

## Eutanazja kurzych zarodków

### Wstęp

Zarodki kurze (rzadziej zarodki innych ptaków) oraz ich błona kosmówkowo-omoczniowa (CAM) są używane od ponad 100 lat w biologii doświadczalnej i często są rozważane jako modele zastępujące wykorzystywanie ssaków. Prowadzone na nich badania dotyczą przede wszystkim biologii nowotworów oraz powstawania i funkcji naczyń krwionośnych. Często stosuje się je również w pracach z zakresu embriologii, farmakologii czy medycyny regeneracyjnej.

W powszechnym odbiorze wykorzystanie zarodków ptasich budzi mniej zastrzeżeń etycznych niż wykorzystanie ssaków czy ptaków po ich urodzeniu czy wykluciu. Jest jednak oczywiste, że podobnie jak ssaki również ptaki w trakcie rozwoju zarodkowego stają się stopniowo wrażliwe na ból. Zakłada się, że u zarodków ptasich proces ten rozpoczyna się od połowy okresu wysiadywania jaj. W przypadku zarodków kurzych uznaje się, że znacząca wrażliwość na ból występuje od 13-stego dnia inkubacji (pisklęta wykluwają się zwykle 21 dnia). Najczęściej przyjmuje się, że w ostatniej 1/3 okresu wysiadywania zarodki ptasie powinny być traktowane jak zarodki ssacze w ostatniej 1/3 okresu ciąży.

### Badania prowadzone na błonie kosmówkowo-omoczniowej:

W momencie zniesienia jaja przez kurę, zarodek składa się już z kilkudziesięciu tysięcy komórek tworzących dwuwarstwową tarczkę ułożoną na żółtku. Jego dalszy rozwój przebiega od momentu rozpoczęcia naturalnego wysiadywania lub sztucznej inkubacji. Błona kosmówkowo-omoczniowa (CAM) rozwija się począwszy od 7 dnia inkubacji. Ponieważ jest łatwo dostępna i dobrze unaczyniona wykorzystuje się ją zwłaszcza w badaniach wzrostu nowotworów, ich wrażliwości na leki oraz mechanizmów angiogenezy i wpływu leków na funkcjonowanie naczyń krwionośnych.

Badania z wykorzystaniem CAM najczęściej polegają na wszczepieniu komórek nowotworowych i/lub iniekcji badanych leków. Kluczowe jest zwrócenie uwagi na jakim etapie rozwoju zarodka prowadzone będą doświadczenia i w którym dniu rozwoju zarodka doświadczenie zostanie zakończone. W badaniach wykorzystuje się zwykle CAM zarodków od 9 do 14 dnia rozwoju, ale czasem zakres ten zwiększa się od 8 do 18 dnia. Okres rozwoju zarodka decyduje o konieczności i sposobie przeprowadzenia eutanazji.

### Metody eutanazji

#### Eutanazja kurzych zarodków przed 13 dniem rozwoju

Jeśli w doświadczeniu wykorzystywane są zarodki kurze przed 13 dniem rozwoju – nie jest wymagane podczas jego przebiegu stosowanie środków przeciwbólowych.

Eutanazja może zostać przeprowadzona np. przez umieszczenie jaj w 4°C przez 4 h.

## Eutanazja kurzych zarodków od 13 dnia rozwoju

W przypadku zarodków po 13 dniu rozwoju powinno się rozważyć możliwość i zasadność zastosowania środków przeciwbólowych podczas wykonywania procedur, oraz eutanazji po zakończeniu doświadczenia. Najczęściej zaleca się dwie metody eutanazji:

- z wykorzystaniem inhalacji CO<sub>2</sub>
- z wykorzystaniem środków farmakologicznych

### *Eutanazja z wykorzystaniem inhalacji CO<sub>2</sub>*

Należy pamiętać, że naturalny poziom CO<sub>2</sub> w mikrośrodkowisku zarodka może być wysoki – do 14%. Dlatego zalecane stężenia CO<sub>2</sub> są wysokie, a czasy inkubacji długie. Najczęściej zaleca się eutanazję zarodków kurzych poprzez umieszczenie jaj w atmosferze 90% CO<sub>2</sub> przez 20 minut.

### *Eutanazja z wykorzystaniem środków farmakologicznych*

Eutanazję z wykorzystaniem środków farmakologicznych powinno się rozważyć zwłaszcza w przypadku kończenia doświadczenia na zarodkach które osiągnęły 18 dzień rozwoju.

Najlepiej udokumentowana jest przydatność pentobarbitalu. Można stosować podanie dożylnie pentobarbitalu, wykonując iniekcję do naczyń CAM. Prowadzi to najpierw do głębokiej anestezji, a następnie do śmierci zarodka. 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). Przykładowa sprawdzona objętość stosowana przy iniekcji do naczyń CAM roztworu pentobarbitalu sodu (16 g/100 mL) to 0.02-0.05 mL. Podanie można wykonać np. za pomocą strzykawki insulinowej z igłą 30G x 12 mm. Iniekcję należy wykonywać do jasnoczerwonych naczyń, gdyż ciśnienie krwi jest w nich niższe. W naczyniach ciemnoczerwonych, pulsujących, ciśnienie jest wyższe, wprowadzenie leku jest trudniejsze, a uszkodzenie naczyń może prowadzić do silnego krwawienia.

Można również rozważyć podanie ketaminy z ksylazyną, choć nie ma ustalonych, rekomendowanych dawek. Przykładowa dawka, która była skutecznie wykorzystywana do eutanazji zarodków kurzych w 18 dniu rozwoju to 2 mg ketaminy i 0.2 mg ksylazyny podane domięśniowo, do mięśnia piersiowego.

Podanie pentobarbitalu można również stosować jako metodę krótkotrwałej anestezji, jeśli procedura doświadczalna musi być wykonana na żyjącym zarodku.

## **Literatura:**

- Aleksandrowicz E, Herr I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. *Altex* 2015; 32: 143-147.
- California State Polytechnic University, Pomona. Guidlane approved by the ACUC on 9 February 2012.
- Kain KH, Miller JWI, Jones-Paris CR, Thomason RT, Lewis JD, Bader DM, Barnett JV, Zijlstra A. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. *Dev Dyn* 2014; 243: 216–228.