Received: 2021/2/14
Accepted: 2021/6/16
How to cite:
Yousefzadeh N, Jeddi S, Ghasemi A. Induction of euthanasia using carbon dioxide in rat: An overview of the available practical guidelines. EBNESINA 2021;23(2):81-91.
DOI: 10.22034/23.2.81

Review Article

Induction of euthanasia using carbon dioxide in rat: An overview of the available practical guidelines

Nasibeh Yousefzadeh[1], Sajad Jeddi[2], Asghar Ghasemi[3]✉

Abstract

Background and aims: Euthanasia is used to define ending an animal's life in a way that results in rapid anesthesia and death without pain or distress. One of the most common methods of performing euthanasia in rats is the administration of carbon dioxide (CO_2). The aim of this study was to review the available practical guidelines for inducing euthanasia in rats by administrating CO_2.

Methods: This review study was conducted by searching in international databases, including PubMed, Google Scholar, and Science Direct, using Euthanasia, CO_2, and Rats as keywords.

Results: Euthanasia of rat using CO_2 is a relatively simple, common, rapid, practical and economical method and does not require advanced apparatus or very expert personnel. For doing euthanasia, parameters including the method of CO_2 administration, characteristics of CO_2 chamber, concentration and flow rate of CO_2 administration, duration of euthanasia, euthanasia approval, and disposal of animal carcasses after euthanasia should be considered.

Conclusion: According to the overview of the available practical guidelines, a CO_2 flow rate of 5.6 L/min is recommended for a standard cage (height, width, and length, 25.4, 22.86, and 48.26 cm, respectively) with a volume of 28 L, which is suitable for two rats. This CO_2 flow should be maintained for 2-5 minutes to induce anesthesia and death and should be continued for at least one minute after observing death signs including lack of respiration and faded eye color.

Keywords: Euthanasia, Rat, Carbon Dioxide

1. PhD in Medical Physiology, Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Assistant professor, Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Professor, Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

✉ Corresponding Author:
Asghar Ghasemi
Address: Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Tel: +98 (21) 22432500
E-mail: Ghasemi@endocrine.ac.ir

OPEN ACCESS
Copyright© 2021. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms. Downloaded from: http://www.ebnesina.ajaums.ac.ir

مقاله مروری

القای یوتانازی با استفاده از دی‌اکسیدکربن در موش صحرایی: مروری بر راهنماهای کاربردی موجود

نصیبه یوسف‌زاده[۱]، سجاد جدی[۲]، اصغر قاسمی[۳]✉

چکیده

زمینه و اهداف: یوتانازی برای توصیف پایان دادن به زندگی یک حیوان به شکلی که منجر به بیهوشی سریع و مرگِ بدون درد و پریشانی گردد، به کار می‌رود. یکی از متداول‌ترین شیوه‌های انجام یوتانازی در موش‌های صحرایی تجویز دی اکسید کربن (CO_2) است. هدف این مطالعه، مروری بر راهنماهای کاربردی موجود برای القای یوتانازی در موش‌های صحرایی با تجویز CO_2 است.

روش بررسی: این مقاله مروری با استفاده از جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی بین‌المللی شامل پاب‌مد، گوگل اسکالر و ساینس‌دایرکت و با کلمات کلیدی یوتانازی، CO_2 و موش صحرائی انجام گردید.

یافته‌ها: یوتانازی موش‌های صحرایی با استفاده از CO_2 یک روش نسبتاً ساده، رایج، سریع، عملی و اقتصادی محسوب می‌شود و برای انجام درست آن نیاز به تجهیزات خاص و یا آموزش قابل توجه کارکنان انجام دهنده نیست. برای انجام یوتانازی عواملی نظیر تعیین روش تجویز CO_2، اتاقک تجویز CO_2، غلظت و سرعت جریان تجویز CO_2، مدت زمان لازم برای انجام یوتانازی، تأیید یوتانازی و دفع لاشه حیوان بعد از یوتانازی باید مورد توجه قرار بگیرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به مرور راهنماهای کاربردی موجود، برای یک محفظه استاندارد (ارتفاع، طول و عرض ۲۵/۴، ۲۲/۸۶ و ۴۸/۲۶ سانتیمتر) با حجم ۲۸ لیتر برای ۲ موش صحرایی، استفاده از CO_2 با سرعت جریان ۵/۶ لیتر در دقیقه توصیه می‌شود. این جریان CO_2 به مدت ۲ تا ۵ دقیقه برای ایجاد بی حسی و مرگ در موش‌ها ادامه می‌یابد و همچنین باید حداقل برای یک دقیقه بعد از مشاهده علایم مرگ شامل عدم تنفس و رنگ چشم محو شده نیز تداوم داشته باشد.

کلمات کلیدی: یوتانازی، موش صحرایی، دی اکسید کربن

فصلنامه علمی پژوهشی ابن‌سینا / اداره بهداشت، امداد و درمان نهاجا (سال بیست و سوم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۰، مسلسل ۷۵)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۶

۱. دکتری تخصصی فیزیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون ریز، تهران، ایران

۲. استادیار، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون ریز، تهران، ایران

۳. استاد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون ریز، تهران، ایران

✉مؤلف مسئول: اصغر قاسمی

آدرس: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون ریز، تهران، ایران

تلفن: ۲۲۴۳۲۵۰۰ (۲۱) ۹۸+

ایمیل:Ghasemi@endocrine.ac.ir

همه حقوق مادی و معنوی این اثر به فصلنامه علمی پژوهشی ابن‌سینا / اداره بهداشت، امداد و درمان نهاجا تعلق دارد.

مقدمه

تخمین زده شده است که سالانه حداقل ۵۰ میلیون (۵۰ تا ۲۰۰ میلیون) حیوان برای انجام پژوهش در دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرند که ۸۰٪ آنها را جوندگان تشکیل می‌دهند و موش‌های صحرایی بعد از موش‌های سوری درصد بالایی از آنها را به خود اختصاص می‌دهند [۱، ۲]. استفاده از حیوانات آزمایشگاهی برای انجام مطالعات امری اجتناب‌ناپذیر است چرا که مطالعه بر روی حیوانات آزمایشگاهی برای ترجمه علوم پایه به علوم بالینی [۳] و همچنین برای مطالعه مدل‌های مختلف مثل دیابت [۴]، پوکی استخوان [۵] و اختلالات تیروئید [۶] ضروری است. به ندرت مطالعه بر روی موش‌های صحرایی با مرگ طبیعی آنها به اتمام می‌رسد و عمده مطالعات آزمایشگاهی با کشتن موش‌های صحرایی به دلیل برداشتن سلول یا بافت، خون و یا نمونه‌های دیگر در مراحل معین و یا در انتهای مطالعه به پایان می‌رسد [۷]. بنابراین بررسی روش‌های کاربردی کشتن حیوانات آزمایشگاهی با کمترین درد مطابق با اصول اخلاقی کار با حیوانات امری ضروری به نظر می‌رسد [۸].

یوتانازی واژه یونانی است که از دو جزء یو به معنی خوب و آسان و تانازی به معنی مرگ تشکیل شده است و برای خلاص کردن حیوان از درد و رنج پس از انجام مطالعات [۹]، نجات از بیماری لاعلاج در طول مطالعه و نجات آنها در صورت نبودن امکانات جهت ادامه حیات استفاده می‌گردد [۱۰]. بنابراین یوتانازی بخش مهمی از مطالعات آزمایشگاهی است و یکی از موارد اساسی است که نیاز به رعایت بالاترین اصول اخلاقی دارد. دستورالعمل لازم برای انجام صحیح یوتانازی نگرانی اساسی برای انجام مطالعات حیوانی است و تلاش برای دستیابی به دستورالعمل‌های عملی برای انجام صحیح یوتانازی در موش‌های صحرایی و سایر حیوانات آزمایشگاهی توسط انجمن مراقبت از حیوانات کانادا[1] [۱۱] و انجمن پزشکی دامپزشکی آمریکا[2] در ویرایش‌های مختلف منتشر شده است [۱۲]. در میان روش‌های ذکر شده، یوتانازی موش‌های صحرایی با استفاده از دی اکسید کربن (CO_2) یک روش متداول بوده [۱۳] و هدف از مطالعه مروری حاضر بررسی روش انجام یوتانازی باتجویز CO_2 در موش‌های صحرایی با تأکید بر مزیت‌ها و معایب آن و در نهایت ارائه دستورالعمل کاربردی برای انجام آن است.

روش بررسی

این مطالعه به روش مروری انجام شده است. به منظور شناسائی اصول، استانداردها و دستورالعمل‌های لازم برای ایجاد یوتانازی در موش‌های صحرایی با تجویز CO_2، جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی بین‌المللی شامل پابمد، گوگل اسکالر و ساینس دایرکت انجام شد. فرایند جستجو در این پایگاه‌ها با استفاده از کلمات کلیدی یوتانازی، CO_2 و موش صحرائی انجام گردید. مقالات معتبر در این حوزه جمع‌آوری و مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در انتخاب مقالات محدودیت زمانی اعمال نشد ولی معیارهای ورود به مطالعه به این شرح بود: ۱) مقالات به زبان انگلیسی یا فارسی باشند؛ ۲) موضوع اصلی یا بخشی از مطالعه در مورد روش یوتانازی باشد؛ ۳) مقالات در مورد روش یوتانازی در موش‌های صحرائی باشد.

یافته‌ها

روش‌های انجام یوتانازی

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، روش‌های انجام یوتانازی را می‌توان به شیمیایی و فیزیکی تقسیم کرد. روش‌های شیمیایی به دو نوعِ استفاده از گازهای استنشاقی و داروهای تزریقی تقسیم می‌شوند. از مهمترین گازهای استنشاقی می‌توان به فلوروکربن هالوژنه و CO_2 و از مهمترین

1. Canadian Council on Animal Care (CCAC)

2. American Veterinary Medical Association (AVMA)

جدول ۱- تقسیم‌بندی انواع روش‌های انجام یوتانازی: مکانیسم ایجاد، معایب و مزایا

روش		مکانیسم ایجاد یوتانازی	مزایا	معایب
شیمیایی گازهای استنشاقی	دی اکسید کربن	سرکوب مستقیم سیستم عصبی و متعاقباً ایجاد نارسایی تنفسی و قلبی-عروقی	سریع، عملی و اقتصادی، انجام همزمان در حیوانات متعدد، غیرقابل اشتعال و انفجار	ایجاد شرایط ناخوشایند در غلظت بالا، ایجاد استرس، زمان مرگ طولانی در جنین
	فلوروکربن‌های هالوژنه* [۱۲، ۱۷-۱۴]	سرکوب سیستم‌های قلبی- عروقی و تنفسی؛ بیهوشی و مرگ	متداول، آسان و سریع، امکان انجام همزمان در چند حیوان	نارکوز، وابستگی جسمی برای کارگران، نیاز به تجهیزات، ایجاد شرایط ناخوشایند
	مونوکسید کربن [۲۰-۱۸]	ترکیب شدن با هموگلوبین و جلوگیری از اتصال اکسیژن	بی‌بو، القای سریع مرگ	ایجاد اضطراب و تشنج در حیوان، خطرناک برای کارکنان، سمی و غیر قابل تشخیص، خطر انفجار در غلظت‌های بالای ۱۰٪
	نیتروژن و آرگون [۲۱، ۲۲]	کاهش نسبی فشار اکسیژن در خون، بیهوشی در حدود ۹۰ و ۹۳ ثانیه بعد از مواجهه و مرگ بعد از ۳ و ۷ دقیقه	بی‌بو، عدم اشتعال‌پذیری، انفجار	ایجاد هیپوکسی، ایجاد استرس و ایجاد شرایط ناخوشایند در موش صحرایی، تاکی‌کاردی طولانی و اسپاسم عضلانی، حساس شدن زیاد موش صحرایی به لمس و هندلینگ
داروهای تزریقی	باربیتورات‌ها** [۱۰، ۱۴، ۲۳، ۲۴]	کاهش عملکرد سیستم عصبی مرکزی و توقف سیستم تنفسی و قلبی در عرض چند دقیقه	ساده، ارزان، ایمن، سریع	عدم کاربرد برای کشتن دسته جمعی، نیاز به مهارت هندلینگ و مقید کردن حیوان، خطر سوء استفاده انسانی
	کلرید پتاسیم [۱۲]	ایست قلبی در عرض چند ثانیه با تزریق داخل وریدی (۷۵-۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	سریع، قابل اعتماد	درد بسیار شدید، نیاز به بیهوشی و بی دردی قبلی
فیزیکی	ضربه به سر [۱۲، ۲۵]	خونریزی گسترده مغزی و سرکوب سریع سیستم عصبی مرکزی و برقراری سریع بیهوشی	سریع، ایمن، عدم ایجاد درد	نیاز به مهارت زیاد، زمان‌بر از جهت یادگیری توسط فرد انجام دهنده، ناخوشایند از نظر ظاهری و عدم توصیه برای جوندگانِ بیشتر از یک کیلوگرم
	شکستن مهره‌های گردن [۱۴; ۲۵; ۲۶].	صدمات گسترده به ساقه مغز ، بیهوشی و مرگ فوری	متداول برای کشتن جوندگان کوچک (زیر ۱۵۰ گرم)	نیاز به مهارت زیاد، زمان‌بر از جهت یادگیری توسط فرد انجام دهنده، عدم کاربرد در موش‌های صحرایی بزرگتر به علت وجود توده عضلانی بزرگ در ناحیه گردن
	مایکروویو [۱۲]	هدایت مستقیم امواج به سمت سر و افزایش درجه حرارت مغز تا ۸۰-۹۰ درجه سلسیوس، از دست رفتن هوشیاری و توقف تمام فرایندهای مغزی در عرض چند صد میلی ثانیه	سریع و ایمن، روش ارجح در اندازه‌گیری مواد شیمیایی نشاندار شده در مغز	نیاز به تجهیزات اختصاصی
	قطع کردن سر [۳۰-۲۷]		سریع و ارزان، به دست آوردن نمونه‌های بافتی دست نخورده خصوصاً از مغز	احتمال آسیب به کارکنان در استفاده از گیوتین، اثر بر آندروژن‌های سرمی در موش صحرایی
	انجماد سریع [۲۵]		قابل استفاده برای جنین و نوزادان کوچک فاقد مو	عدم قابلیت کاربرد در حیوانات بزرگتر، انجماد با قرار دادن حیوان روی یخ خشک به دلیل آهسته بودن روند انجماد و همچنین انجماد بدون بیهوشی توصیه نمی‌شود

* اولویت با استفاده از ایزوفلوران، هالوتان و آنفلوران است.

** داروی ارجح پنتوباربیتال سدیم با تجویز داخل وریدی با دوز ۱۲۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است

داروهای تزریقی می‌توان به باربیتورات‌ها اشاره کرد. از مهمترین روش‌های فیزیکی برای انجام یوتانازی می‌توان به قطع کردن سر[1]، شکستن مهره‌های گردن[2] و استفاده از پرتوهای مایکروویو اشاره نمود [۱۲]. روش‌های فیزیکی اگر به درستی انجام شوند، ارزان و بدون درد هستند و هیچ گونه دارویی در بقایای حیوان باقی نمی‌گذارند. به علاوه، حیوانات احتمالاً به دلیل زمان کم و همچنین عدم استفاده از مواد شیمیایی محرک، ترس و اضطراب کمتری را نسبت به روش‌های شیمیایی که نیاز به انجام مقدمات دارند، تجربه می‌کنند. با این حال، روش‌های فیزیکی باید به طرز ماهرانه اجرا شوند و معمولاً نیاز به ارتباط مستقیم اُپراتور با حیوانات دارند که می‌تواند ناراحت کننده باشد [۱۲].

معیارهای یوتانازی ایده‌آل

ویژگی‌های یک یوتانازی ایده‌آل توسط AVMA ارائه شده است [۱۲]. از مهمترین معیارهای یوتانازی ایده‌آل، توانایی القاء سریع بیهوشی و مرگ با حداقل درد و پریشانی است. همچنین روش یوتانازی باید برگشت‌ناپذیر بوده، قابلیت اطمینان بالایی داشته باشد و برای کارکنان انجام دهنده از نظر جسمی و عاطفی مضر نباشد. از دست دادن هوشیاری باید مقدم به از دست دادن حرکت عضلات باشد. بنابراین داروهایی مانند سوکسینیل‌کولین، استریکنین، نیکوتین، پتاسیم یا نمک‌های منیزیم که منجر به فلج عضلات می‌شوند به عنوان داروهای یوتانازی قابل قبول نیستند [۱۰، ۳۱].

مکانیسم‌های اثر روش‌های یوتانازی

سه مکانیسم عمده روش‌های یوتانازی شامل هیپوکسی،

1. Decapitation
2. Cervical dislocation

سرکوب سلول‌های عصبی مغز و تخریب فیزیکی مغز است. هیپوکسی معمولاً با قرار گرفتن حیوانات در غلظت بالای گازهایی مانند ازت، آرگون و یا مونوکسیدکربن ایجاد می‌شود [۳۲]. در روش سرکوب سلول‌های عصبی، مرگ به دنبال از دست دادن هوشیاری ناشی از سرکوب مستقیم مراکز تنفسی رخ می‌دهد. تخریب فیزیکی مغز، از طریق ضربه به جمجمه و یا تخریب مستقیم مغز ایجاد می‌گردد [۳۲].

اگرچه نکته اصلی در استفاده از روش‌های مختلف یوتانازی انسانی بودن آن است، اما اگر بعد از یوتانازی قصد استفاده از بافت‌ها یا نمونه‌های خونی حیوان وجود دارد، روش مورد استفاده در یوتانازی باید به دقت انتخاب شود تا نتایج مطالعه را متأثر نکند. برای مطالعات ریوی و احشای شکمی [۳۳]، حرکت اسپرم‌ها [۳۴] و اندازه‌گیری سطح سرمی گلوکز و کلسترول [۳۰]، یوتانازی موش‌های صحرایی با CO_2 روش مناسبی است؛ چرا که سایر روش‌های یوتانازی تا حد زیادی می‌توانند بر پارامترهای ذکر شده تأثیر بگذارند. اگر هدف بررسی سطح‌تری گلیسرید سرم [۲۳]، حجم هموگلوبین [۳۵]، لکوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها [۳۵]، و بررسی مسیرهای متابولیسم کبد (شامل بررسی مسیر سنتز گلیکوژن و مسیر گلیکولیتیک) باشد استفاده از CO_2 پیشنهاد نمی‌گردد [۳۶].

یوتانازی با استفاده از CO_2

یوتانازی موش‌های صحرایی با CO_2 یک روش رایج و پیشنهادی است [۱۳]. این روش سریع، عملی و اقتصادی محسوب می‌شود و به ویژه هنگامی که یوتانازیِ تعداد زیادی از حیوانات مورد نیاز باشد مناسب است. همچنین CO_2غیرقابل اشتعال و انفجار بوده و در صورت استفاده از تجهیزات با طراحی صحیح حداقل خطر را برای کارکنان ایجاد می‌کند. مکانیسم عمل CO_2 برای ایجاد یوتانازی به این صورت است که در غلظت بالا از طریق اسیدوز داخل سلولی باعث آپنه و توقف عملکرد قلب و از بین رفتن هوشیاری می‌گردد [۳۷]. در واقع، اسیدوز شدید فعالیت پاراسمپاتیک را افزایش می‌دهد که از طریق سرکوب مستقیم سیستم عصبی و متعاقباً با ایجاد نارسایی تنفسی و قلبی–عروقی منجر به مرگ می‌گردد [۱۲]. گزارش شده است که CO_2 می‌تواند منجر به هیپوکسی و احساس خفگی در حیوانات نیز بشود [۳۸].

برای انجام یوتانازی حداقل عواملی که باید مدنظر باشن عبارتند از تعیین روش تجویز CO_2، اتاقک تجویز CO_2، غلظت و سرعت جریان تجویز CO_2، مدت زمان لازم برای انجام یوتانازی، تأیید یوتانازی و دفع لاشه حیوان بعد از یوتانازی که به ترتیب در زیر بحث می‌شوند.

تعیین روش انجام یوتانازی با استفاده از CO_2

دو روش برای تجویز CO_2 وجود دارد: ۱) قرار دادن حیوان در محفظه بسته‌ای که از قبل با غلظت زیاد CO_2 پر شده است؛ و ۲) افزایش تدریجی غلظت CO_2 در محفظه. اگر حیوان از ابتدا در معرض غلظت بالایی از CO_2 قرار گیرد، از دست دادن هوشیاری سریعتر خواهد بود. با این حال قرار گرفتن اجباری در معرض غلظت‌های زیاد ناخوشایند است. به طوری که شاید افزایش تدریجی غلظت CO_2 اخلاقی‌تر باشد. با این حال نظرات مختلفی راجع به این دو روش وجود دارد؛ گفته شده که غلظت‌های بالای CO_2 با وجود اینکه باعث از دست دادن سریع هوشیاری می‌شود ولی موش صحرایی قبل از بیهوشی دچار استرس می‌گردد. ولی به علت کوتاه بودن دوره استرس برخی این روش را قابل قبول می‌دانند [۳۹]. از طرفی افزایش تدریجی غلظت CO_2 استرس کمتری در موش صحرایی ایجاد می‌کند ولی منجر به افزایش زمان لازم برای بیهوشی می‌گردد [۳۷، ۴۰]. در کل، پیشنهاد شده است غلظت CO_2 آهسته افزایش یابد، زیرا اجازه می‌دهد حیوان ابتدا به خواب برود و سپس مرگ را تجربه کند که استرس کمتری را متحمل می‌شود [۱۲]. پس از ۲۰ تا ۲۵ ثانیه قرار گرفتن در معرض CO_2 با غلظت ۱۰۰٪ ، افزایش ۱۰ برابری در غلظت وازوپرسین و اُکسی‌توسین [۴۱] و بعد از ۳۰ ثانیه، افزایش سطح پلاسمائی نوراپی‌نفرین مشاهده می‌شود [۴۲]. افزایش تدریجی

غلظت CO_2 درد کمتری قبل از بیهوشی ایجاد می‌کند و خصوصاً غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰٪ معمولاً باعث بروز درد در موش صحرایی نمی‌شوند [۴۳، ۴۴]. در یک مطالعه، به دنبال قرار گرفتن موش صحرایی در معرض غلظت‌های فزاینده CO_2 (۱۸٪ به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۰٪ به مدت ۷۵ ثانیه و ۵۵٪ به مدت ۱۲۰ ثانیه) هیچ‌گونه استرس آشکاری (بر مبنای اندازه‌گیری رفتار و غلظت هورمون آدنوکورتیکوتروپین، گلوکز و کورتیکواسترون در سرم) مشاهده نشد [۱۳]. برای مقایسه روش‌های تجویز CO_2، در مطالعه دیگری از محفظه‌های مختلف برای یوتانازی استفاده شد به این صورت که ۱) حیوانات درون یک جعبه که مملو از CO_2 بود قرار گرفتند؛ ۲) CO_2 با سرعت بالا جریان یافت؛ ۳) CO_2با سرعت کم جریان یافت؛ و ۴) مخلوطی از CO_2 و اکسیژن با سرعت بالا جریان یافتند. کوتاه‌ترین زمان رسیدن به الگوی ناهنجار فعالیت الکتریکی مغز و ضربان غیرطبیعی قلب در موش‌های صحرایی گزارش شد که در جعبه پر از CO_2 خالص قرار گرفتند، هنگامی که CO_2 با سرعت بالا به تنهایی یا در ترکیب با اکسیژن وارد محفظه شد زمان طولانی‌تر شد و طولانی‌ترین زمان رسیدن به این نقطه زمانی بود که CO_2 به آرامی درون جعبه جریان می‌یافت [۲۰].

اتاقک تجویز CO_2

یکی از شرایط مهم برای یوتانازی موش‌های صحرایی ایجاد یک قفس یا اتاقک برای تجویز CO_2 است. در مطالعات مختلف از اندازه‌های مختلف اتاقک برای یوتانازی موش صحرایی استفاده شده است [۴۷-۴۵]. براساس دستورالعمل دانشگاه بوستون، برای یوتانازی موش صحرایی با CO_2، اتاقک ۲۸ لیتری با ارتفاع، عرض و طول ۲۵/۴، ۲۲/۸۶ در ۴۸/۲۶ سانتیمتر مورد نیاز است. از این اتاقک می‌توان برای یوتانازی ۲ موش صحرایی با وزن زیر ۵۰۰ گرم استفاده کرد [۴۸]. در اتاقک یوتانازی معمولاً دو منفذ وجود دارد که اولی در قسمت پایین اتاقک برای ورود CO_2 تعبیه می‌شود و دومی در بالای اتاقک برای کاهش فشار و جابه جایی هوای اتاقک مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴۹]. البته اگر درِ بالایی اتاقک کاملاً مهرو موم نباشد دیگر نیازی به منفذ بالایی اتاقک برای جابجایی هوای اتاقک وجود ندارد؛ چرا که تهویه کافی و خروج کافی هوای داخل اتاقک انجام می‌شود.

جنس پیشنهادی برای این اتاقک، آکواریوم شیشه‌ای یا جعبه آکریلیک است ولی می‌توان از جعبه‌های پلاستیکی نیز استفاده کرد و باید داخل آن قابل مشاهده باشد [۱۲]. قابل ذکر است که باید فضای کافی برای خوابیدن حیوان در اتاقک وجود داشته باشد، در زمان انجام یوتانازی موش‌های صحرایی از قفس‌های مختلف باهم مخلوط نشوند، همچنین اتاقک یوتانازی باید تمیز باشد [۱۲].

سرعت جریان تجویز CO_2 برای ایجاد یوتانازی

طبق دستورالعملAVMA یک جریان بهینه برای سیستم‌های یوتانازی CO_2 باید ۱۰ تا ۳۰٪ از محفظه یا حجم قفس را در دقیقه جابجا کند تا درد و پریشانی به حداقل برسد [۱۲]. این مقدار، غلظت CO_2 را آهسته افزایش داده و صدا ایجاد نمی‌کند یا به عنوان یک باد شدید برای حیوانات تلقی نمی‌شود. برای محاسبه میزان جریان CO_2 در هر دقیقه به ترتیب زیر عمل می‌شود. ابتدا حجم محفظه برای یوتانازی بر حسب لیتر (۱۰۰۰ سانتیمتر مکعب) محاسبه می‌گردد سپس به منظور جابه‌جائی تدریجی ۲۰٪ی (بین ۱۰ تا ۳۰٪) CO_2 در محفظه، حجم قفس بر حسب لیتر در ۲۰٪ ضرب می‌شود تا سرعت جریان CO_2 به دست آید. مثلاً در یک محفظه ۲۸ لیتری (قفس موش استاندارد با ارتفاع و عرض و طول ۲۵/۴ در ۲۲/۸۶ در ۴۸/۲۶ سانتی متر)، باید ۵/۶ لیتر در دقیقه CO_2 وارد قفس شود تا ۲۰٪ از حجم محفظه در دقیقه توسط CO_2 تعویض گردد. اگر اندازه اتاقک متفاوت از اتاقک پیشنهادی باشد، محاسبه تعیین سرعت جریان تجویز CO_2 برای ایجاد غلظت مناسب برای یوتانازی باید با توجه به اندازه اتاقک انجام شود.

مدت زمان لازم برای یوتانازی

جریان محاسبه شده در قسمت بالا حداقل برای دو دقیقه باید برقرار باشد تا بیهوشی در موش ایجاد شود (تا ۵ دقیقه هم توصیه می‌شود). از آنجا که وقتی سطح گاز به ۴۰ تا ۵۰٪ افزایش یابد، بیهوشی رخ می‌دهد در این مرحله، می‌توان جریان گاز را افزایش داد و سریع‌تر محفظه را پر کرد تا زمان مرگ کاهش یابد. جریان CO_2 باید حداقل برای یک دقیقه پس از توقف تنفس حفظ شود [۴۶]. اگر CO_2 با جریان ۲۰٪ از حجم محفظه در دقیقه داده شود، پیش‌بینی می‌شود که غلظت گاز CO_2 که وارد محفظه شود باعث افزایش غلظت CO_2 از صفر به ۶۳/۲٪ در ۵ دقیقه، به ۸۶/۵٪ در ۱۰ دقیقه و به ۹۵٪ در ۱۵ دقیقه شود [۴۵، ۵۰]. بنابراین زمان بیهوشی با CO_2 به میزان جابجایی و غلظت آن و همچنین حجم ظرف بستگی دارد.

منبع تأمین کننده گاز CO_2

گاز CO_2 فشرده شده در سیلندرها، منبع توصیه شده CO_2 هستند زیرا ورود گاز به محفظه را می توان دقیقاً تنظیم کرد. یخ خشک، خاموش کننده آتش یا مواد شیمیایی دیگر به عنوان منبع CO_2 مجاز نیستند [۱۴]. همچنین منبع تهیه CO_2 باید به صورت خالص و بدون آلودگی تهیه شود، به طور معمول از یک شرکت معتبر باشد. تجهیزات دارای نشتی یا معیوب ممکن است منجر به مرگ آهسته و پریشانی شوند و برای سایر حیوانات و کارکنان خطرناک باشد [۱۲].

تأیید یوتانازی و دفع موش‌های صحرایی

بعد از یوتانازی و قبل از دفع لاشه حیوان باید مرگ تأیید شود. ترکیبی از معیارها برای تأیید مرگ استفاده می‌شود مانند عدم وجود نبض و تنفس، سفید شدن چشم، رفلکس قرنیه، عدم پاسخ به فشردن محکم پنجه و سخت شدن بدن. هیچ یک از این علایم به تنهایی، به جز سخت شدن بدن، مرگ را تأیید نمی‌کند. قطع تنفس، چشم سفید شده، قطع ضربان قلب و عدم وجود رفلکس‌ها نشانگر خوبی از مرگ غیر قابل برگشت در موش صحرایی است [۲۵]. صرف نظر از نوع روش یوتانازی انتخاب شده، لاشه حیوانات باید به طور مناسب و مطابق با قوانین محلی دفع شود. مقررات نه تنها در مورد نحوه از بین بردن بقایای حیوانات (به عنوان مثال دفن یا سوزاندن) وجود دارد بلکه برای مدیریت باقیمانده‌های شیمیایی حاصل (به عنوان مثال بقایای حیوانات حاوی پنتوباربیتورات‌ها که برای برخی پرندگان سمی هستند) نیز ارائه شده است [۵۱].

یوتانازی جنین و نوزاد تازه متولد شده با روش CO_2

در مورد جنین با سن کمتر از ۱۵ روز، کشتن مادر برای مرگ سریع جنین کافی است [۳۰] و برای زندگی نوزادی اگر از روش CO_2 استفاده شود، نیاز است مدت زمان در معرض قرار گرفتن تا۵۰ دقیقه افزایش یابد و همچنین نیاز به سطح بالاتری از CO_2 تا ۱۰۰٪ وجود دارد [۵۲، ۵۳]. همچنین CO_2 نباید به عنوان تنها وسیله یوتانازی در نوزادان استفاده شود و باید با روش‌های ثانویه قابل قبول یوتانازی به عنوان مثال قطع کردن سر، شکستن گردن و یا توراکوتومی دو طرفه دنبال شود تا مرگ حیوان تضمین شود [۳۰].

معایب استفاده از CO_2 برای انجام یوتانازی

استفاده از CO_2 معایبی نیز دارد که قبل از استفاده باید مورد توجه قرار گیرد. گازهای استنشاقی از جمله CO_2 برای تأثیر نیاز به حداقل غلظت بحرانی درون آلوئول‌ها و خون دارند [۵۴] و عمدتاً با توجه به تأخیر در شروع بیهوشی، منجر به ایجاد شرایط ناخوشایند و استرس در حیوانات می‌گردند که معمولاً به صورت تغییر رفتار (مثل فرار کردن) و یا تغییرات فیزیولوژیک (مثل افزایش ضربان قلب) مشاهده می‌شود [۵۵]. ایجاد استرس و شرایط ناخوشایند در موش صحرایی به دنبال استفاده از CO_2، با غلظت CO_2 استفاده شده و مدت زمان در معرض قرار دادن حیوانات با CO_2 در ارتباط است به طوری که در موش‌های صحرایی استنشاق CO_2 با غلظت ۷/۵٪ آستانه درد را افزایش می‌دهد [۳۷]. هنگامی که غلظت CO_2 به ۱۳ تا ۱۸٪ می‌رسد شرایط ناخوشایند برای موش صحرایی

شروع می‌گردد [۵۵، ۵۶]. یک دقیقه بعد از قرار گرفتن در معرض CO_2 با غلظت حدود ۳۰٪، یکی از علایم اجتناب بروز پیدا می‌کند [۵۶]. غلظت بالای ۳۰ و ۴۰٪ به ترتیب منجر به بیهوشی [۴۶] و تحریک گیرنده‌های درد می‌گردد [۵۷، ۵۸]. در نهایت غلظت ۷۰٪ در حدود ۴۰ تا۵۰ ثانیه و غلظت ۱۰۰-۸۰٪ در عرض ۱۰ تا ۳۹ ثانیه باعث بروز آپنه، برادی‌کاردی و بیهوشی در موش صحرایی می‌شود اما چون درد زیادی را تا زمان از دست رفتن هوشیاری تحمیل می‌کنند، مورد تأیید نیست [۱۸، ۲۰]. بنابراین در حالت کلی CO_2 در غلظت ۵۰-۳۰٪ (سطح کافی برای ایجاد بیهوشی در حیوانات) ناخوشایند و پریشان کننده است و در غلظت‌ها بالاتر از ۷۰٪ (سطح کافی برای کشتن حیوانات) دردناک است [۱۷].

مطالعات در موش صحرایی نشان می‌دهد که تجویز CO_2 فعالیت نورون‌های مربوط به درد را افزایش می‌دهد [۵۸]. CO_2 ازطریق سه مکانیسم مختلف می‌تواند باعث ایجاد استرس و درد در موش صحرایی گردد: ۱) درد ناشی از تشکیل اسیدکربنیک روی مخاط‌های تنفسی و چشمی؛ ۲) ایجاد تنگی نفس و به اصطلاح گرسنگی هوا؛ و ۳) تحریک مستقیم آمیگدال که همراه با پاسخ استرسی است [۳، ۵۴]. علت اصلی ناخوشایند بودن استفاده از CO_2 مربوط به تحریک غشای مخاط بینی ناشی از تشکیل اسید کربنیک است [۱۶، ۵۹]. با این وجود، گزارش شده که CO_2 به سرعت از مسیر تنفسی عبور کرده و قبل از تحریک تنفسی منجر به بیهوشی می‌گردد [۶۰]. CO_2 در غلظت‌های بالا که منجر به بیهوشی می‌شود، برای موش صحرایی ناخوشایند بوده، ایجاد حالت خفگی و استرس کرده و به احتمال زیاد قبل از بیهوشی، درد و پریشانی قابل توجهی را به همراه دارد [۱۷].

اضافه کردن اکسیژن به CO_2 برای انجام یوتانازی

اضافه کردن اکسیژن اثرات منفی CO_2 شامل اثرات تحریکی بر مجرایی تنفسی را از بین می‌برد؛ اما فاصله زمانی بین از دست رفتن هوشیاری و مرگ را طولانی می‌کند [۲۰]. از طرف دیگر گزارش شده که اکسیژن نه تنها نتوانسته میزان شرایط ناخوشایند ناشی از CO_2را کاهش دهد [۱۷] بلکه منجر به افزایش درد، هماچوری و ادم ریه در موش‌های صحرایی شده است [۳۹]. شرایط ناخوشایند CO_2 ممکن است به دلیل شروع سریع تحریک غشاهای مخاطی و سخت نفس کشیدن باشد، نه به دلیل هیپوکسی [۱۷] و افزودن اکسیژن به CO_2 فقط زمان مرگ را طولانی‌تر (دو برابر) [۴۶] و تشخیص هوشیاری را پیچیده‌تر می‌کند. بنابراین به نظر می‌رسد هیچ مزیتی برای ترکیب اکسیژن با CO_2 برای ایجاد یوتانازی وجود ندارد [۱۲، ۴۰].

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب گفته شده، دستورالعمل انجام یوتانازی با روش تجویز CO_2 در جدول ۲ آورده شده است.

یوتانازی با تجویز CO_2 در موش صحرایی روشی متداول، ساده و قابل دسترس بوده و انجام آن نیاز به تجهیزات پیشرفته و آموزش زیاد ندارد. با توجه به دستورالعمل ارائه شده در مطالعه حاضر، روش تدریجی تجویز CO_2 در اتاقک با حجم ۲۸ لیتر با سرعت جریان ۵/۶ لیتر در دقیقه برای یوتانازی دو موش صحرایی با وزن کمتر از ۵۰۰ گرم توصیه می‌شود. این جریان تدریجی باید به مدت ۲ تا ۵ دقیقه برای ایجاد بی حسی و مرگ ادامه یابد و پیشنهاد می‌شود حداقل برای یک دقیقه بعد از مشاهده علایم مرگ شامل عدم تنفس و رنگ چشم محو شده نیز ادامه داشته باشد. امید است استفاده از این دستورالعمل برای یوتانازی در موش‌های صحرایی گامی در جهت انجام ارتقای پژوهش‌های اخلاق محور در کشور باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1399.002 مصوب پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است.

جدول ۲- مراحل انجام یوتانازی با استفاده از دی‌اکسیدکربن در موش‌های صحرایی

۱- قبل از انجام یوتانازی
۱-۱- انتقال موش‌های صحرایی به محل مخصوص برای انجام یوتانازی
• محل جدا از جراحی و نگهداری حیوانات
۱-۲- قرار دادن موش‌های صحرایی در اتاقک مخصوص یوتانازی
• اتاقک پیشنهادی برای ۲ موش صحرائی با ارتفاع و عرض و طول ۲۵/۴ در ۲۲/۸۶ در ۴۸/۲۶ سانتیمتر
• عدم ترکیب موش‌ها از قفس‌های مختلف
• عوض کرن پوشال داخل اتاقک برای هر سری یوتانازی
۲- حین انجام یوتانازی
۲-۱- تنظیم جریان دی اکسد کربن لازم برای یوتانازی
• جریان بهینه: جابجایی ۲۰٪ (۱۰٪ تا ۳۰٪) از حجم هوای اتاقک مخصوص یوتانازی با CO_2 که برای این منظور لازم است ۵/۶ لیتر در دقیقه CO_2 از کپسول وارد اتاقک شود. این جریان باید تا انتهای یوتانازی ثابت بوده و مدام چک گردد.
۲-۲- تنظیم مدت زمان لازم برای انجام یوتانازی
• جریان حساب شده در قسمت بالا حداقل برای دو دقیقه باید برقرار باشد تا بیهوشی در موش ایجاد شود (تا ۵ دقیقه هم توصیه می‌شود). جریان باید حداقل برای یک دقیقه پس از توقف تنفس حفظ شود.
۳- بعد از انجام یوتانازی
۳-۱- تأیید یوتانازی
• ترکیبی از معیارها شامل عدم وجود نبض، تنفس، رفلکس قرنیه، عدم پاسخ به فشردن محکم پنجه، و سخت شدن بدن استفاده می‌شود. هیچ یک از این علائم به تنهایی، به جز سخت شدن بعد از مرگ، مرگ را تأیید نمی‌کند.
۳-۲- از بین بردن جسد موش‌های صحرائی
• قرار دادن حیوان در پلاستیک مخصوص لاشه و زدن برچسب مخصوص بر روی آن
• از بین بردن بقایای لاشه به وسیله دفن یا سوزاندن با توجه به قوانین محلی

تعارض در منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

سهم نویسندگان

همه نویسندگان در ارائه ایده و طرح اولیه، بررسی متون، نگارش اولیه مقاله و بازنگری آن سهیم بودند و همه با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

منابع مالی

هیچ گونه هزینه و منابع مالی در تحقیق مروری حاضر وجود نداشته است. مطالعه حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد پژوهان ۲۱۹۲۹ و کد طرح ۹۹۰۳۲ است.

References

1. Taylor K, Gordon N, Langley G, Higgins W. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. Alternatives to laboratory animals. 2008;36(3):327-342. doi:10.1177/026119290803600310
2. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. International journal of preventive medicine. 2013;4(6):624-630.
3. Bahadoran Z, Mirmiran P, Kashfi K, Ghasemi A. Importance of systematic reviews and meta-analyses of animal studies: Challenges for animal-to-human translation. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2020;59(5):469-477. doi:10.30802/aalas-jaalas-19-000139
4. Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. Biomedicine & pharmacotherapy. 2017;95:605-613. doi:10.1016/j.biopha.2017.08.098
5. Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. EXCLI journal. 2020;19:89-107. doi:10.17179/excli2019-1990
6. Jeddi S, Ghasemi A, Zahediasl S. A review of models of hypothyroidism in the rat: comparison of the thyroid function in rats and humans. Iranian journal of endocrinology and metabolism. 2014;16(1):47-56. [Persian]

7. Reilly J. Euthanasia of animals used for scientific purposes. Adelaide University: Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching Department of Environmental Biology; 2001.
8. Ghasemi A. Ethical principles for using laboratory rat in scientific researches. Ethics in science & technology 2019;14(2):8-12. [Persian]
9. Smith A, Houpt K, Kitchell R, Kohn D, McDonald L, Passaglia M, et al. Report of the AVMA panel on euthanasia. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1986;188(3):252-268.
10. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. Laboratory animals. 1996;30(4):293-316. doi:10.1258/002367796780739871
11. Charbonneau R, Niel L, Olfert E, von Keyserlingk M, Griffin G. CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. 2010.
12. Leary SL, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, et al. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. 2013.
13. Hackbarth H, Küppers N, Bohnet W. Euthanasia of rats with carbon dioxide--animal welfare aspects. Laboratory animals. 2000;34(1):91-96. doi:10.1258/002367700780578055
14. Tatlisumak T, Fisher M. Handbook of experimental neurology: methods and techniques in animal research. Cambridge university press; 2006.
15. Booth NH, McDonald LE, Jones LM. Veterinary pharmacology and therapeutics. 6th ed ed1988.
16. Leach MC, Bowell VA, Allan TF, Morton DB. Degrees of aversion shown by rats and mice to different concentrations of inhalational anaesthetics. The veterinary record. 2002;150(26):808-815. doi:10.1136/vr.150.26.808
17. Leach M, Bowell V, Allan T, Morton D. Measurement of aversion to determine humane methods of anaesthesia and euthanasia. Animal welfare-potters bar then wheathampstead-. 2004;13:S77-S86. doi:10.1016/j.applanim.2009.10.001
18. Valentim AM, Guedes SR, Pereira AM, Antunes LM. Euthanasia using gaseous agents in laboratory rodents. Laboratory animals. 2016;50(4):241-253. doi:10.1177/0023677215618618
19. Haldane J. The action of carbonic oxide on man. The journal of physiology. 1895;18(5-6):430-462. doi:10.1113/jphysiol.1895.sp000578
20. Coenen AM, Drinkenburg WH, Hoenderken R, van Luijtelaar EL. Carbon dioxide euthanasia in rats: oxygen supplementation minimizes signs of agitation and asphyxia. Laboratory animals. 1995;29(3):262-268. doi:10.1258/002367795781088289
21. Sharp J, Azar T, Lawson D. Comparison of carbon dioxide, argon, and nitrogen for inducing unconsciousness or euthanasia of rats. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2006;45(2):21-25.
22. Makowska IJ, Niel L, Kirkden RD, Weary DM. Rats show aversion to argon-induced hypoxia. Applied animal behaviour science. 2008;114(3-4):572-581. doi:10.1016/j.applanim.2008.04.005
23. Pierozan P, Jernerén F, Ransome Y, Karlsson O. The choice of euthanasia method affects metabolic serum biomarkers. Basic & clinical pharmacology & toxicology. 2017;121(2):113-118. doi:10.1111/bcpt.12774
24. Zatroch KK, Knight CG, Reimer JN, Pang DS. Refinement of intraperitoneal injection of sodium pentobarbital for euthanasia in laboratory rats (Rattus norvegicus). BMC veterinary research. 2017;13(1):60. doi:10.1186/s12917-017-0982-y
25. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. Laboratory animals. 1997;31(1):1-32. doi:10.1258/002367797780600297
26. Cartner SC, Barlow SC, Ness TJ. Loss of cortical function in mice after decapitation, cervical dislocation, potassium chloride injection, and CO2 inhalation. Comparative medicine. 2007;57(6):570-573.
27. Holson RR. Euthanasia by decapitation: evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents. Neurotoxicology and teratology. 1992;14(4):253-257. doi:10.1016/0892-0362(92)90004-t
28. Vanderwolf CH, Buzsaki G, Cain DP, Cooley RK, Robertson B. Neocortical and hippocampal electrical activity following decapitation in the rat. Brain research. 1988;451(1-2):340-344. doi:10.1016/0006-8993(88)90780-9
29. van Rijn CM, Krijnen H, Menting-Hermeling S, Coenen AM. Decapitation in rats: latency to unconsciousness and the 'wave of death'. PLoS One. 2011;6(1):e16514. doi:10.1371/journal.pone.0016514
30. Artwohl J, Brown P, Corning B, Stein S. Report of the ACLAM task force on rodent euthanasia. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2006;45(1):98-105.
31. 2000 report of the AVMA panel on euthanasia. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2001;218(5):669-696. doi:10.2460/javma.2001.218.669
32. Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson SA. Veterinary anesthesia and analgesia: the fifth edition of lumb and jones. John Wiley & Sons; 2015.
33. Feldman DB, Gupta BN. Histopathologic changes in laboratory animals resulting from various methods of euthanasia. Laboratory animal science. 1976;26(2 Pt l):218-221.
34. Slott VL, Linder RE, Dyer CJ. Method of euthanasia does not affect sperm motility in the laboratory rat. Reproductive toxicology. 1994;8(4):371-374. doi:10.1016/0890-6238(94)90053-1
35. Walter GL. Effects of carbon dioxide inhalation on hematology, coagulation, and serum clinical chemistry values in rats. Toxicologic pathology. 1999;27(2):217-225. doi:10.1177/019262339902700208
36. Brooks SP, Lampi BJ, Bihun CG. The influence of euthanasia methods on rat liver metabolism. Contemporary topics in laboratory animal science. 1999;38(6):19-24.
37. Kohler I, Meier R, Busato A, Neiger-Aeschbacher G, Schatzmann U. Is carbon dioxide (CO2) a useful short acting anaesthetic for small laboratory animals? Laboratory animals. 1999;33(2):155-161. doi:10.1258/002367799780578390

38. Ikeda N, Takahashi H, Umetsu K, Suzuki T. The course of respiration and circulation in death by carbon dioxide poisoning. Forensic science international. 1989;41(1-2):93-99. doi:10.1016/0379-0738(89)90240-5
39. Danneman PJ, Stein S, Walshaw SO. Humane and practical implications of using carbon dioxide mixed with oxygen for anesthesia or euthanasia of rats. Laboratory animal science. 1997;47(4):376-385.
40. Hewett TA, Kovacs MS, Artwohl JE, Bennett BT. A comparison of euthanasia methods in rats, using carbon dioxide in prefilled and fixed flow rate filled chambers. Laboratory animal science. 1993;43(6):579-582.
41. Reed B, Varon J, Chait BT, Kreek MJ. Carbon dioxide-induced anesthesia results in a rapid increase in plasma levels of vasopressin. Endocrinology. 2009;150(6):2934-2939. doi:10.1210/en.2008-1408
42. Borovsky V, Herman M, Dunphy G, Caplea A, Ely D. CO2 asphyxia increases plasma norepinephrine in rats via sympathetic nerves. The American journal of physiology. 1998;274(1):R19-R22. doi:10.1152/ajpregu.1998.274.1.R19
43. Hawkins P, Prescott MJ, Carbone L, Dennison N, Johnson C, Makowska IJ, et al. A good death? Report of the second newcastle meeting on laboratory animal euthanasia. Animals (Basel). 2016;6(9). doi:10.3390/ani6090050
44. Yavari P, McCulloch PF, Panneton WM. Trigeminally-mediated alteration of cardiorespiratory rhythms during nasal application of carbon dioxide in the rat. Journal of the autonomic nervous system. 1996;61(2):195-200. doi:10.1016/s0165-1838(96)00072-0
45. Niel L, Weary DM. Behavioural responses of rats to gradual-fill carbon dioxide euthanasia and reduced oxygen concentrations. Applied animal behaviour science. 2006;100(3-4):295-308. doi:10.1016/j.applanim.2005.12.001
46. Smith W, Harrap SB. Behavioural and cardiovascular responses of rats to euthanasia using carbon dioxide gas. Laboratory animals. 1997;31(4):337-346. doi:10.1258/002367797780596130
47. Gwynne BJ, Wallace J. A modified anaesthetic induction chamber for rats. Laboratory animals. 1992;26(3):163-166. doi:10.1258/002367792780740620
48. Boston University Research Support, . Carbon Dioxide Euthanasia for Rats and Mice (BU ASC Guidelines). Boston University Research Support; Boston, MA: 2019, Available from: https://www.bu.edu/researchsupport/compliance/animal-care/working-with-animals/euthanasia/carbon-dioxide-euthanasia-for-rats-and-mice/Revised May 2019.
49. Wong D, Makowska IJ, Weary DM. Rat aversion to isoflurane versus carbon dioxide. Biology letters. 2013;9(1):20121000. doi:10.1098/rsbl.2012.1000
50. Meyer RE. Principles of carbon dioxide displacement. Lab animal. 2008;37(6):241-242. doi:10.1038/laban0608-241
51. Bagsby C, Saha A, Goodin G, Siddiqi S, Farone M, Farone A, et al. Stability of pentobarbital in soil. Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes. 2018;53(3):207-213. doi:10.1080/03601234.2017.1406714
52. Pritchett K, Corrow D, Stockwell J, Smith A. Euthanasia of neonatal mice with carbon dioxide. Comparative medicine. 2005;55(3):275-281.
53. Pritchett-Corning KR. Euthanasia of neonatal rats with carbon dioxide. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2009;48(1):23-27.
54. Boivin GP, Hickman DL, Creamer-Hente MA, Pritchett-Corning KR, Bratcher NA. Review of CO_2 as a euthanasia agent for laboratory rats and mice. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2017;56(5):491-499.
55. Makowska IJ, Weary DM. Rat aversion to induction with inhalant anaesthetics. Applied animal behaviour science. 2009;119(3-4):229-235. doi:10.1016/j.applanim.2009.04.003
56. Niel L, Weary DM. Rats avoid exposure to carbon dioxide and argon. Applied animal behaviour science. 2007;107(1-2):100-109. doi:10.1016/j.applanim.2006.08.002
57. Anton F, Peppel P, Euchner I, Handwerker HO. Controlled noxious chemical stimulation: responses of rat trigeminal brainstem neurones to CO2 pulses applied to the nasal mucosa. Neuroscience letters. 1991;123(2):208-211. doi:10.1016/0304-3940(91)90932-j
58. Peppel P, Anton F. Responses of rat medullary dorsal horn neurons following intranasal noxious chemical stimulation: effects of stimulus intensity, duration, and interstimulus interval. Journal of neurophysiology. 1993;70(6):2260-2275. doi:10.1152/jn.1993.70.6.2260
59. Conlee KM, Stephens ML, Rowan AN, King LA. Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. Laboratory animals. 2005;39(2):137-161. doi:10.1258/0023677053739747
60. Paton W. Is CO2 euthanasia humane? Nature. 1983;305:268. doi:10.1038/305268b0