien resulteert in een bradycardie en een afname van de bloedstroom naar het chorioallantois membraan. Deze observaties samen bevestigen dat het kippenembryo, zonder enige invloed van moeder of placenta, in staat is op acute hypoxie te reageren. Bovendien komen de reacties bij het kippenembryo in grote lijn overeen met de reacties zoals die beschreven zijn bij de zoogdier foetus. Dit suggereert dat de foetale reactie op hypoxie bij zoogdieren niet afhankelijk is van maternale of placentale factoren.

Bij het kippenembryo werd de reactie op acute hypoxie op verschillende tijdstippen tijdens de broedtijd bestudeerd. De totale broedtijd van het kippenembryo bedraagt 21 dagen en de experimenten werden verricht vanaf dag 10 tot dag 19 van de broedtijd. Tijdens de ontwikkeling werden duidelijke veranderingen in de reacties van het embryo geconstateerd. Perifere vasoconstrictie in reactie op acute hypoxie nam progressief toe tegen het einde van de broedtijd. Dit ging gepaard met procentueel meer bloed naar de hersenen en het hart. Ook de toename van de plasma catecholamine concentraties, met name adrenaline, in reactie op acute hypoxie werd groter naarmate de broedtijd verder vorderde. Bij zoogdieren werden tot nu toe in slechts enkele studies de veranderingen van de foetale respons op hypoxie tijdens de ontwikkeling beschreven. Ook deze studies beschrijven een toename in perifere vasoconstrictie en catecholamine afgifte. Deze observaties en de observaties bij het kippenembryo ondersteunen het concept dat de foetale reactie op acute hypoxie rijpt tijdens de foetale ontwikkeling. Het is echter niet duidelijk hoe effectief de foetale reactie op hypoxie is in het voorkomen van mortaliteit en orgaanschade, op de verschillende tijdstippen tijdens de ontwikkeling.

De centralisatie van de cardiac output tijdens acute hypoxie lijkt van belang te zijn om voldoende zuurstof transport naar de hersenen en het hart te kunnen behouden. Deze centralisatie wordt veroorzaakt door perifere vasoconstrictie en door locale vasodilatatie in de vaatbedden van de betreffende organen. In hoofdstuk 5 wordt beschreven wat er gebeurt als de perifere vasoconstrictie in reactie op hypoxie geblokkeerd wordt door middel van een α -adrenerge receptor blokker, phentolamine. De procentuele afname van de cardiac output naar het karkas werd niet meer gezien, wat betekent dat de perifere vasoconstrictie adequaat geblokkeerd werd. De toename in cardiac output naar de hersenen werd eveneens niet meer gezien, er was zelfs sprake van een afname. Dit betekent dat in het kippenembryo de toename in bloedstroom naar de hersenen tijdens hypoxie afhankelijk is van

perifere vasoconstrictie, ondanks eventuele vasodilatatoire mechanismen. De toename van de procentuele cardiac output naar het hart tijdens acute hypoxie was wel aanwezig, zij het in beduidend mindere mate. Dit kan verklaard worden door het β -adrenerg vasodilatatoir effect van catecholamines op het coronair vaatbed.

De perifere vasoconstrictie en de daarmee samengaande centralisatie van de cardiac output tijdens hypoxie is bij het kippenembryo sterk afhankelijk van α -adrenerge receptor stimulatie door catecholamines (hoofdstuk 5). Catecholamines worden vrijgemaakt na sympathische stimulatie uit sympathische zenuwuiteinden en uit chromaffine cellen in de bijniere of para-aortaal gelegen paraganglia. Chromaffine cellen kunnen echter ook direct gestimuleerd worden door hypoxie. Bij de zoogdier foetus is beschreven dat bij de immature foetus catecholamines voornamelijk door hypoxie zelf vrijkomen en niet door sympathische stimulatie. Rondom de geboorte komt echter het vrijmaken van catecholamines uit de chromaffine cellen onder controle van het sympathisch zenuwstelsel en verdwijnt de directe gevoeligheid voor hypoxie. Door middel van hexamethonium, een ganglion blokker van het autonoom zenuwstelsel, werd bij het kippenembryo de bijdrage van het sympathisch zenuwstelsel aan de respons op hypoxie onderzocht op verschillende momenten tijdens de broedtijd (hoofdstuk 6). Tot en met dag 15 van de broedtijd had behandeling met hexamethonium weinig effect op de respons op hypoxie van het kippenembryo. Op dag 19 werd echter een duidelijk effect gezien op het vrijkomen van catecholamines in respons op hypoxie. In de met hexamethonium behandelde groep was de toename in plasma catecholamine concentraties duidelijk verminderd. Dit verhinderde echter niet de centralisatie van de cardiac output. Deze observatie suggereert dat tot en met dag 15 van de broedtijd catecholamines vrijkomen door directe stimulatie van chromaffine cellen door hypoxie en niet door sympathische stimulatie. Op dag 19 van de broedtijd komt het vrijmaken van catecholamines tijdens hypoxie deels onder invloed van het sympathisch zenuwstelsel. Het lijkt aannemelijk dat enige dagen later het sympathisch zenuwstelsel volledig verantwoordelijk zal zijn voor het vrijmaken van catecholamines, zoals beschreven bij zoogdier foetussen.

ERVARINGEN MET HET KIPPENEMBRYO

Vanuit methodologisch oogpunt biedt het kippenembryo de unieke mogelijkheid om foetale cardiovasculaire reacties te bestuderen zonder invloed van maternale of placentale factoren. De studies beschreven in dit proefschrift, tonen aan dat het kippenembryo hiervoor een bruikbaar model is

met belangrijke voordelen zoals de gemakkelijke toegang tot de bloedvaten in het chorioallantois membraan voor instrumentatie, de korte broedtijd van 21 dagen en de lage kosten. Nadelen zijn het geringe bloedvolume en de gevoeligheid voor infecties na openen van het ei. Dit maakt naar onze mening het kippenembryo uitermate geschikt voor acute experimenten met of zonder instrumentatie, maar ook voor chronische experimenten, mits het ei niet geopend hoeft te worden voor instrumentatie.

De observaties beschreven in dit proefschrift vormen samen met het werk van onder anderen van Golde (proefschrift 1999), Ruijtenbeek en Blanco een goede basis voor verdere studies in het kippenembryo met betrekking tot foetale cardiovasculaire reacties. Aanvullende studies naar de rol van andere dan α -adrenerge *mechanismen* in de foetale respons op acute hypoxie zouden in dit model verder uitgezocht kunnen worden. Enige voorbeelden zijn de rol van vasopressine, angiotensine, neuropeptide Y en de rol van locale vasodilatatoire factoren zoals NO, lactaat en adenosine. Ook de mate van *effectiviteit* van de respons in de zin van overleving en orgaanschade moet verder onderzocht worden op verschillende tijdstippen tijdens de broedtijd. Een belangrijke onderzoeksvraag is ook welke factoren verantwoordelijk zijn voor de *rijping* van de foetale respons op hypoxie.

Een andere interessante toepassing van het kippenembryo model ligt in studies naar de mechanismen verantwoordelijk voor de Barker hypothese. De engelse epidemioloog D. Barker toonde aan dat een laag geboortegewicht geassocieerd is met een verhoogd risico op hart en vaatziekten op latere leeftijd (Barker *et al.* 1990; Barker *et al.* 1993). Blijkbaar beïnvloeden intra-uteriene omstandigheden, die resulteren in foetale groeiachterstand, de foetale ontwikkeling zodanig dat er een verhoogd risico ontstaat op hart en vaatziekten. Placenta disfunctie is een belangrijke oorzaak voor het achterblijven van de foetale groei. Hierbij wordt de foetus blootgesteld aan chronische ondervoeding en chronische hypoxie. Omdat het kippenembryo geen placenta heeft kan in dit model chronische ondervoeding en chronische hypoxie apart van elkaar bestudeerd worden en kan het effect op de foetale groei, de ontwikkeling van het hart en vaatstelsel en de regulatie hiervan onderzocht worden (Ruijtenbeek *et al.* 2000; Miller *et al.* 2002).

Tenslotte is ook van de kip de laatste jaren veel bekend geworden over het genoom. Het blijkt dat tussen het humaan en kip genoom grote overeenkomstige regionen geconserveerd zijn gebleven (Burt *et al.* 1999; Schmid *et al.* 2000). Dit maakt het kippenembryo tevens geschikt om de invloed van prenatale omstandigheden, zoals hypoxie en ondervoeding, te

bestuderen op de expressie van bepaalde genen, die bijvoorbeeld bijdragen aan de ontwikkeling van het hart en vaat stelsel.