

KRAJOWA KOMISJA ETYCZNA
DO SPRAW DOŚWIADCZEŃ NA ZWIERZĘTACH

z s. Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
ul. Wspólna 1/3, 00-529 Warszawa

UCHWAŁA nr 34/2026

Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
z dnia 8 września 2026 roku

Na podstawie art. 33 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. *o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych* (Dz.U. z 2023 r. poz. 465 ze zm., dalej „ustawa”), uchwala się, co następuje:

§ 1

Krajowa Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (dalej: KKE) ustala opisane w załączniku do niniejszej uchwały **dobre praktyki** w zakresie **wykorzystywania zarodków ptaków w badaniach eksperymentalnych, na przykładzie zarodków kurzych**.

§ 2

Niniejszą uchwałę udostępnia się do wiadomości oraz stosownego wykorzystywania przez lokalne komisje etyczne do spraw doświadczeń na zwierzętach i zespoły ds. dobrostanu oraz publikuje się w Biuletynie Informacji Publicznej na stronie podmiotowej ministra właściwego do spraw szkolnictwa wyższego i nauki oraz na stronie internetowej KKE.

§ 3

Niniejszą uchwałą zastępuje się dobre praktyki w zakresie eutanazji kurzych zarodków od 13 dnia rozwoju.

§ 4

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

dr hab. Radosław KOWALSKI, prof. Instytutu
Przewodniczący
Krajowej Komisji Etycznej
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach

Dobre praktyki
**Wykorzystywanie zarodków ptaków w badaniach eksperymentalnych
na przykładzie zarodków kurzych**

1. Wstęp

Rozwój zarodka w jajach jest procesem wysoce złożonym, na który wpływa wiele czynników. Prawidłowy przebieg embriogenezy zależy nie tylko od utrzymania odpowiednich parametrów środowiskowych w inkubatorze i klujniku, takich jak temperatura, wilgotność oraz stężenie tlenu (O₂) i dwutlenku węgla (CO₂), lecz także od właściwego postępowania z jajami wylęgowymi przed ich włożeniem do inkubatora oraz w trakcie inkubacji, w tym m.in. regularnego obracania jaj.

Zarodek kurzy (rzadziej zarodki innych ptaków) stanowi alternatywny model badawczy w badaniach przedklinicznych ze względu na łatwą dostępność oraz relatywnie niskie koszty utrzymania. Jego szybki rozwój oraz naturalnie zamknięte środowisko wzrostu stanowią istotne zalety w porównaniu z tradycyjnymi modelami ssaczymi. Ponadto wykorzystanie zarodków kurzych (szczególnie we wczesnych stadiach rozwoju) budzi mniejsze kontrowersje etyczne niż badania z wykorzystaniem ssaków, ponieważ ptasie embriony nie posiadają jeszcze w pełni wykształconego układu nerwowego, receptorów bólowych ani świadomości, co eliminuje ryzyko zadawania im cierpienia fizycznego i psychicznego - przynajmniej do pewnego etapu rozwoju. **Jednakże przyjmuje się, iż w ostatniej 1/3 okresu wysiadywania jaj, zarodki powinny być traktowane jak zarodki ssacze w ostatniej 1/3 okresu ciąży.**

2. Uregulowania prawne i standardy etyczne

Dyrektywa z dnia 20 października 2010 r. Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE *w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych*, w art. 1 ust. 3 rozstrzyga, że jej przepisy mają zastosowanie do:

- a) żywych zwierząt kręgowych innych niż człowiek, w tym:
 - form larwalnych zdolnych do samodzielnego odżywiania się;
 - form embrionalnych ssaków od ostatniej jednej trzeciej okresu ich prawidłowego rozwoju;
- b) żywych głowonogów.

Dyrektywa 2010/63/UE **nie reguluje zatem zasad postępowania z formami embrionalnymi zwierząt innych niż ssaki**. W świetle jej przepisów **zarodki ptasie nie są kwalifikowane jako zwierzęta** wykorzystywane do celów naukowych w rozumieniu dyrektywy.

Analogiczne regulacje zostały zawarte w ustawie z dnia 15 stycznia 2015 r. *o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych*. Zgodnie z art. 2 ust. 1 pkt 1 ustawy, zwierzętami, na których wykorzystanie w doświadczeniu należy uzyskać zgodę lokalnej komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach (dalej: lke) są żywe zwierzęta kręgowe, w tym formy larwalne zdolne do samodzielnego odżywiania i **formy embrionalne ssaków**

w ostatniej jednej trzeciej życia płodowego albo znajdujące się we wcześniejszym stadium rozwoju, gdy w wyniku wykonanych procedur, po osiągnięciu ostatniej jednej trzeciej życia płodowego, mogą one odczuwać ból, cierpienie, dystres lub wystąpi u nich trwałe uszkodzenie organizmu, oraz żywe głowonogi.

Tym samym stwierdzić należy, iż **do przeprowadzenia badań na zarodkach ptasich (w tym kurzych) w sytuacji, w której nie dochodzi do wyklucia, nie jest wymagana zgoda** lke.

Planując badania na zarodkach ptasich (w tym kurzych), gdzie nie dochodzi do wyklucia, uwzględnić jednakże należy, iż na podstawie art. 2 ust. 1 ustawy z dnia 21 sierpnia 1997 r. *o ochronie zwierząt* (dalej: u.o.z.), ustawa ta reguluje postępowanie ze zwierzętami kręgowymi, w tym zwierzętami kręgowymi wykorzystywanymi w celach naukowych lub edukacyjnych **w zakresie nieuregulowanym w ustawie z dnia 15 stycznia 2015 r. *o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych***. Również zgodnie z art. 4 ustawy *o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych*, w zakresie nieuregulowanym tą ustawą, do ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych stosuje się ustawę z dnia 21 sierpnia 1997 r. *o ochronie zwierząt*. Oznacza to, że do kurzych zarodków znajduje zastosowanie w szczególności art. 1 ust. 1 u.o.z., zgodnie z którym *Zwierzę, jako istota żyjąca, zdolna o odczuwania cierpienia, nie jest rzeczą. Człowiek jest mu winien poszanowanie, ochronę i opiekę*, a także art. 5 u.o.z., stanowiący, że *Każde zwierzę wymaga humanitarnego traktowania*. Nieprawidłowości związane z wykorzystywaniem ptasich zarodków w badaniach naukowych skutkujące ich bólem lub cierpieniem mogą być zatem kwalifikowane jako przestępstwa z art. 35 u.o.z.

Jeżeli natomiast **dochodzi do wyklucia ptaka**, wymóg uzyskania zgody lke zależy od tego, czy manipulacje na zarodku doprowadzą do wyklucia się zwierzęcia odczuwającego ból, cierpienie lub dystres lub wystąpi u niego trwałe uszkodzenie organizmu, w stopniu równym ukłuciu igłą lub intensywniejszym, lub też planowane jest dalsze wykorzystywanie wyklutych zwierząt, które może spowodować ból, cierpienie lub dystres lub wystąpi u nich trwałe uszkodzenie organizmu, w stopniu równym ukłuciu igłą lub intensywniejszym. **Wówczas wniosek o udzielenie zgody na przeprowadzenie doświadczenia powinien zawierać również opis czynności dokonywanych na zarodku przed wykluciem**, a przepisy ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. *o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych* znajdują zastosowanie.

Przepisy tej ustawy znajdują zastosowanie również, gdy w ramach prowadzonych badań dochodzi do wyklucia ptaka, który wprowadzie nie odczuwa bólu, cierpienia czy dystresu w stopniu równym ukłuciu igłą, ani nie występuje u niego trwałe uszkodzenie organizmu, ale **ptak ten musi zostać po wykluciu uśmiercony celem pobrania jego narządów lub tkanek do badań**. W takiej sytuacji znajdują bowiem zastosowanie w szczególności przepisy ustawy odnoszące się do uśmiercania zwierząt doświadczalnych czy warunków ich utrzymywania, choć zgoda lke nie jest wymagana.

3. Możliwe cele wykorzystywania zarodków kurzych w badaniach naukowych.

W badaniach diagnostycznych i eksperymentalnych wykorzystywane są głównie zarodki kurze, rzadziej zarodki innych ptaków.

Najczęściej są one wykorzystywane w celach takich, jak:

- badania procesów biologicznych w czasie rzeczywistym, obejmujących m.in. rozwój tkanek, wzrost nowotworów oraz angiogenezę, z wykorzystaniem różnorodnych technik obrazowania, takich jak obrazowanie optyczne, rezonans magnetyczny, pozytonowa tomografia emisyjna, tomografia komputerowa oraz ultrasonografia;
- prowadzenie obserwacji, jak z pojedynczej komórki formują się narządy, tkanki i układy (np. układ krążenia czy nerwowy); rozwój zarodka ptasiego zachodzi poza organizmem matki, co ułatwia manipulacje mikroskopowe;
- badania nad rakiem i angiogenezą: wykorzystanie błony omoczeniowo-kosmówkowej (CAM) do testowania, jak guzy nowotworowe stymulują wzrost nowych naczyń krwionośnych, oraz jak działają leki przeciwnowotworowe;
- wirusologia i produkcja szczepionek: hodowla wirusów (np. grypy) w płynach owodniowych i omoczeniowych zarodka w celu produkcji szczepionek;
- toksykologia i farmakologia: sprawdzanie, jak substancje chemiczne, leki lub toksyny wpływają na rozwój embrionalny oraz czy powodują wady wrodzone;
- mikrobiologia: obserwowanie interakcji patogenów z żywym organizmem oraz badanie mechanizmów przetrwania i uśpienia bakterii;
- ocena efektów oddziaływania różnych substancji w badaniach ich farmakodynamiki.

Zdolność zarodka kurzego do integracji ludzkich komórek nowotworowych w modelach ksenograftów czyni go wiarygodną platformą do badań nad nowotworami, umożliwiającą wysokoprzepustowe testowanie interwencji terapeutycznych oraz monitorowanie dynamiki procesów molekularnych *in vivo*. Postęp w technikach obrazowania molekularnego dodatkowo zwiększa rozdzielczość oraz zakres uzyskiwanych danych, dostarczając szczegółowych informacji na temat mechanizmów komórkowych i molekularnych leżących u podstaw patogenezy i przebiegu chorób.

4. Etapy rozwoju zarodka ptasiego na przykładzie zarodka kury

W badaniach naukowych z wykorzystaniem zarodków ptasich konieczne jest każdorazowe pozyskanie informacji dotyczących pochodzenia jaj wylęgowych, czasu oraz warunków ich przechowywania przed rozpoczęciem eksperymentu, ponieważ czynniki te mogą istotnie wpływać na przebieg i wyniki prowadzonych badań.

Zarodek ptasi w postaci tarczki zarodkowej jest zlokalizowany na powierzchni kuli żółtkowej i powstaje bezpośrednio po zapłodnieniu komórki jajowej. W jaju wylęgowym zniesionym przez kurę zarodek pozostaje w stanie zatrzymanego rozwoju do momentu rozpoczęcia inkubacji. Jaja wylęgowe zachowują zdolność do dalszego rozwoju zarodka przez okres do 10–12 dni, pod warunkiem przechowywania w odpowiednich warunkach środowiskowych, w szczególności przy właściwej temperaturze i wilgotności. W praktyce hodowlanej jaja umieszcza się w inkubatorze zazwyczaj nie później niż po 7 dniach od ich zniesienia. W okresie pomiędzy zniesieniem jaj a rozpoczęciem inkubacji nie dochodzi do wzrostu ani dalszego różnicowania zarodka. Okres ten określany jest jako etap nieaktywnego życia embrionalnego. Stadia rozwoju zarodka ptasiego zostały sklasyfikowane zgodnie z systemem Hamburgera i Hamiltona (HH), obejmującym 46 kolejnych etapów rozwojowych, od stadium 1 HH do stadium 46 HH.

Etapy inkubacji i rozwoju zarodkowego ptaków (na przykładzie jaja kurzego):

Pierwsza doba inkubacji:

- 16 godzin – pierwsze oznaki pojawienia się zarodka kurczęcia
- 18 godzin – pojawienie się przewodu pokarmowego
- 20 godzin – pojawienie się kręgosłupa
- 21 godzin – początek rozwoju układu nerwowego
- 22 godziny – początek rozwoju głowy
- 24 godziny – początek rozwoju oka

Druga doba inkubacji:

- 25 godzin – początek rozwoju serca
- 35 godzin – początek rozwoju ucha
- 42 godziny – bicie serca

Ważne: Druga doba inkubacji jaja kurzego, odpowiadająca stadiów rozwojowym HH12–HH16 według klasyfikacji Hamburgera i Hamiltona, stanowi szczególnie newralgiczny okres embriogenezy, wymagający zapewnienia stabilnych i optymalnych warunków środowiska inkubacyjnego. W tym przedziale czasowym dochodzi do intensywnych procesów morfogenetycznych oraz do wykształcania się błon pozazarodkowych.

W trakcie tych stadiów rozwoju formują się cztery zasadnicze błony pozazarodkowe: owodnia (amnion), kosmówka (chorion), pęcherzyk żółtkowy (yolk sac) oraz omocznia (allantois). Omocznia w początkowej fazie rozwoju ulega stopniowemu rozszerzaniu i wypełnianiu płynem, który pełni funkcję rezerwuaru substancji odżywczych niezbędnych dla rozwijającego się zarodka, a w warunkach eksperymentalnych może również stanowić przestrzeń kumulacji substancji badanej aplikowanej zarodkowi.

Kosmówka, będąca najbardziej zewnętrzną błoną pozazarodkową, we wczesnych stadiach (HH12–HH13) otacza owodnię, a następnie pęcherzyk żółtkowy. W kolejnych etapach rozwoju kosmówka zrasta się z omoczną, prowadząc do powstania błony omocznioowo-kosmówkowej (chorioallantoic membrane, CAM), która odgrywa kluczową rolę w wymianie gazowej, regulacji gospodarki metabolicznej oraz stanowi istotną strukturę wykorzystywaną w badaniach eksperymentalnych, w szczególności w modelach angiogenezy i nowotworzenia.

Trzecia doba inkubacji:

- 60 godzin – początek rozwoju nosa
- 62 godziny – początek rozwoju nóg
- 64 godziny – początek rozwoju skrzydeł

Czwarta doba inkubacji – początek rozwoju języka.

W tej dobie inkubacji rozpoczyna się wrastanie omocznia pomiędzy kosmówką a owodnię

Piąta doba inkubacji – formowanie się narządów rozrodczych i różnicowanie płci

Szósta doba inkubacji – szósta doba inkubacji jaja kurzego, odpowiadająca stadium rozwojowemu HH28–HH29 według klasyfikacji Hamburgera i Hamiltona, charakteryzuje się rozpoczęciem rozwoju dzioba. Na tym etapie omocznia, która ulegała intensywnemu rozwojowi we wcześniejszych stadiach (około 84–86 godzina inkubacji), jest już całkowicie zrośnięta z kosmówką, tworząc błonę omocznioowo-kosmówkową. Struktura ta otacza owodnię, pęcherzyk żółtkowy oraz część białka jaja.

Omocznia pozostaje w bezpośrednim kontakcie z błonami podskorupowymi jaja i w kolejnych dobach inkubacji stopniowo się rozrasta, tak że około 11–12. doby wyściela niemal całe wnętrze skorupy jaja. Błona omocznioowo-kosmówkowa pełni w tym okresie kluczową rolę w wymianie gazowej oraz gospodarce metabolicznej rozwijającego się zarodka.

Ósma doba inkubacji – początek rozwoju piór

Dziesiąta doba inkubacji – początek twardnienia dzioba

Trzynasta doba inkubacji – pojawienie się łusek i pazurów

Czternasta doba inkubacji – zarodek zajmuje pozycję w kierunku tępego końca jaja

Szesnasta doba inkubacji – łuski, pazury i dziób stają się twarde i zrogowaciałe

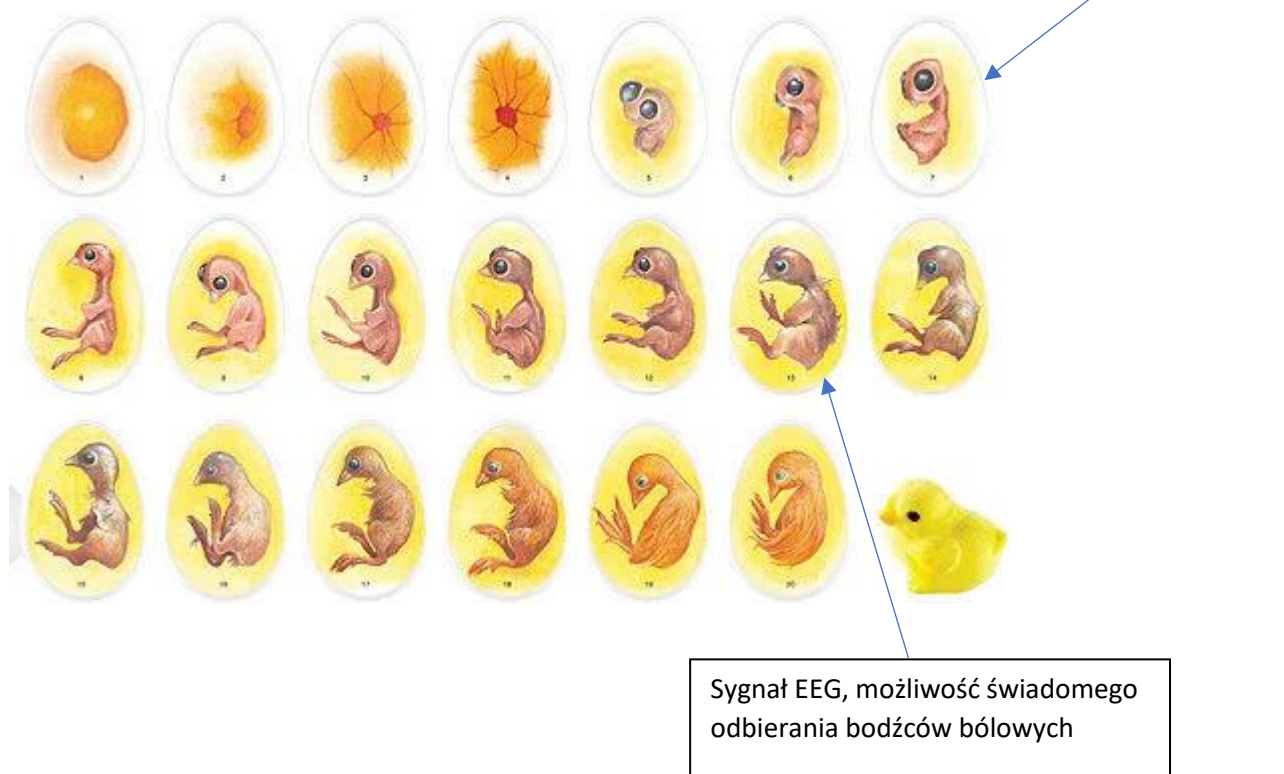
Siedemnasta doba inkubacji – dziób obraca się w kierunku komory powietrznej

Dziewiętnasta doba inkubacji – woreczek żółtkowy zaczyna wnikać do jamy ciała

Dwudziesta doba inkubacji – woreczek żółtkowy całkowicie wciąga się do jamy ciała; zarodek zajmuje praktycznie całą przestrzeń w jajku z wyjątkiem komory powietrznej

Dwudziesta pierwsza doba inkubacji – wyklucie się pisklęcia

Etapy rozwoju zarodka kurzego (schemat) :



Źródło: <https://cezas.com.pl/rozwoj-kurczaka-w-jajku-modele-21-elem-imp0733-p-4091.html>

5. Techniki manipulacji eksperymentalnych na przykładzie zarodka kury

Podczas inkubacji zapłodnione jaja kurze powinny być utrzymywane w stałych warunkach środowiskowych, tj. w temperaturze 37,7°C oraz przy wilgotności względnej wynoszącej około

47%. Jeżeli badania prowadzone są z wykorzystaniem zarodków innych ptaków, niż kury, należy każdorazowo ustalić odpowiednie warunki utrzymywania tych zarodków.

O przydatności zarodka do dalszego wykorzystania eksperymentalnego decyduje tzw. światlenie jaj, które umożliwia kwalifikację jaja jako zapłodnionego oraz pozwala, przez nienaruszoną skorupę, na lokalizację kluczowych struktur embrionalnych i pozazarodkowych, takich jak woreczek żółtkowy, tarczka zarodkowa oraz błona kosmówkowo-omocznioowa. Uzyskanie informacji o przestrzennym rozmieszczeniu tych struktur w jajach umożliwia precyzyjne zaplanowanie miejsca depozycji badanych substancji. Pierwsze światlenie przeprowadza się zazwyczaj w 6. dobie inkubacji i stanowi ono najwcześniejszy moment kwalifikacji jaj oraz pierwszą możliwość podania badanych substancji do worka owodniowego lub, alternatywnie, na błonę kosmówkowo-omoczniową. W przypadku planowanej aplikacji substancji do woreczka żółtkowego zaleca się wykorzystanie zarodków kurzych nie młodszych niż 9-dniowe.

W zależności od celu badania (np. namnażanie określonych patogenów wirusowych, bakteryjnych lub mykoplazm), zarodki muszą być inkubowane przez odpowiednio długi czas oraz poddawane codziennemu światleniu. Metoda ta umożliwia wczesne wykrycie zarodków obumarłych niespecyficzenie, na przykład w wyniku mechanicznego uszkodzenia podczas nieprawidłowego przeprowadzenia czynności inokulacji (wstrzyknięcia substancji do jaja lub rozwijającego się zarodka), jak również zarodków zamierających w późniejszym okresie wskutek działania podanego inokulatu (wstrzykniętej substancji).

Kolejnym etapem eksperymentu jest wcześniej zaplanowany moment schłodzenia zarodków lub doprowadzenia ich do dnia wylęgu, który w przypadku zarodków kury przypada na 21. dobę inkubacji.

W zależności od założeń i celów badawczych zarodki mogą być wykorzystywane na różnych etapach rozwoju, odpowiednio do wieku inkubacyjnego i planowanego zakresu analiz.

5.1 Zabiegi na zarodkach kury:

- zakażanie zarodka do worka owodniowo-omocznioowego - wiek zarodka 6 dni
- zakażanie na błonę kosmówkowo-omoczniową – wiek zarodka 6 dni
- zakażanie do worka żółtkowego (dożółtkowo) - wiek zarodka 9 dni

5.2 Technika zakażania zarodków:

- światlenie zarodka
- zaznaczenie pod kontrolą podświetlacza komory powietrznej
- zaznaczenie pod kontrolą podświetlacza położenia tarczki zarodkowej
- odkażanie miejsca wykonania wklucia przez skorupę
- usunięcie warstwy skorupy jaja w miejscu wklucia do powierzchni błony podskorupowej
- przekłucie błony podskorupowej i podanie określonej objętości badanych materiałów w roztworze płynu PBS
- ewentualne sprawdzenie pod kontrolą podświetlacza lokalizacji wprowadzonego depozytu
- zaklejenie parafiną lub jałowym przylepcem otworu iniekcyjnego
- dalsza inkubacja zarodków
- codzienne prześwietlanie i usuwanie ewentualnych zarodków zmarłych
- schładzanie zarodków w określonych terminach badania
- otwarcie skorupy jaj/zarodków i dalsze zabiegi na zarodkach

5.3 Manipulacja eksperymentalna *in ovo* i *ex ovo*

W badaniach z zastosowaniem zarodków kurzych stosuje się zarówno techniki „*in ovo*”, jak i „*ex ovo*”. Technika *in ovo* polega na manipulacji zarodkiem wewnątrz jaja, natomiast technika *ex ovo* obejmuje ekstrakcję i hodowlę zarodka poza jajem [Sukparangsi, W. 2022]. Podstawową metodą postępowania z zarodkami kurzymi *in ovo* jest inkubacja i przebicie skorupy jaja tzw. fenestracja. Polega ona na utworzeniu małego okienka w skorupce jaja, umożliwiającego dostęp do zarodka, jest zazwyczaj wykonywana za pomocą wiertarki stomatologicznej, szpikulca lub małych nożyczek. Otwór ten niezwłocznie po zabiegu zakażenia zarodka powinien być zalepiony rozpuszczoną parafiną lub zaklejony plastrzem medycznym. W przypadku manipulacji *ex ovo* zarodek jest wyjmowany z jaja i hodowany zewnętrznie w nowych środowiskach hodowlanych, w tym w surogacie skorupy jaja, szalkach Petriego i sztucznych naczyniach przypominających skorupkę jaja.

6. Rekomendacje dotyczące analgezji i anestezji zarodków kurzych

W badaniach nad bólem kluczowe jest odróżnienie **nocycepcji** (wykrywania i przewodzenia sygnałów o zagrożeniu uszkodzenia tkanek) od **odczuwania bólu** (świadomego, subiektywnego wrażenia zmysłowego) [International Association for the Study of Pain (IASP) *Pain Terms and Definitions*. [(accessed on 11 April 2023)]. Available online: <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>]. Nocycepcja to wykrywanie potencjalnie uszkadzającego tkanki bodźca oraz jego przewodzenie przez nocycceptywną część układu nerwowego, podczas gdy ból charakteryzuje się subiektywnym, świadomym wrażeniem zmysłowym, zazwyczaj wywoływanym przez nocyccepcję. Nocycepcja i ból to postępujące procesy adaptacyjne, które rozwijają się stopniowo przez cały okres prenatalny.[Julius et al., 2001; Sneddon et al., 2018; Bell et al., 2018; Douglas et al., 2018].

Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy pierwsze oznaki nocyccepcji i odczuwania bodźców bólowych u zarodków kurzych obserwowane są w 7 dniu inkubacji [przegląd. Weiss et al. 2023]. W okolicach 13 dnia inkubacji obserwuje się sygnał EEG ze wzrastającą amplitudą, co wskazuje na możliwość pojawienia się wtedy świadomego odczuwania bólu. Dane te muszą być uwzględniane podczas projektowania protokołów eksperymentalnych z wykorzystaniem zarodków kurzych [Süß S.C. et al., 2023; Kollmansperger S et, 2023; Truhlar et al., 2026].

I trymestr rozwoju: Całkowity brak możliwości wystąpienia nocyccepcji oraz odczuwania bólu.

4. dzień inkubacji: Pojawiają się pierwsze czuciowe włókna aferentne (nerwowe).

Do 6,5. dnia inkubacji: Potwierdzony brak jakiejkolwiek aktywności elektrycznej mózgu.

7. dzień inkubacji: Następuje zamknięcie wielosynaptycznych łuków odruchowych. Do tego dnia odczuwanie bólu jest uznawane za **niemożliwe**.

Po 7. dniu inkubacji: Brak możliwości wskazania konkretnego momentu, od którego zarodek zyskuje zdolność do nocyccepcji i odczuwania bólu.

13. dzień inkubacji: W literaturze wskazuje się ten dzień jako moment wykształcenia funkcjonalnego mózgu.

Znieczulenie bezwzględnie należy stosować podczas manipulacji wykonywanych na zarodkach w stadiach rozwojowych powyżej ED13 - trzynasty dzień rozwoju zarodka/inkubacji [Aleksandrowicz, E i Herr, I, 2015; Horr, M i wsp. 2023]. Tym niemniej zaleca się stosowanie znieczulenia także w przypadku młodszych zarodków (od 7 dnia inkubacji) [Heidrich, A.; Würbach, L, 2011; Waschkies, C i wsp. 2015]. Manipulacje na zarodkach kurzych powinny być wykonywane po zastosowaniu metod prowadzących do szybkiej utraty przytomności i zniesienia odczuwania bólu, po których następowałaby zniesienie funkcji mózgu. Anestezja powinna być zastosowana również przy wykonywaniu manipulacji na nieunerwionych tkankach zewnątrzembrionalnych (błona kosmówkowo-omoczeniowa). Jednym ze sposobów zniesienia bólu u zarodków kurzych jest podanie pochodnych barbituranów (np. pentobarbitalu) poprzez zewnątrzembrionalny system naczyń krwionośnych. Nie ma rekomendowanych dawek do anestezji dla zarodków kurzych-skutki iniekcji muszą być monitorowane indywidualnie w przypadku każdego zarodka, do czasu zaniku ruchów i ustania akcji serca (pulsowania naczyń). Ta anestezja pozwala na utrzymanie przy życiu, z wyłączeniem świadomości, zarodka przez okres około 10 minut, co pozwala na wykonywanie krótkich manipulacji na żyjącym zarodku kurzym. Zabieg ten jednak wymaga dużej znajomości anatomii i wprawy operatora. Dostęp do krążenia zewnątrzembrionalnego (otwarcie skorupy jaja) powinien być zapewniony w 4 dniu rozwoju zarodka, w którym to dniu widoczne są już naczynia krwionośne i serce. W 5 dniu rozwoju embrionalnego błona kosmówkowo-omoczeniowa przytwierdza się do skorupki jaja, i jego otwarcie bez ryzyka naruszenia tej struktury jest już niemożliwe [Kunzi-Rapp i wsp. 2001]. Naczyniami odpowiednimi do podania środka anestetycznego są jasnoczerwone naczynia błony kosmówkowo-omoczeniowej, gdzie ciśnienie krwi jest niskie. Ciemno zabarwione naczynia, w których jest wysokie ciśnienie krwi, są nieodpowiednie, gdyż może to spowodować zbyt duże krwawienie.

Ważne: powyższe rekomendacje dotyczą zarodków kurzych, jako że są one najczęściej używane. Jednakże przy wyborze zarodków innych ptaków należy każdorazowo uwzględnić długość inkubacji i dostosować metody znieczulenia. Standardowo przyjmuje się, iż zarodek ptasi jest zdolny do odczuwania bólu w ostatniej 1/3 okresu wysiadywania, co dla kur przypada na 13 dzień inkubacji, ale np. dla indyka, dla którego całkowity czas inkubacji wynosi 28 dni, jest to 19 dzień inkubacji.

7. Zakończenie manipulacji wykonywanych na zarodkach kurzych poprzez uśmiercenie zarodka

Inkubując zarodki kurze do 10 dnia wieku zarodka (inkubacji) jedną z metod zakończenia doświadczenia jest schłodzenie całego jaja wraz z embrionem. Schłodzenie powinno odbywać się według schematu: wyjęcie jaj z inkubatora, pozostawienie w temperaturze pokojowej przez ok. 2 godziny, a następnie umieszczenie jaj w temperaturze lodówki na okres co najmniej 3 dni celem całkowitego uniemożliwienia dalszego rozwoju zarodka. Po tym czasie możliwe jest jego otwarcie i pobranie próbek. Wskazane jest ewentualne przeswietlenie takich jaj dla potwierdzenia, czy we wszystkich zarodkach ich procesy życiowe całkowicie ustały.

Należy jednak podkreślić, że w odniesieniu do zarodków powyżej 10 dni inkubacji ta metoda jest nieodpowiednia. Metodami z wyboru w takich sytuacjach według wytycznych American Veterinary Medical Association (AVMA) powinny być:

1. Przedawkowanie środka anestetycznego. Przykładowa sprawdzona objętość stosowana przy iniekcji do naczyń CAM roztworu pentobarbitalu sodu (16 g/100 mL) to 0.02-0.05 mL. Można również rozważyć podanie ketaminy z ksylazyną, choć nie ma ustalonych, rekomendowanych dawek. Przykładowa dawka, która może być skutecznie wykorzystana do eutanazji zarodków kurzych w ED18 to 2 mg ketaminy i 0.2 mg ksylazyny podane domięśniowo, do mięśnia piersiowego.
2. Szybka dekapitacja po wyjęciu z jaja.
3. Ekspozycja z wykorzystaniem inhalacji CO₂ (przez ok. 20 minut).

Najwłaściwszą metodą z punktu widzenia etycznego jest przedawkowanie środka anestetycznego.

Ponadto należy pamiętać, iż naturalny poziom CO₂ w mikrośrodku zarodka może być wysoki - do 14%. Dlatego stężenia CO₂ zalecane do stosowania przy uśmiercaniu są wysokie, a okres ekspozycji na podwyższony poziom CO₂ - długi. Najczęściej zaleca się uśmiercenie zarodków ptasich poprzez umieszczenie jaj w atmosferze 90% CO₂ przez 20 minut.

8. Kwestie etyczne i wnioski ogólne

Wykorzystanie zarodków ptasich w badaniach może stanowić realizację zasady 3R, w szczególności w aspekcie zasady udoskonalenia. Najczęściej wykorzystywane zarodki kurze do 6 dnia rozwoju nie są bowiem zdolne do odczuwania bólu [Rosenbruch, M, 1997]. Zdolność do świadomego odczuwania bólu zazwyczaj odpowiada ostatniej trzeciej części okresu inkubacji [Kollmansperger, S i wsp. 2023; Süß, S.C. i wsp. 2023; Weiss i wsp. 2023]. Jednakże określenie dokładnego etapu rozwoju, w którym zarodki rozpoczynają odczuwanie bólu, stanowi złożony temat, w którym zajął się biologią rozwoju, neuronauka i etyka. Chociaż układ nerwowy zaczyna się rozwijać pod koniec 1. dnia embrionalnego, struktury anatomiczne zaangażowane w percepcję bólu nie są w pełni ukształtowane przed trzynastym dniem embrionalnym, co zbiega się z rozwojem funkcjonalnego mózgu [National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2009].

Należy przy tym zauważyć, że rozwój zarodka ptasiego różni się od rozwoju embrionalnego ssaków zasadniczo jedynie lokalizacją procesu rozwojowego, który w tym przypadku zachodzi poza organizmem matki.

W związku z powyższym prowadzenie badań z wykorzystaniem zarodków ptasich powinno odbywać się z poszanowaniem ogólnych zasad etycznych badań naukowych, w tym zasad ograniczania cierpienia zwierząt oraz odpowiedzialnego projektowania doświadczeń, a także zgodnie z właściwymi w danym przypadku przepisami prawa (ustawą o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych lub ustawą o ochronie zwierząt).

Literatura:

1. Sukparangsi W, Thongphakdee A, Intarapat S. Avian Embryonic Culture: A Perspective of *In Ovo* to *Ex Ovo* and *In Vitro* Studies. *Front Physiol.* 2022 May 16;13:903491. doi: 10.3389/fphys.2022.903491. PMID: 35651873; PMCID: PMC9150135.
2. Kollmansperger S, Anders M, Werner J, Saller AM, Weiss L, Süß SC, Reiser J, Schneider G, Schusser B, Baumgartner C, Fenzl T. Nociception in Chicken Embryos, Part II: Embryonal Development of Electroencephalic Neuronal Activity *In Ovo* as a Prerequisite for Nociception. *Animals (Basel).* 2023 Sep 7;13(18):2839. doi: 10.3390/ani13182839. PMID: 37760239; PMCID: PMC10525651.
3. Aleksandrowicz E, Herr I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. *ALTEX.* 2015;32(2):143-7. doi: 10.14573/altex.1410031. Epub 2015 Jan 16. PMID: 25592390.
4. Horr M, Sommerfeld S, Silva MV, Fonseca BB. A fast and simple protocol to anaesthesia in chicken embryos. *Exp Anim.* 2023 Aug 7;72(3):294-301. doi: 10.1538/expanim.22-0133. Epub 2023 Jan 16. PMID: 36642540; PMCID: PMC10435353.
5. Heidrich A, Würbach L, Opfermann T, Saluz HP. Motion-artifact-free in vivo imaging utilizing narcotized avian embryos in ovo. *Mol Imaging Biol.* 2011 Apr;13(2):208-14. doi: 10.1007/s11307-010-0355-4. PMID: 20552287.
6. Waschkies C, Nicholls F, Buschmann J. Comparison of medetomidine, thiopental and ketamine/midazolam anesthesia in chick embryos for in ovo Magnetic Resonance Imaging free of motion artifacts. *Sci Rep.* 2015 Oct 23;5:15536. doi: 10.1038/srep15536. PMID: 26493765; PMCID: PMC4616043.
7. Kunzi-Rapp K, Kaskel P, Steiner R, Peter RU, Krähn G. Increased blood levels of human S100 in melanoma chick embryo xenografts' circulation. *Pigment Cell Res.* 2001 Feb;14(1):9-13. doi: 10.1034/j.1600-0749.2001.140103.x. PMID: 11277496.
8. Rosenbruch M. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *ALTEX.* 1997;14(3):111-113. English. PMID: 11178496.
9. Süß SC, Werner J, Saller AM, Weiss L, Reiser J, Ondracek JM, Zablotski Y, Kollmansperger S, Anders M, Potschka H, Schusser B, Fenzl T, Baumgartner C. Nociception in Chicken Embryos, Part III: Analysis of Movements before and after Application of a Noxious Stimulus. *Animals (Basel).* 2023 Sep 8;13(18):2859. doi: 10.3390/ani13182859. PMID: 37760259; PMCID: PMC10525827.
10. Weiss L, Saller AM, Werner J, Süß SC, Reiser J, Kollmansperger S, Anders M, Potschka H, Fenzl T, Schusser B, Baumgartner C. Nociception in Chicken Embryos, Part I: Analysis of Cardiovascular Responses to a Mechanical Noxious Stimulus. *Animals (Basel).* 2023 Aug 25;13(17):2710. doi: 10.3390/ani13172710. PMID: 37684974; PMCID: PMC10486618.
11. Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US) 2009; ISBN-13:978-0-309-12834-6 ISBN-10: 0-309-12834-X.
12. International Association for the Study of Pain (IASP) Pain Terms and Definitions. [(accessed on 11 April 2023)]
13. Julius D., Basbaum A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001;413:203–210. doi: 10.1038/35093019.
14. Sneddon L.U. Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology.* 2018;33:63–73. doi: 10.1152/physiol.00022.2017.

15. Bell A. The neurobiology of acute pain. *Vet. J.* 2018;237:55–62. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.05.004.
16. Douglas J.M., Sanchez-Migallon Guzman D., Paul-Murphy J.R. Pain in Birds: The Anatomical and Physiological Basis. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* 2018;21:17–31. doi: 10.1016/j.cvex.2017.08.008.
17. Truhlar L, Werner J, Schmid ML, Glasenapp A, Baehre H, Reiser J, Koerner J, Potschka H, Bankstahl M, Baumgartner C. Pharmacokinetics and analgesic efficacy of fentanyl and buprenorphine in chicken embryos. *PLoS One.* 2026 Jan 8;21(1):e0340576.

Opracowali:

r.pr. Magdalena Akolińska

dr hab. Grzegorz Tomczyk, profesor Instytutu

dr hab. Joanna Wierońska, profesor IF PAN