

## یوتانزی موش کوچک آزمایشگاهی با گاز دی اکسید کربن (از کتاب مدلهای ایمونولوژی در موش کوچک آزمایشگاهی)

تنها منبع مجاز گاز دی اکسید کربن برای استفاده جهت یوتانزی حیوانات آزمایشگاهی کپسول های گاز فشرده دی اکسید کربن می باشد. استفاده از یخ خشک یا سایر منابع تولید گاز دی اکسید کربن به منظور انجام یوتانزی غیر قابل قبول است. محل لوله ورودی گاز دی اکسید کربن به محفظه یوتانزی باید در بالای محفظه و در قسمت وسط آن باشد تا بدین نحو مخلوط شدن گاز دی اکسید کربن ورودی با هوای داخل محفظه به بهترین شکل صورت گیرد. با توجه به این که گاز دی اکسید کربن سنگین تر از هوا می باشد، لازم است یک دریچه در قسمت بالای محفظه یوتانزی تعبیه شود تا در هنگام پر شدن محفظه با گاز دی اکسید کربن، هوای سبک تر موجود در محفظه بتواند از دریچه بالایی خارج شود. برای جلوگیری از آلوده شدن محیط با گاز دی اکسید کربن و جلوگیری از آسیب به افراد حاضر در محل، لازم است محفظه یوتانزی در زیر هود گازهای شیمیایی قرار داشته یا در اتاقی که دارای تهویه مناسب باشد، استفاده گردد. ضمناً لازم است پس از هر بار یوتانزی یک حیوان یا یک گروه از حیوانات، جهت استفاده مجدد از محفظه یوتانزی، کل دی اکسید کربن موجود در محفظه به نحو مناسب تخلیه گردد. برای این منظور لازم است به نحو مناسب داخل محفظه یوتانزی هوادهی شود تا گاز دی اکسید کربن سنگین - که در پایین محفظه ته نشین شده است - از آن خارج گردد. باید توجه داشت که دی اکسید کربن موجود در کپسول به حالت مایع بوده و تبدیل شدن آن به گاز، گرمای زیادی از محیط جذب می نماید. لذا چنانچه لازم است تعداد زیادی از حیوانات یوتانزی شوند یا نیاز به استفاده از حجم بسیار زیادی از گاز دی اکسید کربن باشد، جریان سریع گاز دی اکسید کربن می تواند منجر به انتقال گاز سرد و برفک یخ خشک به محفظه حیوان شده یا گاهی ممکن است سبب یخ زدگی فلومتر جریان گاز شود. بنابراین در صورت نیاز به یوتانزی تعداد زیاد حیوانات یا نیاز به استفاده از حجم زیاد گاز دی اکسید کربن در زمان کوتاه، لازم است دمای گاز وارد شده به محفظه با دست زدن به شلنگ گاز دی اکسید کربن بررسی شود. در صورتی که شلنگ سرد به نظر رسید، می توان با استفاده از ابزارهای تخصصی یا روشهای ابتکاری (نظیر عبور دادن قسمتی از شلنگ گاز دی اکسید کربن از داخل سطل آب گرم) دمای گاز دی اکسید کربن رسیده به حیوانات را گرم کرد (۱). این امر موجب می شود از رنج کشیدن بی مورد حیوانات به دلیل استنشاق گاز سرد پرهیز شده و ضمناً از اثرات مخرب این موضوع بر دیتای پژوهش نیز جلوگیری گردد. برای انجام یوتانزی، حیوانات (ترجیحاً همراه قفس محل زندگی خودشان) در محفظه یوتانزی قرار داده می شوند. پس از بستن درب محفظه و اطمینان از عایق بودن آن، جریان گاز دی اکسید کربن به میزان «۲۰ درصد حجم محفظه در دقیقه» (۲) (دامنه قابل قبول «۱۰ درصد تا ۳۰ درصد حجم محفظه در دقیقه» است) بر روی فلومتر گاز دی اکسید کربن تنظیم می شود. به عنوان مثال در صورتی که حجم محفظه یوتانزی ۱۰ لیتر باشد، لازم است جریان فلومتر معادل ۲ لیتر در دقیقه (دامنه قابل قبول: بین ۱ تا ۳ لیتر بر دقیقه) تنظیم گردد (۲، ۳). در رابطه با حجم های دیگر محفظه های یوتانزی می توانید از فرمول زیر استفاده کنید:

$1000 \div (\text{طول (سانتیمتر)} \times \text{عرض (سانتیمتر)} \times \text{ارتفاع (سانتیمتر)}) = \text{حجم محفظه (لیتر)}$

$100 \div (10 \times \text{حجم محفظه (لیتر)}) = \text{حداقل جریان فلومتر (لیتر بر دقیقه)}$

$100 \div (30 \times \text{حجم محفظه (لیتر)}) = \text{حداکثر جریان فلومتر (لیتر بر دقیقه)}$

به محض شروع جریان گاز دی اکسید کربن به داخل محفظه، حیوانات را زیر نظر بگیرید. آن‌ها نباید در این زمان دچار استرس به نظر برسند (۲). به طور معمول محو هوشیاری حیوان در این روش حدود ۲ تا ۳ دقیقه به طول می‌انجامد. در این هنگام لازم است بدون باز کردن درب محفظه یوتانزی، هر کدام از موش‌ها در رابطه با نبود حرکات تنفسی و رنگ پریدگی چشم‌ها مورد مشاهده قرار گیرند. پس از مشاهده ایست تنفسی (در مواردی که چند حیوان با هم یوتانزی می‌شوند، وقوع ایست تنفسی در تمام حیوانات ملاک است)، لازم است جریان گاز دی اکسید کربن حداقل برای ۱ دقیقه دیگر نیز به داخل محفظه ادامه یابد. سپس در صورتی که هیچگونه حرکت تنفسی در هیچ‌یک از حیوانات دیده نشد و رنگ پریدگی چشم‌ها در تمام حیوانات مشهود بود، می‌توان آن‌ها را از محفظه یوتانزی بیرون آورد. در غیر این صورت چنانچه شکمی در مورد مرگ حیوانات وجود داشته باشد، لازم است همچنان در محفظه یوتانزی باقی مانده و در معرض گاز دی اکسید کربن قرار گیرند (۳).

اگر بعد از مدت ۲ تا ۳ دقیقه قرار دادن حیوانات در محفظه یوتانزی، هنوز محو هوشیاری در حیوانات اتفاق نیفتاده بود، لازم است میزان جریان دی اکسید کربن ورودی به محفظه یوتانزی مورد بررسی قرار گیرد. در برخی موارد ممکن است اشکال در نحوه محاسبه میزان جریان گاز بوده باشد، و در برخی موارد دیگر نیز ممکن است فلومتر کپسول خراب بوده، گاز دی اکسید کربن کپسول تمام شده، یا نشستی در مسیر انتقال گاز به محفظه یا در محفظه، وجود داشته باشد (۳).

پس از تکمیل فرایند یوتانزی به روش گفته شده لازم است با ارزیابی ضوابط تایید مرگ، مرگ تک‌تک حیوانات مورد تایید قرار گیرد. این امر در مورد روش یوتانزی با گاز دی‌اکسید کربن واجد اهمیت بسیار زیادی است؛ چرا که ممکن است برخی حیوانات در حالت عدم هوشیاری عمیق به سر برده، لیکن هنوز نمرده باشند. چنانچه در این مرحله مشخص شود که حیوانی هنوز نمرده است، باید به محفظه یوتانزی برگردانده شده یا از روش دیگری برای یوتانزی او استفاده شود (۳). با توجه به اینکه اغلب روش‌های غیر فیزیکی یوتانزی موجب ایجاد حالت‌های شبیه بیهوشی می‌شوند که ممکن است به راحتی قابل تشخیص نبوده و حیوان پس از مدتی به هوش بیاید، لازم است پس از اجرای این روش‌ها حتماً با استفاده از یکی از روش‌های تکمیلی یوتانزی (ذیل «تأیید مرگ» را ببینید) مرگ حیوان تایید شود. روش‌های یوتانزی تکمیلی باید بلافاصله پس از اطمینان از وجود علائم بالینی مرگ در حیوان (ادامه مطلب؛ ذیل «علائم بالینی مرگ») انجام شده یا اطمینان حاصل شود که حیوان در بیهوشی بسیار عمیق قرار دارد (۴-۲).

**علائم بالینی مرگ**

برای تشخیص مرگ در موش کوچک آزمایشگاهی نباید صرفاً به یک علامت اکتفا کرد، بلکه لازم است علائم مختلف با یکدیگر در نظر گرفته شوند. به طور کلی ضوابط تشخیص مرگ در موش کوچک آزمایشگاهی عبارتند از:

**توقف ضربان قلب:** بدین صورت که اگر انگشتان شست و سبابه در دو طرف قفسه سینه با ملایمت قرار داده شوند، ضربان قلب در اینجا لمس نمی‌شود. با این حال باید توجه داشت که به دلیل ضعیف بودن ضربان قلب در موش کوچک آزمایشگاهی ممکن است قلب همچنان در حال کار کردن بود لیکن فرد ضربان آن را احساس نکند. لازم به ذکر است که ضربان قلب طبیعی در موش کوچک آزمایشگاهی بسیار سریع بوده و چیزی در حدود ۳۱۰ تا ۸۴۰ ضربه بر دقیقه است. لذا احتمال اشتباه شدن ضربان قلب انسان (که از طریق شست دست قابل لمس است) با ضربان قلب موش کوچک آزمایشگاهی وجود ندارد. با این حال در صورت لمس یا عدم لمس ضربان قلب، لازم است سایر معیارهای تایید مرگ در این حیوان نیز مورد بررسی قرار گیرند.

**توقف حرکات تنفسی:** چنانچه حرکات تنفسی با نگاه کردن به قفسه سینه حیوان مشاهده نشود. با این حال باید توجه داشت که حرکات تنفسی در موش کوچک آزمایشگاهی بسیار ظریف بوده و ممکن است حیوان همچنان تنفس کرده ولیکن به وضوح قابل رویت نباشد. لذا استفاده از سایر علائم تایید مرگ ضروری می‌باشد.

**نبود رفلکس‌ها:** چنانچه با انجام انواع رفلکس‌ها نظیر نیشگون گرفتن دم، نیشگون گرفتن پا، نیشگون گرفتن دست، حیوان هیچ علامتی از خود نشان نداد، ممکن است یا به دلیل بیهوشی عمیق بوده یا این که حیوان مرده باشد.

**بی‌رنگ شدن چشم حیوان:** در برخی مواقع در موش‌های کوچک آزمایشگاهی که رنگ طبیعی چشم آن‌ها قرمز است، ممکن است به مجرد مرگ حیوان رنگ چشم به سمت سفید تمایل پیدا کند. البته باید توجه داشت که در مواقعی که خونریزی زیادی در حیوان رخ داده است نیز ممکن است این حالت دیده شود.

**سرد شدگی بدن حیوان:** مدتی پس از مرگ، بدن حیوان کاملاً سرد شده و با دست زدن به بدن این سرد شدگی قابل احساس است.

**جمود نعشی:** مدتی بعد از مرگ حیوان (میزان این مدت بستگی به پارامترهای مختلف منجمله دمای هوای محیط دارد) عضلات حیوان در حالت انقباض کامل قرار گرفته و بدن حیوان کاملاً خشک و سفت به نظر می‌رسد، به نحوی که مفاصل را نمی‌توان به آسانی حرکت داد.

## روشهای تکمیلی یوتانزی

با توجه به اینکه اغلب روش‌های غیر فیزیکی یوتانزی موجب ایجاد حالت‌های شبیه بیهوشی می‌شوند که ممکن است به راحتی قابل تشخیص نبوده و حیوان پس از مدتی به هوش بیاید، لازم است پس از اجرای این روش‌ها حتماً با استفاده از یکی از روش‌های تکمیلی یوتانزی، مرگ حیوان تایید شود. در سایر مواردی نیز که شک و تردید در مورد زنده بودن یا مرگ حیوان وجود داشته باشد، لازم است برای اطمینان از مرگ حیوان نسبت به انجام اقدامات تکمیلی یوتانزی اقدام نمود. روشهای یوتانزی تکمیلی باید بلافاصله پس از اطمینان از وجود علایم بالینی مرگ در حیوان (ذیل «علایم بالینی مرگ» را ببینید) انجام شده یا اطمینان حاصل شود که حیوان در بیهوشی بسیار عمیق قرار دارد (۴-۲). برخی روشهای تکمیلی یوتانزی عبارتند از:

**تخلیه کامل خون بدن:** برای این منظور می‌توان رگهای اصلی بدن نظیر رگ‌های موجود در ناحیه گردن را با ابزار تیز - نظیر تیغ بیستوری - قطع کرد به نحوی که محل رگهای قطع شده پایین‌تر از بدن حیوان قرار گرفته و خون تخلیه شود.

**بیرون آوردن قلب:** خرد کردن دنده‌ها و شکافتن فضای بین دنده‌ای برای رسیدن به قلب در حیوان زنده بسیار دردناک بوده و نیاز به اجرای روش‌های خاص بیهوشی و ضد دردی دارد. لذا با توجه به اینکه هنوز اطمینان کامل حاصل نشده که حیوان مرده است یا خیر، بهتر است برای دسترسی به قلب و بیرون آوردن آن، برشی بر روی محوطه شکمی داده شده، سپس دیافراگم با قیچی بریده و با داخل بردن قیچی اتصالات قلب و رگهای اصلی آن قطع گردیده و قلب بیرون آورده شود.

**تخلیه احشا بدن:** برای این منظور می‌توان پس از شکافتن محوطه شکمی نسبت به قطع کردن اتصالات احشاء موجود در محوطه شکمی و بیرون آوردن آن‌ها اقدام نمود.

**قطع سر:** چنانچه هیچ یک از علائم هوشیاری در حیوان دیده نشد و به نظر می‌رسید که حیوان در بیهوشی عمیق بوده یا تمامی ضوابط تاییدکننده مرگ حیوان، نشان از مرگ احتمالی حیوان داشت، می‌توان با ابزار تیز نسبت به قطع گردن حیوان اقدام نمود. در این رابطه ذیل «روش‌های فیزیکی قابل قبول مشروط» را ببینید.

### منابع:

1. عصمت میراب زاده اردکانی و سیاوش احمدی نوربخش. یوتانزی حیوانات آزمایشگاهی: انستیتو پاستور ایران؛ ۱۳۹۳.
2. Melbourne TUo. Humane killing of mice and rats. Office for Research Ethics & Integrity, Animal Care & Use Standard: Office for Research Ethics & Integrity, Animal Care & Use Standard; 2016.
3. Guidelines for Euthanasia of Rodents Using Carbon Dioxide, (2017).
4. IACUC Policy on the Euthanasia of Rodents, Rodent Fetuses and Neonates, P-008-01, (2017).