

# Frühe Entwicklungsstadien des bebrüteten Hühnereies als Modell in der experimentellen Biologie und Medizin

Martin Rosenbruch

BAYER AG, D-Wuppertal

## Zusammenfassung

Die frühen Entwicklungsstadien des bebrüteten Hühnereies (ca. erstes Drittel der Brutdauer) werden als Modell der experimentell-biologischen sowie -medizinischen Forschung dargestellt. Nach einer kurzen anatomisch-embryologischen Einführung werden einige Hinweise zur experimentellen Methodik gegeben (Applikation von Substanzen, Auswertung). Anwendungsmöglichkeiten des Modells sind Fragestellungen zur Ermittlung der Reizwirkung von Prüfsubstanzen, zu angiogenetischen Prozessen, Aspekte der Tumorbiologie sowie Untersuchungen zur Wirkung von Schwermetallen. Weiterhin können schon am vier Tage bebrüteten Ei funktionelle, kardio-vaskuläre Parameter und deren Veränderung durch bestimmte Pharmaka gemessen werden. Abschließend werden die Möglichkeiten und Grenzen dieses Modells diskutiert. Dabei ist zu betonen, daß es sich innerhalb des ersten Drittels der Bebrütungszeit um ein System ohne jegliches Schmerzempfinden handelt. Damit ist dieses Modell – im Gegensatz zu anderen Hühnerei-Modellen – als echte Alternative zum Tierversuch zu werten.

*Summary: Early stages of the incubated chicken egg as a model in experimental biology and medicine*

Early stages of the incubated chicken egg (appr. first third of the incubation period) are demonstrated as a model of experimental research in biology and medicine. Following a short introduction on anatomy and embryology, some advices on experimental methodology are given (application of test substances, evaluation). The application of this model is shown in several examples: as an alternative of animal experiments in ocular and mucosal toxicity, to study angiogenesis, aspects of tumor biology, or the effects of heavy metals. Furthermore, incubated eggs at day 4 of incubation can be used to investigate functional parameters of the cardiovascular system and effects of drugs on this system. Finally, the possibilities and the limitations of the test-system are discussed. It has to be pointed out that this system works in a period of incubation without any sensitivity of the embryo. Therefore, the test-system using early stages of the incubated egg – in contrast to other chicken egg models – is a real alternative to animal experiments.

*Keywords: chicken embryo, cardio-vascular system, Draize-test alternative, angiogenesis, tumor*

## 1. Einleitung

Die Erforschung, Entwicklung und Anwendung sogenannter Alternativmethoden zum Tierversuch werden von der Tierschutzgesetzgebung zahlreicher Länder, wie auch vom deutschen Tierschutzgesetz gefordert bzw. vorgeschrieben.

Eines der schon sehr lange eingesetzten Modelle der experimentellen Biologie und Medizin ist das bebrütete Hühnerei. Untersuchungsergebnisse unter Verwendung dieses Testsystems als teratologisches Modell existieren seit weit über 100 Jahren

(Dareste, 1877), und bereits 1887 schlug Gerlach vor „... eine Reihe von chemischen Agenzien, insbesondere Gifte ..., daraufhin zu prüfen, ob und wie sie die Embryonalentwicklung des Hühnerkeimlings alterieren“.

Als Hinweis auf den Stellenwert dieses Modells in der experimentellen Forschung ist darüber hinaus zu werten, daß die „New York Academy of Sciences“ im Jahre 1951 eine Konferenz zum Thema „The Chick Embryo in Biological Research“ abhielt, die als Band 55 ihrer Publikationsreihe veröffentlicht wurde.

Sehr weit verbreitet ist besonders die Chorio-Allantois-Membran (CAM) des bebrüteten Hühnereies als System zur Viruszüchtung und Diagnostik (Mayr et al., 1974).

In den letzten 10–15 Jahren sind vermehrt experimentelle Ansätze zum Einsatz des bebrüteten Hühnereies entwickelt worden, besonders als Alternative zum Draize-Test am Kaninchenaugen (Künstler et al., 1986; Leighton et al., 1985; Lüpke, 1985). Bei diesen Experimenten werden Eier verwendet, die die Hälfte der Bebrütungszeit erreicht oder überschritten haben. Diese Bebrü-

tungsstadien fallen nach dem deutschen Tierschutzgesetz nicht unter die genehmigungspflichtigen Experimente, sie gelten aber wegen ihres Entwicklungsgrades nach dem britischen Tierschutzgesetz als geschützte Tiere.

Experimentelle Untersuchungen am bebrüteten Hühnerei sind jedoch schon zu früheren Zeitpunkten der Bebrütung möglich und liefern Ergebnisse wie zu späteren Entwicklungsstadien. Deshalb sind wissenschaftliche Arbeitsgruppen verschiedenster Disziplinen in den letzten Jahren vermehrt dazu übergegangen, bebrütete Hühnereier während der ersten Hälfte der Entwicklungszeit als Testobjekte einzusetzen. In dieser Übersichtsarbeit werden einführend einige grundlegende Aspekte der Anatomie und Embryologie des Hühnerkeimlings dargestellt sowie anschließend einige Details zur Methodik des Modells. Anhand von Beispielen aus verschiedensten Bereichen der experimentell-biologischen bzw. -medizinischen Forschung werden Einsatzmöglichkeiten des Modells aufgezeigt.

## 2. Anatomie – Embryologie

(Freeman und Vince, 1974; Rolnik, 1970)

Im bebrüteten Hühnerei sieht man nach der Eröffnung am 2. Bebrütungstag auf dem Dotter den Embryonalknoten, aus dem sich später der Keimling entwickelt. In diesem Zeitraum beginnt die Entwicklung extraembryonalen Gewebes, das zum Dottersack-Gefäßsystem (DGS) wird. Das DGS und die CAM entsprechen den Eihäuten der Säugetiere und sind für die Versorgung des Keimlings mit Sauerstoff und Nährstoffen verantwortlich.

### 2.1 Herz-Kreislauf-System

Die initiale Herztätigkeit des Keimlings ist am 2. Tag zu beobachten; der Blutfluß beginnt zwischen der 50. und 55. Stunde (Rychter et al., 1955). Anfangs handelt es sich um einen Herzschlauch, jedoch schon

am 4. Tag hat sich ein gekammertes Herz entwickelt.

Das extraembryonale Gefäßsystem entsteht aus sogenannten „Blutinseln“, die sich ausdehnen und die *area vasculosa* bilden. Am 4. Tag hat sich eine aus Keimling und umgebendem DGS bestehende Einheit gebildet, die vom *sinus terminalis*, der großen Randvene, begrenzt wird (Abbildung 1). Ausgehend vom Keimling verzweigen sich die Blutgefäße baumartig nach rechts und links, und bei Beobachtung mit dem Auflichtmikroskop kann man bei höherer Vergrößerung arterielle und venöse Gefäße anhand des gegenläufigen sowie des pulsierenden bzw. kontinuierlichen Blutflusses unterscheiden. Als Respirationsorgan fungiert das DGS bis zum 5. Bebrütungstag allein und bis zum 10. Tag zusammen mit der Allantois (Rolnik, 1970).

### 2.2 Nervensystem

Am dritten Tag sind im vorderen Kopfbereich die drei Gehirnbälchen bereits makroskopisch erkennbar. Sie sind in Relation zum übrigen Keimling sowie zur späteren Dimension des Hühnerkopfes vergleichsweise groß. Hinsichtlich der Funktion des Nervensystems ist bekannt, daß der Schluß der multisynaptischen Reflexbögen nicht vor dem 7. Tag erfolgt (Windle und Orr, 1934), ungefähr zeitgleich mit ersten Reaktionen des Keimlings auf Berührung, Schmerz, Kälte und Hitze (Chumak,

1961). Die extraembryonalen Gefäßsysteme (DGS und CAM) sind, wie die Plazenta der Säugetiere, nicht innerviert.

### 2.3 Immunsystem

Eine zusammenfassende, sehr informative Darstellung der frühen Entwicklung des aviären Immunsystems wurde 1981 von Seto veröffentlicht. Die im folgenden geschilderten Gegebenheiten basieren auf dieser Arbeit, wobei die dort zitierte Literatur nicht einzeln ausgewiesen ist.

Während der Embryonal-Entwicklung ist der Dottersack das bestimmende Organ der Hämatopoese. Tritium markierte Dottersackzellen werden später in Thymus und Bursa Fabricii gefunden. Dies weist darauf hin, daß der Dottersack als Quelle der jeweiligen Vorläuferzellen anzusehen ist. Der Thymus und die Bursa differenzieren sich um den 5. Tag; der Thymus aus der 3. und 4. Schlundtasche, die Bursa aus einer Einstülpung des Enddarmes. Erste Lymphozyten treten ab dem 10. (Thymus) bis 14. (Bursa) Bebrütungstag auf, und einige Tage danach beginnt die Thymusaktivität in der Lymphozytopoese, der Erythro- und der Myelopoese. Die Ur-Milz ist bereits am 4. Tag nachweisbar, und ab dem 11. Tag ist sie in die Erythro- und Granulozytopoese eingebunden. Erst kurz vor dem Schlupf wird sie zum lymphoiden Organ, das dann hauptsächlich Lymphozyten und

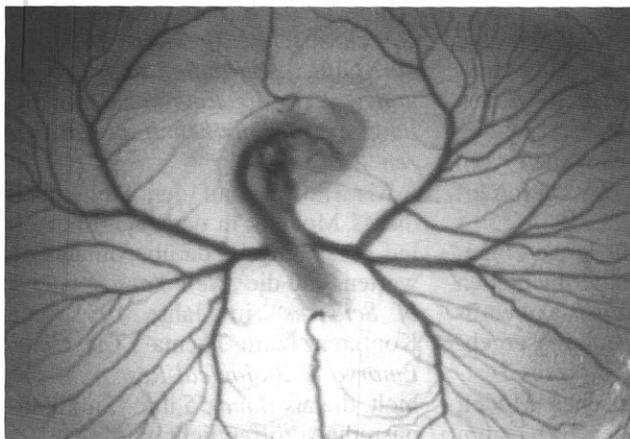


Abbildung 1: Normal entwickelter Hühnerembryo am 4. Bebrütungstag mit umgebendem Dottersack-Gefäßsystem.

Monozyten produziert. Weiterhin fungieren mobile Populationen leukozytärer und monozytärer Zellen als unspezifische Immunabwehr.

## 2.4 Weitere Organe

Ab dem 3. Tag sind Leber, Pankreas und Anlagen des Magen-Darm-Traktes erkennbar (Huettner, 1949). Die in den Lebersinusoiden lokalisierten Vorläufer der Kupfferschen Sternzellen sind schon am 4.–5. Tag zur Phagozytose befähigt, nachweisbar durch Tuschespeicherung nach intravaskulärer Injektion (Rosenbruch, 1985; Abbildung 2). In der Niere sind histologisch schon relativ früh Glomerula und Tubuli zu differenzieren. Die ersten Geschlechtszellen (*primordial germ cells*) entstammen dem Dottersack und gelangen nach zwischenzeitlicher Zirkulation im Blut in den Embryo (Nakamura et al., 1988).

## 3. Experimentelle Methodik

### 3.1 Versuchseier

Die bei experimentellen Untersuchungen einzusetzenden Eier sollten möglichst einer kontrollierten SPF-Haltung entstammen, damit – analog zu Versuchstieren – ein definiert mikrobiologischer Status gewährleistet ist. Anderenfalls können Kontaminationen zur Beeinträchtigung bzw. zur Variabilität und Unvergleichbarkeit von Versuchsergebnissen führen. Eine optimale präexperimentelle Behandlung der Eier schließt eine kühle Lagerung ein, eventuell in einem Kühlbrutschrank. Damit werden, bei aller biologischen Variabilität, sowohl die normale als auch die gleichartige Entwicklung der Keimlinge und der extraembryonalen Gefäßsysteme sichergestellt.

### 3.2 Applikation von Testsubstanzen

Um das Testsystem des bebrüteten Hühnereies in frühen Entwicklungsstadien gegenüber den Testsubstanzen zu exponieren, bestehen verschiedene Applikationsmöglichkeiten am eröffneten und am uneröffneten Ei.

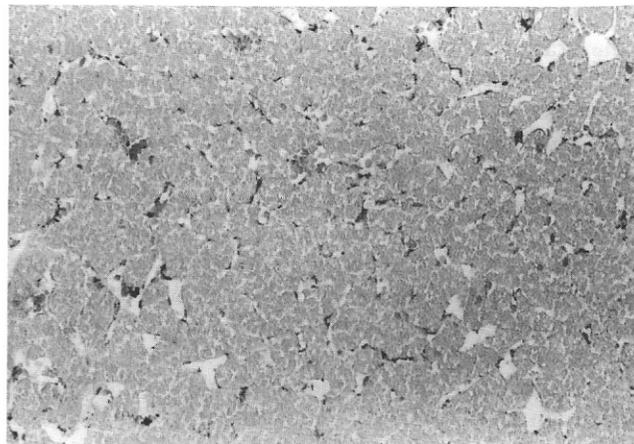


Abbildung 2: Speicherung intravasculär applizierter Tuscheartikeln in den Vorläuferzellen der Kupfferschen Sternzellen (Eosinfärbung, Obj.-Vergr. 10x).

Einmal kann das Brutschrankmilieu durch gasförmige Prüfsubstanzen angereichert werden, oder die Schalenoberfläche wird behandelt, so daß sich ein „quasi-Inhalationsversuch“ ergibt. Weiterhin können in unterschiedliche Kompartimente des Eies (Luftkammer, Eiklar, Dotter) lösliche Stoffe injiziert werden. Damit lassen sich auch Untersuchungen zur Kinetik der Substanz im Brutprozeß durchführen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, nach Eröffnung des Eies Testsubstanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in oder auf die verschiedenen Anteile der Keimscheibe (z.B. Keimling, DGS, Amnion, Allantois) zu applizieren. Abschließend ist die Methode der intravaskulären Injektion löslicher Stoffe zu nennen, die jedoch – im Gegensatz zu den vorher genannten Methoden – bestimmter apparativer Voraussetzungen und einer gewissen Einarbeitung bedarf.

### 3.3 Auswertung

In die Auswertung von Experimenten an frühen Stadien des bebrüteten Hühnereies können sehr unterschiedliche Parameter einbezogen werden. Im Hinblick auf toxikologische Untersuchungen bieten sich als Endpunkte einmal Mortalitäts-Studien an, darüber hinaus können jedoch auch morphologische (makroskopisch und mikroskopisch) und funktionelle Parameter berücksichtigt werden. Die jeweils besten Auswertungskriterien sind im Zusammenhang mit der aktuel-

len Fragestellung eines Experimentes festzulegen und sollen hier anhand der Beispiele im nächsten Kapitel besprochen werden.

## 4. Anwendungsbeispiele

### 4.1 Reizwirkung (Draize-Test-Ersatz)

Erste Untersuchungen zu Reaktionen extraembryonaler Gefäßsysteme auf die Applikation reizender Substanzen wurden bereits Mitte der 50er Jahre durchgeführt (Voss und Henneberg, 1957). Seit ca. 10 Jahren sind Tests an der CAM zwischen dem 10. und 14. Bebrütungstag besonders im Hinblick auf den Ersatz des Draize-Testes am Kaninchenauge entwickelt worden (Künstler et al., 1986; Leighton et al., 1985; Lüpke, 1985). Ein laborübergreifender Validierungsversuch wurde hierzu vom Bundesgesundheitsamt koordiniert (Spielmann et al., 1993).

Durch Untersuchungen mit verschiedenen Substanzen am DGS war jedoch nachzuweisen, daß auch 4 Tage bebrütete Hühnereier mit sehr guten Ergebnissen für diese Versuche eingesetzt werden können (Holst, 1988; Rosenbruch und Holst, 1990a,b).

An der CAM wie am DGS kommt es substanz- und dosisabhängig zu einer Kapillarhyperämie, zu Blutungen oder zu Koagulationen im Bereich der betroffenen Gefäße. Die Experimente am DGS haben dabei

einmal methodische Vorteile gegenüber der CAM, denn die präexperimentelle Bebrütungszeit ist wesentlich kürzer (4 Tage gegenüber mindestens 10 Tagen), und durch die Absenkung der Keimscheibe vor der Eiöffnung lassen sich präparationsbedingte Artefakte vermeiden. Da die Prüfschubstanz nur auf eine Hälfte des DGS aufgebracht wird, hat man als weiteren Vorteil in jedem Ei ein Kontrollareal. Außerdem ist das Nervensystem des Keimlings zum Zeitpunkt der Untersuchungen am DGS noch nicht funktionsfähig – im Gegensatz zu späteren Experimenten.

#### 4.2 Repair-Mechanismen / Angiogenese

Nach fokaler Schädigung der extraembryonalen Blutgefäße, z.B. Blutungen, wie sie im Rahmen der Untersuchungen zur Schleimhaut-Toxizität auftreten, kommt es am extraembryonalen Gewebe des DGS zu Reparationsprozessen. Innerhalb von 2–3 Tagen bilden sich im Bereich der geschädigten Gefäße schon makroskopisch sichtbare Reaktionsknötchen, die von einem radiären Kranz neugebildeter Gefäße umgeben sind (Abbildung 3).

Durch mikromorphologische Untersuchungen läßt sich eine für derart frühe Entwicklungsstadien überraschend große Reaktionsfähigkeit dokumentieren (Rosenbruch, 1989).

Es zeigt sich, daß auch an diesen Präparaten alle Methoden histologischer Darstellungstechnik anzuwenden sind, wie z.B. Histochemie und Elektronenmikroskopie. In diesen Reaktionsknötchen sind Phagozytose-Prozesse sowie eine durch Angioblasten-Proliferation charakterisierte Angiogenese nachweisbar. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie lassen sich Kollagenfasern darstellen, die, wie auch bei onto- und phylogenetisch höher entwickelten Lebewesen, eine typische Periodizität aufweisen.

Diese Befunde zeigen die differenzierten Pathomechanismen, die schon während des ersten Drittels der Bebrütungszeit induziert werden können. Wie an der CAM (Thomp-

son et al., 1986), sind auch am DGS Tests zu Aspekten der Wundheilung sowie der inhibitorischen oder proliferativen Beeinflussung der Angiogenese denkbar. Dies macht deutlich, daß das System des DGS als Modell für Angiogenese-Studien prädestiniert ist, zumal – im Gegensatz zu späteren Entwicklungsstadien – der Keimling in die Auswertungen einbezogen werden kann.

#### 4.3 Tumor-Biologie

Erste Untersuchungen am Modell des Hühnereies zu Aspekten der Tumorbiologie wurden von Rous und Murphy bereits 1911 und 1912 veröffentlicht. Innerhalb der letzten 20 Jahre arbeitete die Gruppe um Judah Folkman von der Harvard University viel mit diesem Modell (Ausprunk et al., 1975; Folkman, 1985).

Zur Untersuchung der Interaktionen von Tumor und Anteilen des Hühnereies (Keimling, extraembryonale Gefäße) werden jedoch vorwiegend spätere Entwicklungsstadien eingesetzt (Armstrong et al., 1982; Chambers et al., 1982; Isiwata et al., 1988; Schroyens et al., 1989). Aber auch bei onkologischen Fragestellungen können frühere Entwicklungsstadien des bebrüteten Hühnereies verwendet werden (Abbildung 4; Vervoorts et al., 1994). Die Tumorzellen, als Zellsuspension oder in Form kleinerer Gewebekonglomerate werden am 3. bzw. 4. Bebrütungstag z.B. auf das DGS appliziert. Bis zu 5 Tagen nach Inokulation der

Zellen können Befunde erhoben werden. Ein methodischer Vorteil dieser frühen Stadien ist dabei, daß z.B. Metastasierungs-effekte im Keimling einer direkten Beobachtung zugänglich sind. Als weitere experimentelle Möglichkeit bietet sich auch für diese Fragestellungen die intravenöse Injektion von Tumorzellen an.

Außer der Tumor assoziierten Angiogenese können an frühen Stadien des Hühnerkeimlings als zusätzliche Auswertungskriterien der experimentell applizierten Tumorzellen auch Organotropien, Metastisierungsmuster oder Effekte auf bestimmte Gewebe, z.B. die Haut (Kato und Charoensiri, 1989), durch histologische Methoden ermittelt werden. Damit sind Hinweise für diagnostische und/oder therapeutische Ansätze – auch in der Humanmedizin – denkbar (Shoin et al., 1991).

In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, daß außer Tumorzelllinien auch Hybridomzellen in frühen Stadien des bebrüteten Hühnereies kultiviert werden können. Damit ist dieses Testsystem auch zur Produktion monoklonaler Antikörper geeignet (Hlinak et al., 1994).

#### 4.4 Schwermetall-Wirkungen

Bereits Birge und Roberts (1976) haben eine ausführliche Zusammenstellung zur Wirkung von Schwermetallen am bebrüteten Hühnerkeimling publiziert. Hier waren jedoch die Schlupfrate bzw. der Anteil teratologisch veränderter Keimlinge bzw.

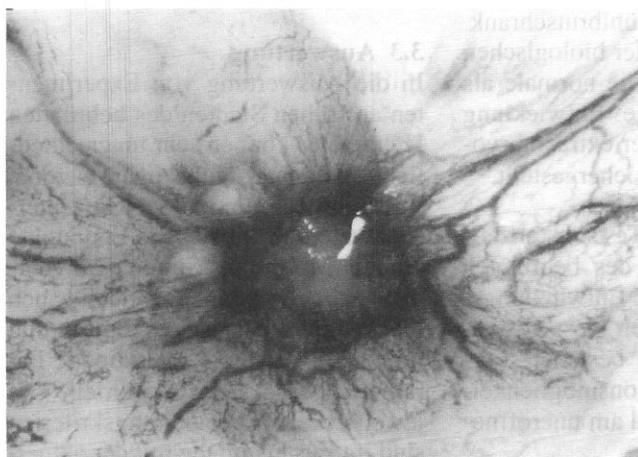


Abbildung 3: Reaktionsknötchen in Dottersack-Gefäßsystem mit radiärer Angiogenese.

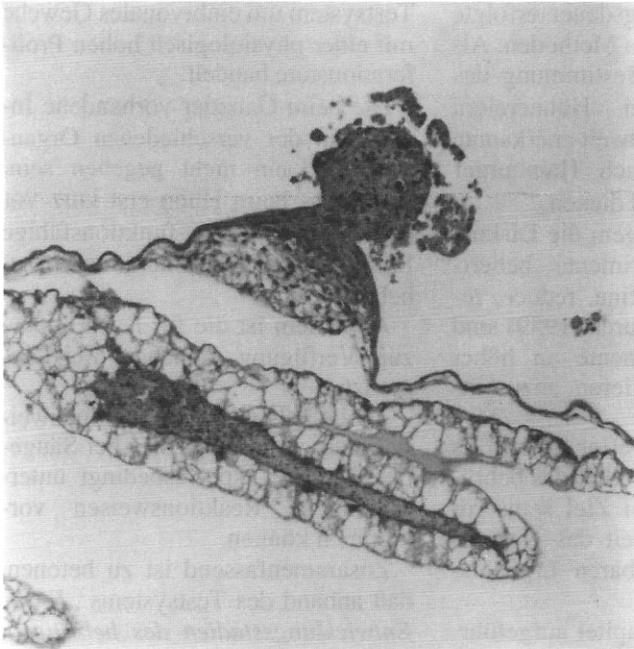


Abbildung 4: Auf das Dottersack-Gefäßsystem applizierte Tumorzellen bilden mit reaktivem Gewebe ein Knötchen; perifokal Ödematisierung der Dottersackmembran und Angiogenese.

schiedlicher, kardiovaskulär wirksamer Pharmaka erzielt werden. So zeigte sich nach Adrenalin-Injektionen (Suprarenin®) ein dosisabhängiger Anstieg der Herzfrequenz, nach Applikation von Metoprolol ( $\beta$ -Blocker, Beloc®) eine Abnahme der Herzfrequenz (Abbildung 5; Kniepen, 1992; Rosenbruch et al., 1993). Die Injektion gleicher Mengen NaCl-Lösung hatte keine Auswirkungen auf die Herzrhythmicität. Die Adrenalin-Applikation führte darüber hinaus zu einer deutlich höheren Arrhythmie-Rate des Keimlingsherzens.

Die direkte Tropf-Applikation einer 0.1M Nikotin-Lösung induzierte am DGS schon nach 30 Sekunden eine ausgeprägte Kapillar-Hyperämie, gefolgt von fokalen, auch im Keimling nachweisbaren Blutungen (Rosenbruch et al., 1993). Nach wiederholter Verabreichung einer 0.01M Nikotin-Lösung waren zur Hälfte der Bebrütungszeit – im Vergleich zur Kontrollgruppe – deutlich reduzierte Keimlingsgewichte nachweisbar, ein aus dem humanmedizinischen Schrifttum bekannter Befund.

Aufgrund der experimentellen Möglichkeiten und dieser Ergebnisse kann das Testsystem des Hühnereies in der ersten Hälfte der Bebrütungszeit sicherlich auch als *screening* Modell bei der Forschung und Entwicklung kreislauf-aktiver Pharmaka eingesetzt werden.

#### 4.6 Phototoxizität

Auch zur Untersuchung der Phototoxizität sind frühe Entwicklungsstadien des bebrüteten Hühnereies erfolg-

Küken die bestimmenden Auswertungsparameter. Aber auch bei Beschränkung der Versuchsdauer auf das erste Drittel der Bebrütungszeit lassen sich mit unterschiedlichen Schwermetall-Verbindungen (Cadmium, Vanadium, Nickel) typische und dosisabhängige Effekte nachweisen (Baumann, 1984; Kurz, 1985; Pfeffer, 1984; Rosenbruch et al., 1988).

Es kommt zu einer Steigerung der Keimlingsmortalität und bei überlebenden Keimlingen u.a. zu Rarefizierungen des DGS und morphologischen Veränderungen der Gliedmaßen. Durch diese Experimente, einschließlich weitergehender Untersuchungen sind Rückschlüsse auf Schädigungsmechanismen der Testsubstanzen möglich. Bei Applikation auf das DGS kann auch hier eine Hälfte des Gefäßsystems als interne Kontrolle dienen.

#### 4.5 Kardiovaskulär aktive Substanzen

Wegen des einfachen Zuganges bietet sich die „kardiovaskuläre Funktionseinheit embryonales Herz und extraembryonales DGS“ als Testsystem zur Untersuchung von Substanzen mit vermuteter Herz-Kreislauf-Aktivität an. Nach Absenkung der

Keimscheibe und Eröffnung des Eies sind sie der experimentellen Manipulation und der makroskopischen wie mikroskopischen Beobachtung direkt zugänglich.

Testsubstanzen können direkt auf das Herz bzw. das DGS appliziert werden, und ab dem 4. Tag besteht die Möglichkeit der intravaskulären Injektion löslicher Stoffe in Gefäße des DGS. Schon Anfang dieses Jahrhunderts wurde beispielsweise Adrenalin im Testsystem bebrütetes Hühnerei getestet (Langley, 1905), und zahlreiche Untersucher verfolgten in den nächsten Jahrzehnten diesen experimentellen Weg weiter (Literatur bei Kniepen, 1992). Mit der intravenösen Injektion konnten sehr gut reproduzierbare Ergebnisse über rezeptorabhängige Wirkungen unter-

	NaCl.-Lsg.	Adrenalin	$\beta$ -Blocker
Herzfrequenz	—	↑	↓
Arrhythmien	—	↑	—

Abbildung 5: Veränderungen von Kreislaufparametern 4 Tage alter Hühnerembryos nach i.v.-Applikation (nach Kniepen, 1992).

reich als Testsystem eingesetzt worden (Hölzle et al., 1992). Die Testsubstanzen werden auf das DGS appliziert, unmittelbar anschließend erfolgt die Exposition gegenüber einer definierten Dosis UVA-Strahlung. Über die folgenden 48 Stunden werden Veränderungen am DGS und Effekte auf die Vitalität der Keimlinge untersucht. Einmal kann das Modell auch hier als *screening* Test bei Substanzen mit vermuteter phototoxischer Aktivität eingesetzt werden. Weiterhin lassen sich mechanistische Fragestellungen im Zusammenhang mit diesen Effekten an einem isolierten, gut zugänglichen Blutgefäßsystem untersuchen.

## 5. Diskussion

Vor dem Hintergrund einer zunehmenden Zahl experimenteller Untersuchungen zur Wirkung verschiedener Substanzen einerseits und aufwendiger administrativer Voraussetzungen zur Genehmigung von Tierexperimenten andererseits ist es notwendig, über Testsysteme zu verfügen, die schnell verfügbar sind und zuverlässige Ergebnisse liefern. Ein solches Modell ist das bebrütete Hühnerei.

Das Modell wird seit weit mehr als 100 Jahren kontinuierlich in der experimentellen Forschung eingesetzt. Aus früherer Zeit liegen besonders zu teratologischen Fragestellungen zahlreiche Daten vor, so daß Goerttler (1962) vom „*teratologischen Grundversuch am bebrüteten Hühnchenkeim*“ spricht.

Neben den teratologischen Befunden zum Ende der Bebrütungszeit waren die Auswertungsparameter häufig Schlupf- bzw. Mortalitätsraten der Küken.

Bei den in letzter Zeit als sogenannte Alternativen zum Tierversuch (z.B. Draize-Test) entwickelten und publizierten Methoden handelt es sich fast immer um CAM-Modelle mit einer Inkubationsdauer bis zu 14 Tagen (Künstler et al., 1986; Leighton et al., 1985; Lüpke, 1985; Spielmann et al., 1993). Die Bestim-

mung der Bebrütungsdauer erfolgte oft mit verschiedenen Methoden. Als Grundlage für die Bestimmung des Brutzeitpunktes bei Hühnereiern sollte immer die weltweit anerkannte Stadieneinteilung nach Hamburger und Hamilton (1951) dienen.

Die schon seit langem die Diskussion um Tierexperimente beherrschenden „3 R“ (refine, reduce, replace; Russel und Burch, 1959) sind einmal auf Experimente an höher entwickelten Säugetieren anzuwenden.

Im Sinne des „refine“ muß es jedoch auch beim Modell des bebrüteten Hühnereies ein Ziel sein, vor der Funktionsfähigkeit des Nervensystems zu verwertbaren Ergebnissen zu kommen.

Die im vorigen Kapitel aufgeführten Beispiele aus sehr unterschiedlichen Bereichen biologisch-medizinischer Forschung machen deutlich, daß dies schon jetzt vielfach möglich ist.

Die frühen Entwicklungsstadien des bebrüteten Hühnereies nehmen als Testsystem eine Mittelstellung zwischen *in vitro* und *in vivo* Systemen ein. Aufgrund der geschilderten morphologischen und funktionellen Voraussetzungen handelt es sich um ein lebendes, jedoch schmerzempfindliches Testsystem.

Wegen der anatomisch-physiologischen Gegebenheiten eignet sich besonders das Herz-Kreislauf-System, d.h. das Keimlingsherz mit angeschlossenen Dottersack-Gefäßsystem für experimentelle Tests. Gegenüber späteren Stadien ist die Präparation einfacher und artefaktfreier durchzuführen. Wegen der kürzeren Bebrütungszeit und der somit schneller vorliegenden Ergebnisse sollten auch unter dem Gesichtspunkt „Zeit“ frühere Entwicklungsstadien verwendet werden.

Selbstverständlich müssen in diesem Zusammenhang auch die Grenzen des Modells angesprochen werden.

Bei der Bewertung der Ergebnisse und der Diskussion ihrer Relevanz ist zu bedenken, daß es sich bei dem

Testsystem um embryonales Gewebe mit einer physiologisch hohen Proliferationsrate handelt.

Die beim Ganztier vorhandene Interaktion der verschiedenen Organsysteme kann nicht gegeben sein, wobei das beim Huhn erst kurz vor dem Schlupf voll funktionsfähige Immunsystem besonders hervorzuheben ist.

Außerdem ist die für Experimente zur Verfügung stehende Zeit begrenzt.

Abschließend ist darauf hinzuweisen, daß – allerdings wie bei Säugetieren auch – speziesbedingt unterschiedliche Reaktionsweisen vorkommen können.

Zusammenfassend ist zu betonen, daß anhand des Testsystems „*Frühe Entwicklungsstadien des bebrüteten Hühnereies*“ zahlreiche experimentelle Befunde und Daten zu unterschiedlichen Endpunkten erhoben werden können.

Das Modell sollte deshalb möglichst weitgehend bei toxikologischen Fragestellungen, der Herz-Kreislauf-Forschung oder der Tumor-Biologie eingesetzt werden.

Jedoch ist kaum zu erwarten, daß durch die vermehrte Anwendung dieses Modells die nur auf *in vitro* Daten basierende „*Zukünftige Strategie für toxikologische Tests*“ in naher Zukunft realisiert wird (Frazier und Goldberg, 1990).

Abschließend ist als weitere bedeutende Verwendungsmöglichkeit dieses Modells die Lehre zu nennen, z.B. in den Studiengängen Biologie, Medizin, Tiermedizin oder auch in den Oberstufenjahrgängen des Gymnasiums.

Bei selbständigen experimentellen Arbeiten von Studenten oder unter Verwendung einer Video-Anlage können in den Fächern Physiologie, Pharmakologie, Toxikologie und Pathologie sehr einfach und sehr gut die Wirkungen von Pharmaka oder Schadstoffen sowie die Reaktionen des Testsystems anschaulich demonstriert werden.

**Literatur**

- ANIMALS (Scientific Procedures) ACT (1986). Her Majesty's Stationary Office, London, S. 1–24.
- Armstrong, P. B., Quigley, J. P. und Sidebottom, E. (1982). Transepithelial invasion and intramesenchymal infiltration of the chick embryo chorioallantois by tumor cell lines. *Cancer Res.* 42, 1826–1837.
- Ausprunk, D. H., Knighton, D. R. und Folkman, J. (1975). Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. *Amer. J. Pathol.* 79, 597–618.
- Baumann, L. (1984). Die Wirkung von Cadmiumchlorid auf das extraembryonale Gefäßsystem des Hühnerembryos zwischen dem 3. und 8. Bebrütungstag. Dissertation, Universität Düsseldorf, Medizinische Fakultät.
- Birge, W. J. und Roberts, O. W. (1976). Toxicity of metals to chick embryos. *Bull. Environm. Cont. Toxicol.* 16, 319–324.
- Chambers, A. F., Shafir, R. und Ling, V. (1982). A model system for studying metastasis using the embryonic chick. *Cancer Res.* 42, 4018–4025.
- Chumak, V. I. (1961). Dinamika reflektornykh reaktzii i vkluchenie retseptornykh apparatov u embriona kuritsy (Dynamics of reflex reactions and initiation of receptor systems in the chick embryo). In Sbornik, (Hrsg.) *Voprosy fiziologii i patologii tsentral'noi nervnoi sistemy cheloveka i zhivotnykh v ontogeneze* (63). Moskva. (zit. nach Rolnik)
- Darreste, C. (1877). Recherches sur la production artificielle des monstruosités ou essais de teratogénie expérimentale. In C. Reinwald. Paris. (zit. nach Collins, T. F. X. (1987). *Environm. Health Persp.* 72, 237–249.)
- Folkman, J. (1985). Tumor angiogenesis. *Adv. Can. Res.* 43, 175–203.
- Frazier, J. M. und Goldberg, A. M. (1990). Alternatives to and reduction of animal use in biomedical research, education, and testing. *Cancer Bull.* 42, 238–245.
- Freeman, B. M. und 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.
- Goertler, K. (1962). Der „teratologische Grundversuch“ am bebrüteten Hühnchenkeim, seine Möglichkeiten und Grenzen. *Klin. Wschr.* 40, 809.
- Hamburger, V. und Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49–92.
- Hlinak, A., Marx, U. und Jäger, V. (1994). Experimentale zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern über das Hühnerkeim. *ALTEX* 11, 2, 85–91.
- Holst, A. (1988). Untersuchungen zur Reaktion des Dottersackgefäßsystems des Hühnerkeimlings nach Einwirkung irritativer Substanzen bis zum 7. Bebrütungstag. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Hölzle, E., Neumann, N. J., Klaučić, A., Lehmann, P., Rosenbruch, M. und Plewig G. (1992). The photo hen's egg test – a new model for phototoxicity. *Arch. Dermatol. Res.* 284, 41.
- Huettner, A. F. (1949). *Fundamentals of comparative embryology of the vertebrates*. New York: MacMillan.
- Ishiwata, I., Ishiwata, C., Soma, M., Ono, I., Nakaguchi, T. und Ishikawa, H. (1988). Tumor angiogenic activity of gynecologic tumor cell lines on the chorioallantoic membrane. *Gyn. Oncol.* 29, 87–93.
- Katoh, A. und Charoensiri, S. (1989). Cellular events during invasion by tumor cells of chick embryo skin. *Anticancer Res.* 9, 125–128.
- Kniepen, J. (1992). Intravasale Injektionen kardio-vaskulär wirksamer Pharmaka in das Dottersack-Gefäßsystem 4 Tage alter Hühnerkeimlinge. Dissertation, Universität Düsseldorf, Medizinische Fakultät.
- Künstler, K., Bartnik, F., Holtmann, W., Lüpke, N.-P. und Wallat, S. (1986). Validierung von Ersatzmethoden für Tierversuche zur Prüfung auf lokale Verträglichkeit. In Bundesminister für Forschung und Technologie (Hrsg.), *Ersatzmethoden zum Tierversuch* (223–252). Bonn: BMFT.
- Kurz, A. (1985). Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Vanadiumionen auf die Entwicklung des extraembryonalen Dottersackgefäßsystems bei Hühnerkeimlingen vom 3.–7. Bebrütungstag. Dissertation, Düsseldorf, Medizinische Fakultät.
- Langley, J. N. (1905). On the reaction of cell and nervendings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and curari. *J. Physiol.* 33, 374–413.
- Leighton, J., Nassauer, J. und Tchao, R. (1985). The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. *Food Chem. Toxicol.* 23, 293–298.
- Lüpke, N. P. (1985). Hen's egg chorioallantoic membrane test of irritation potential. *Food Chem. Toxicol.* 23, 287–291.
- Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B. und Wittmann G. (1974). *Virologische Arbeitsmethoden Bd. 1*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Murphy, J. B. (1912). Transplantability of malignant tumors to the embryos of a foreign species. *J. Amer. Med. Ass.* 59, 871–875.
- Nakamura, M., Kuwana T., Miyayama Y. und Fujimoto, T. (1988). Extragonial distribution of primordial germ cells in the early chick embryo. *Anat. Rec.* 222, 90–94.
- Pfeffer, G. (1984). Experimentelle Untersuchungen zur Überlebenszeit von Hühnerkeimlingen nach Injektion von Nickelchlorid in das Dottersackgefäßsystem. Dissertation, Universität Düsseldorf, Medizinische Fakultät.
- Rawles, M. E. und Karnofsky D. A. (1952). The chick embryo in biological research. *N.Y. Acad. Sci.* 55, 337–344.
- Rolnik, V. V. (1970). Bird embryology (translated from Russian). Israel Program for Scientific Translations: Leningrad 1968, Jerusalem 1970.
- Rosenbruch, M. (1985). Unveröffentlichte Ergebnisse.
- Rosenbruch, M. (1989). Granulation tissue in the chick embryo yolk sac blood vessel system. *J. Comp. Pathol.* 101, 363–373
- Rosenbruch, M. und Holst A. (1990a). Zur toxikologischen Bewertung hautreizender Beton-Erstarrungsbeschleuniger aus dem Tunnelbau. *Verh. Dsch. Ges. Arb. Med.* 29, 177–181.
- Rosenbruch, M. und Holst A. (1990b). The chick embryo yolk sac blood

# Mikroben

unentbehrlich und gefürchtet



272 Seiten,  
gebunden, 27 Abb.  
DM 48,-/öS 375,-/sFr 49,40  
ISBN 3-86025-199-6

## Mikroben und Menschen

Mikroben sind allgegenwärtig und haben viele Gesichter: Sie sind keineswegs nur die gefürchteten Krankheits- und Fäulniserreger, derer man sich mit allen Mitteln zu erwehren sucht. Viele von ihnen erfüllen sehr nützliche Funktionen: etwa bei der Herstellung von Nahrungsmitteln und Medikamenten, bei der Erzgewinnung und bei der Sanierung verseuchter Böden. Der renommierte Mikrobiologe John Postgate lädt den Leser in seinem informativen und unterhaltsamen Buch zu einer spannenden Entdeckungsreise in die schillernde Welt der Mikroorganismen ein, wobei sein Hauptaugenmerk deren vielfältiger Bedeutung für den Menschen gilt.

„Man spürt auf diesen Seiten die Gegenwart eines ausgezeichneten Lehrers mit der beneidenswerten Fähigkeit, sich klar auszudrücken und auch komplizierte wissenschaftliche Sachverhalte zugänglich zu machen.“

Applied Microbiology 16/1 (1993)

**Spektrum**  
AKADEMISCHER VERLAG

Vangerowstraße 20 · 69115 Heidelberg

ROSENBRUCH



- vessel system as an experimental model for irritation and inflammation. *Toxicology in vitro* 4, 327–331.
- Rosenbruch, M., Kniepen, J. und Weishaupt, C. (1993). The early chick embryo as a model to evaluate cardio-vascular effects of adrenaline and nicotine. *Toxicology in vitro* 7, 541–545.
- Rosenbruch, M., Baumann, L. und Hilscher, W. (1988). Cadmiuminduzierte Alterationen des Dottersack-Gefäßsystems des Hühnerkeimlings und Konsequenzen für die Embryo-Mortalität. *Fertilität* 4, 219–222.
- Rous, P. und Murphy, J. (1911). Tumor implantations in the developing embryo. *J. Amer. Med. Ass.* 56, 741–742.
- Russell, W. M. S. and Burch R. L. (1959). *Principles of human experimental technique*. London: Methuen & Co.
- Rychter, Z., Kopecky, M. und Lemez, L. (1955). Blood of chick embryos. IV. Volume of circulating blood from the 2nd day of incubation up to hatching. *Cesk. Morfol.* 3, 11–25. (zit. nach Rolnik).
- Schroyens, W., Schroyens, E. und Bielunas, J. (1989). Different invasion capacity of NBT II and MDCK in the chick embryo chorioallantois. *Anticancer Res.* 9, 1665–1668.
- Seto, F. (1981). Early development of the avian immune system. *Poultry Res.* 60, 1981.
- Shoin, K., Yamashita, Y. J., Enkaku, F., Sasaki, T., Tanaka, M. und Endo, Y. (1991). Chick embryo assay as chemosensitivity test for malignant glioma. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 1165–1170.
- Spielmann, H., Liebsch, M., Gerner, I., Kalweit, S. und Wirnsberger, T. (1993). Validation project of alternatives to the Draize eye test in Germany. *Toxicology in vitro* 7, 505–510.
- Thompson, W. D., Evans, A. T. und Campbell, R. (1986). The control of fibrogenesis: stimulation and suppression of collagen synthesis in the chick chorioallantoic membrane with fibrin degradation products, wound extracts and proteases. *J. Pathol.* 148, 207–215.
- Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland vom 18. August 1986, *Bundesgesetzbl. I.* 1986, S. 1319–1329.
- Vervoorts, A., Rood, A., Klotz, M., Rosenbruch, M. und Moser, J. (1994). Quantitative data on blood flow during tumor PDT obtained by laser-doppler-spectroscopy in the hen's egg test system.
- Voss, H. und Henneberg, G. (1957). Kritische Hinweise für die Beurteilung der Spezifität histologischer Reaktionen der Chorio-Allantois-Membran des Hühnchens im Rahmen der Virusdiagnostik. II. Mitteilung: Die Reaktionen der Chorio-Allantois-Membran auf unspezifische Reize. *Virchows Arch.* 329, 765–793.
- Windle, W. F. und Orr, D. W. (1934). The development of behaviour in the chick embryos: spinal cord structure correlated with early somatic motility. *K.* 287–306.

### Kontaktadresse

Martin Rosenbruch  
BAYER AG  
Inst. f. Toxikologische Pathologie  
Postfach 10 17 09  
D-42096 Wuppertal