

# Zur Sensitivität des Embryos im bebrüteten Hühnerei

Martin Rosenbruch

Bayer AG, D-Wuppertal

## Zusammenfassung

Das bebrütete Hühnerei ist ein seit langem und sehr oft eingesetztes Testsystem in der biomedizinischen Forschung. Vor dem Hintergrund der Diskussionen als Alternative zum Tierversuch ist die Frage der Sensitivität des Hühnerembryos wichtig. Für die Beurteilung der Entwicklung und der Reaktionen des Hühnerembryos ist die Anwendung einer einheitlichen Stadieneinteilung unerlässlich. Die Sensitivität entwickelt sich schrittweise, beginnend um den 7. Bebrütungstag. Die extraembryonalen Blutgefäßsysteme (Dottersack-Gefäßsystem und Chorio-Allantois-Membran) sind nicht innerviert. Im Sinne der 3 R sollte das bebrütete Hühnerei möglichst während früher Bebrütungsstadien eingesetzt werden, um eine Beeinträchtigung des Embryos zu vermeiden.

*Summary: The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs.*

*The embryonated chicken egg is a well accepted test system in biomedical research. In connection with the discussion as an alternative to animal experiments, the sensitivity of the chicken embryo is a relevant issue. To assess the development and the reaction of the chicken embryo, the application of a standardized staging is necessary. The sensitivity develops stepwise, beginning around day 7 of incubation. The extraembryonal blood vessel systems (yolk sac, chorio-allantoic-membrane) are not sensitive. In accordance with the 3 Rs, the embryonated chicken egg should be applied during early stages of development, to avoid a suffering of the embryo.*

Keywords: chicken embryos, sensitivity, nervous system, animal experiments

## 1 Einleitung

Das Modell des bebrüteten Hühnereies wird seit weit mehr als 100 Jahren im Bereich der experimentellen Forschung eingesetzt (Gerlach, 1887). Eine Auflistung der in den Datenbanken Medline, Embase und Biosis erfaßten Publikationen aus den Jahren 1975 bis 1996 unter den Stichwörtern *chick* und *embryo* ergibt eine Gesamtzahl von mehr als 60.000 veröffentlichten Arbeiten. Der Durchschnitt liegt hierbei vergleichsweise konstant bei ca. 3.000 Publikationen pro Jahr. Allein diese Daten unterstreichen, daß es sich bei dem Modell des bebrüteten Hühnereies um ein seit langem und sehr häufig angewandtes System handelt.

Im Editorial der ALTEX-Ausgabe 3/96 wird vor dem Hintergrund mehrerer Publikationen über dieses Testsystem die Problematik der Schmerzempfindlichkeit von Vogel-Embryonen angesprochen (Gruber, 1996).

Da die Mehrzahl wissenschaftlicher Arbeiten über Vogelembryonen am bebrüteten Hühnerei durchgeführt wird, beziehen sich die Angaben des folgenden Textes auf die Spezies „Huhn“. Wenn Anga-

ben bezüglich des Bebrütungszeitpunktes gemacht werden, lassen sich die Daten für andere, experimentell eingesetzte Vogelembryonen (z.B. Pute, Wachtel) auf der Basis der Gesamtbrutzeit hieraus ableiten.

Die hier vorgenommene Auflistung erfolgt unter besonderer Berücksichtigung des Zeitraumes bis zum zehnten Bebrütungstag, also der ersten Hälfte der Gesamtbrutdauer des Hühnerembryos. Dies geschah deshalb, weil viele Untersuchungen am bzw. ab dem zehnten Tag durchgeführt werden. Publikationen über die Ergebnisse derartiger Experimente finden sich beispielsweise in neueren Ausgaben von Zeitschriften mit pathomorphologischer, onkologischer oder toxikologischer Ausrichtung.

Zudem gelten nach dem britischen Tierschutzgesetz von 1986 (*Animals Act*, 1986) Vogelembryonen während der zweiten Bebrütungshälfte als geschützte Tiere. Nach der derzeitigen Gesetzeslage in der Bundesrepublik Deutschland gelten jedoch Experimente während der gesamten Bebrütungsphase nicht als Tierversuche. Föten oder embryonale Entwicklungsstadien sind im deutschen Tier-

schutzgesetz (TierSchG, 1993) nicht erwähnt. Nach dem Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften (EU, 1986) sind Embryonen und Föten – unabhängig von der Spezies und vom Stand der Entwicklung – sogar *expressis verbis* aus der Definition „Tier“ ausgeschlossen.

## 2 Anatomisch-physiologische Grundlagen

Die Zusammenfassung der Darstellungen zur anatomischen und physiologischen Entwicklung des Hühnerkeimlings aus den relevanten Publikationen (besonders Freeman and Vince, 1974; Rolnik, 1970; weiterführende Literatur siehe dort) ergibt folgenden embryologischen Entwicklungsprozeß: Grundsätzlich besteht die Sensitivität des Hühnerembryos nicht ab einem bestimmten Zeitpunkt, sondern nach einer initialen Bebrütungsdauer beginnen sich erste Funktionen zu entwickeln, die im Laufe der Bebrütung differenzierter werden. Die Sensitivität des Hühnerembryos muß zusammen mit den Funktionen (neuro)-muskulärer Einheiten gesehen werden. So beginnt zum Beispiel die spontane, motorische Akti-

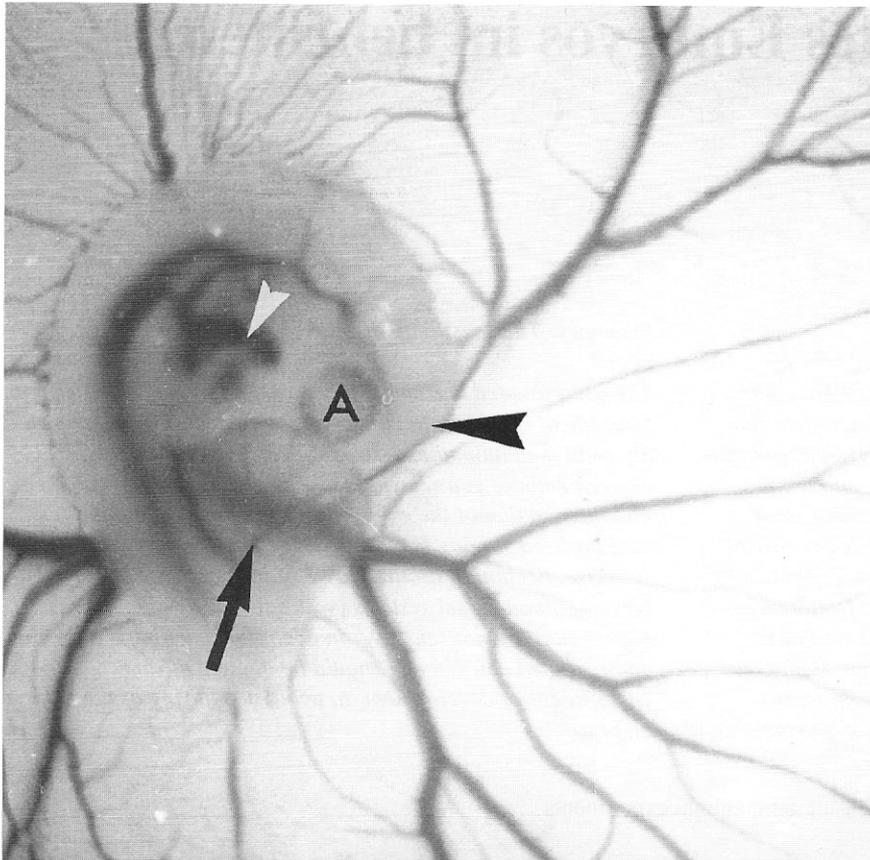


Abb. 1: Hühnerembryo mit umgebendem Dottersack-Gefäßsystem am 5. Bebrütungstag. Deutlich erkennbar das mehrkammerige Herz (kleine Pfeilspitze) mit davon abgehenden größeren Blutgefäßen in den Körper und zur Gehirnanlage (große Pfeilspitze) mit Auge (A). Aufgrund der Krümmung des Embryos hat die sich entwickelnde Allantois (→) direkten Kontakt zum Kopf.

vität des Embryos und damit seine Bewegungsfähigkeit bereits am vierten Bebrütungstag. Elektrische Aktivität konnte im Rückenmark ab dem vierten Tag nachgewiesen werden.

Vor dem sechsten bis siebten Tag ist sicherlich keine Sensitivität des Hühnerembryos vorhanden. Die sensorischen Systeme beginnen jedoch bereits in der ersten Bebrütungshälfte zu funktionieren. Nach dem Schluß der multisynaptischen Reflexbögen, der nach histologischen Befunden und funktionellen Untersuchungen um den siebten Tag erfolgt, sind zu diesem Zeitpunkt erste Reflexbewegungen auf externe Reize auszulösen, z.B. durch mechanische Hautstimulation, Hitze und Kälte. Die Hautrezeptoren für Berührung, Schmerz, Kälte und Hitze funktionieren erstmals ab dem siebten Tag, zusammen mit der Ausbildung der ersten Reflexe. Die endgültige Bildung sensorischer Neurone im Spinalganglion beginnt ebenfalls am siebten Bebrütungstag. Um den achten Tag ist der zelluläre Aufbau der anatomischen Strukturen des zentralen und des peripheren Nervensystems weitgehend abgeschlossen. Die Komple-

xität des Nervensystems nimmt vom achten bis zehnten Bebrütungstag deutlich zu.

Vestibuläre Aktivitäten (Gleichgewichts-Funktionen) waren zum Teil ab dem achten Bebrütungstag zu beobachten; jedoch gibt es hierzu widersprüchliche Befunde. Spezialisierte Reaktionen, zum Beispiel Öffnen des Schnabels, Schluß des dritten Augenlids nach Stimulation der Kornea oder Bewegungen der Augenlider nach Lichtstimulation, beginnen erst ab dem 15. Tag.

Ab dem fünften Tag (s. Abb.) besteht eine Verbindung zwischen den nervösen Strukturen der Retina und der Oberfläche des *Lobus opticus*, der für den Gesichtssinn zuständigen Gehirnanreale. Eigene Beobachtungen können Literaturangaben bestätigen, daß Lichteffekte schon ab dem neunten Tag wahrgenommen und durch aktive Bewegungen „beantwortet“ werden. Die vollständige Differenzierung der entsprechenden Areale des zentralen Nervensystems ist aber erst am 18. Tag abgeschlossen.

Da zahlreiche Untersuchungen an den extraembryonalen Blutgefäßsystemen (Dottersack-Gefäßsystem und Chorion-Allantois-Membran) durchgeführt wer-

den, ist es in diesem Zusammenhang wichtig darauf hinzuweisen, daß diese Organe – vergleichbar der Säugetier-Plazenta – selbst nicht innerviert und damit schmerzunempfindlich sind.

Eine detailliert aufgelistete, tabellarische Zusammenstellung der chronologischen Entwicklung des Hühnerembryos, basierend auf der Stadien-Einteilung von Hamburger und Hamilton (1951), findet sich im Anhang des Buches „*Development of the Avian Embryo*“ (Freeman and Vince, 1974).

### 3 Diskussion

Die Diskussionsgrundlage zur Beurteilung experimenteller Gegebenheiten des bebrüteten Vogeleies sollte eine möglichst detaillierte und allgemein akzeptierte Stadieneinteilung der Bebrütungszeit sein. Damit lassen sich strukturelle und funktionelle Sachverhalte auf der Basis einheitlicher Parameter diskutieren, beurteilen und einordnen. Für das bebrütete Hühnerei liegt eine derartige Stadieneinteilung von Hamburger und Hamilton (1951) vor. Die Akzeptanz dieser Einteilung

lung kommt u.a. dadurch zum Ausdruck, daß im Methodenteil zahlreicher Publikationen über bebrütete Hühnereier der Entwicklungsstand zum Zeitpunkt des Experimentes lediglich durch die Zahlenangabe des Stadiums („...stage X according to Hamburger & Hamilton...“) dokumentiert wird. Wenn diese Einteilung von allen Experimentatoren akzeptiert ist, dürfen methodische Merkwürdigkeiten wie zum Beispiel die Einführung eines „Bebrütungstages 0“ – um den Zeitpunkt des zehnten Bebrütungstages zu vermeiden (s. britisches Tierschutzgesetz) – nicht mehr vorkommen.

Die Darstellung der schrittweise einsetzenden Funktionsfähigkeit des Nervensystems und der damit einhergehenden Sensitivität des Embryos zeigt, daß bei den experimentellen Untersuchungen bis zum siebten Bebrütungstag keine Sensitivität des Keimlings vorliegen kann. Und selbst bei Ausdehnung der Experimente bis zum zehnten Tag ist nur von einer eingeschränkten Empfindung des Hühnerembryos auszugehen.

Die (tierschutz-)rechtliche Bewertung von Embryonen und Feten späterer Bebrütungsstadien – siehe Amtsblatt der EU (EU, 1986) – sollte jedoch auf der Basis anatomisch-physiologischer Gegebenheiten überarbeitet werden.

Für bebrütete Vogeleier ist ein Bebrütungszeitpunkt zu definieren, bis zu dem keinerlei methodische Einschränkungen bestehen. Für experimentelle Untersuchungen nach diesem Zeitpunkt ist ein stufenförmiges Modell denkbar. In diesem Modell sollten beispielsweise Untersuchungen an der nicht innervierten CAM, bei denen die Keimlinge nicht beeinträchtigt werden und der Brutvorgang unmittelbar nach Abschluß einer kurzen Experimentalphase beendet wird, positiver beurteilt werden als Infektionsversuche zum selben Bebrütungszeitpunkt. Darüberhinaus muß jedoch bei einer derartigen Neubewertung auch festgelegt werden, daß Experimente zu späteren Zeitpunkten nur dann befürwortet werden können, wenn sie nicht an einem früheren Bebrütungsstadium durchführbar sind.

Außerdem muß im Zusammenhang mit der Beurteilung der Sensitivität von Lebewesen bei experimentellen Untersuchungen festgestellt werden, daß es im Sinne eines Koordinaten-Systems der

Testmodelle (Rosenbruch, 1995) sicherlich erstrebenswert ist, bei Experimenten phylogenetisch und ontogenetisch möglichst wenig entwickelte Lebewesen einzusetzen. Im Vergleich zu Säugetieren ist somit der Einsatz von niederen Tieren vorzuziehen. Folgerichtig sind selbst Experimente an schmerzempfindlichen Vogelembryonen späterer Bebrütungsstadien hinsichtlich ihrer potentiellen Beeinträchtigung positiver zu beurteilen, als Versuche an Ratten oder Mäusen. Bezüglich der Experimente an Hühnerembryonen beziehungsweise ihren extraembryonalen Blutgefäßsystemen sollten – im Sinne des *Refinement* der 3 R (Russel and Burch, 1959) – möglichst frühe Bebrütungsstadien ohne Sensitivität eingesetzt werden, um eine Beeinträchtigung des Hühnerembryos zu vermeiden. Die Vielfältigkeit der Einsatzmöglichkeiten früher Bebrütungsstadien des Hühnereies ist dabei vergleichsweise groß (Rosenbruch, 1994).

#### Literatur

- Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Her Majesty's Stationary Office, London 1986, 1-24.
- EU (1986). Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L358/1 vom 18.12.1986. Richtlinie des Rates vom 24.11.1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedsstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.
- Freeman, B. M. and Vince, M. A. (1974). *Development of the avian embryo*. London: Chapman and Hall.
- Gerlach, L. (1887). Über neuere Methoden auf dem Gebiete der experimentellen Embryologie. *Anat. Anz.* 2, 583-609.
- Gruber, F. P. (1996). Editorial. *ALTEX* 13, 109.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92.
- Rolnik, V. V. (1970). *Bird embryology* (translated from Russian). Leningrad 1968, Jerusalem: Israel Program for Scientific Translations.
- Rosenbruch, M. (1994). Frühe Entwicklungsstadien des bebrüteten Hühnereies als Modell in der experimentellen Biologie und Medizin. *ALTEX* 11, 199-206.
- Rosenbruch, M. (1995). Die vergleichende Pathologie in der Risikobewertung. *Zbl. Pathol.* 140, 409-414.
- Russel, W. M. S. and Burch R. L. (1959). *Principles of human experimental technique*. London: Methuen.
- TierSchG. (1993). Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland. Neufassung des Gesetzes vom Januar 1993. *Bundesgesetzblatt Teil I*, 254-265 vom 26. Februar 1993.

#### Korrespondenzadresse

PD Dr. M. Rosenbruch  
Bayer AG - Tox. Pathologie  
Postfach 101709  
D-42096 Wuppertal