

Laboratuvar Hayvanlarında Ötenazi Yöntemleri

Sedat Gökmen¹, Aylin Pehlivan², Abdurrahman Aksoy²

¹Amasya Üniversitesi, Suluova Meslek Yüksekokulu, Veteriner Bölümü, Amasya-Suluova, Türkiye

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD., Samsun, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 15.01.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 28.03.2019

Özet: Ötenazi; hayvanlarda acı, korku ve sıkıntıya sebep olmadan, insancıl bir şekilde hayatı sonlandırma eylemidir. Laboratuvar hayvanları, çeşitli kimyasal, aşı, ilaç ve gıda katkı maddeleri gibi ürünlerin sağlık üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek için yapılan araştırmalarda kullanılmaktadır. Bu araştırmaların sonunda en çok uygulanan işlemlerden biri de ötenazidir. Laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde kullanılan yöntemler kimyasal ve fiziksel olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu derlemede, laboratuvar hayvanlarında uygulanan ötenazinin tarihçesi, etik ilişkisi, etki mekanizması, kalıntıların ortadan kaldırılması ve yöntemleri hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ötenazi, Laboratuvar Hayvanı, Tarihçe, Etik, Yöntem

Euthanasia Methods in Laboratory Animals

Abstract: Euthanasia is humanitarian end-of-life action without causing pain, fear and distress in animals. Laboratory animals are used in research to evaluate the potential impacts on health in products such as various chemicals, vaccines, medicines and food additives. One of the most common operations at the end of these investigations is euthanasia. The methods used for euthanasia of laboratory animals are divided into chemical and physical methods. In this review article; history, ethical relation, mode of action, removal of remains and methods of euthanasia in laboratory animals are inform.

Key words: Euthanasia, Laboratory Animals, History, Ethics, Methods

Giriş

Tanım

Ötenazi, Yunanca “iyi” ve “ölüm” anlamına gelen sırasıyla “eu” ve “thanatos” kelimelerinin bir araya getirilmesiyle türetilmiştir. Daha geniş anlamda ötenazi; hayvanlarda acı, korku ve sıkıntıya sebep olmadan insancıl bir şekilde hayatı sonlandırma eylemidir [25]. Ötenazi, sırasıyla bilinç kaybı, dolaşım-solunumun durması ve beyin fonksiyon kaybı ile sonuçlanmaktadır [13]. Laboratuvar hayvanları, çeşitli kimyasal, aşı, ilaç ve gıda katkı maddeleri gibi ürünlerin sağlık üzerindeki kısa ve uzun süreli potansiyel etkilerini değerlendirmek için yapılan araştırmalarda kullanılmaktadır [12, 16]. Ötenazi, bilimsel araştırmalarda kan, doku ve organ elde etmek, aynı zamanda hayvanlarda ağrı, acı ve sıkıntı seviyelerini sonlandırmak için yapılır. Ötenazi yöntemi ve tekniği, araştırmalardan elde edilecek sonuçlarda ölçülecek parametreleri doğrudan; örnek toplama, zamanlama ve yer seçimi ile ilgili olarak da dolaylı şekilde etkilemektedir. Ayrıca, deney hayvanlarında çeşitli seviyelerde stres tepkisi oluş-

turabilmekte, bu da kortikosteron ve diğer endokrin sinyal moleküllerinin seviyelerini etkileyerek; biyolojik belirteç olarak kullanılabilir dokular da hedef düzeylerini etkilemektedir [7]. Evcil ve laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde kullanılan yöntemler için esaslar, Kanada Konseyi (CCAC) ve Amerikan Veteriner Hekimler Birliği (AVMA) gibi kuruluşlar tarafından sağlanmaktadır [39].

Tarihçe

İnsanlar, başlangıçta hayvanları beslenme, ulaşım ve arkadaşlık için kullanmışlardır. Deneysel araştırmalarda hayvanların kullanımı ise Aristoteles (MÖ 384-322) ve Hipokrat’ın (MÖ 460-370) insan anatomisi ve fizyolojisini araştırdığı çalışmalarla başlamıştır. Cladius Galen (MS 130-210), domuz, maymun ve üzerinde fizyolojik deneyler gerçekleştirilmiştir. Galen’den sonra, Rönesans’ın başlangıcına (~1300) kadar deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalara ara verilmiş, Avrupa’nın karanlık çağları olarak tanımlanan VII. ve XIV. yüzyıllar arasında, müslüman bilim insanları tarafından hayvanlar üzerinde,

davranış, yetiştirme, anatomi, operasyon ve tedavi ile ilgili birçok eser bilim dünyasına kazandırılmıştır. Daha sonra Andreas Vesalius'un (1514-1564) "16.Yüzyılın Anatomik Rönesans'ı" kabul edilen anatomi çalışmalarıyla devam edilmiştir. 17.yüzyılda Descartes, insanların akıl ve maddeden oluşan ve düşünebilen varlıklar, hayvanların ise düşünemeyen makineler olarak görüldüğü Kartezyen felsefesini ortaya koymuştur. 20.yüzyılda farmakoloji, toksikoloji ve immünoloji gibi bilim alanlarındaki gelişmeler ile deney hayvanlarının kullanımı daha da artmıştır [3, 12, 24].

Ötenazi ve etik ilişkisi

Deneylerde kullanılan hayvanların ağrı, ıstırap ve stresini en az düzeye indirmek gerekmektedir. Bu nedenle araştırmacılar, deney sırasında veya sonunda ve hayvanın gerçek ölümünden önce ötenazi kararı verebilirler. Buna göre ötenazi: araştırma protokolünde gerekliyse, analjezik, sedatif ve diğer tedavilerle hayvanın ağrı ve sıkıntısı giderilemiyorsa veya hayvanlar ölmek üzere ise uygulanmalıdır [20]. Ölmek üzere olan hayvanlarda görülen başlıca belirtiler; solunumun çok yavaş, yüzeysel ve çabalararak olması, hızlı kilo kaybı, duruş bozukluğu, iştahsızlık, davranış bozukluğu, kaslarda atrofi, letarji ve ayağa kalkamamasıdır. Ötenazi sonrasında elde edilecek dokuların araştırmanın amacına uygun ve kullanılabilir durumda olması gerekir, aksi takdirde hayvanların kullanımı nedensiz ve etik dışı olacaktır [32, 37]. Ötenazi yöntemi seçilirken araştırmacılar uygun ve yasaklanan yöntemleri iyi bilmelidirler. Uygulamak istenilen ötenazi yöntemi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna sunulan projede ayrıntılı olarak yazılmalı ve mutlaka etik kurul tarafından onaylanan yöntem uygulanmalıdır [11,12, 20].

Ötenazi yöntemlerinin etki mekanizmaları

Ötenazide kullanılan yöntemler üç temel mekanizma ile ölüme neden olmaktadır. Bunlar doğrudan veya dolaylı şekilde gelişen hipoksi, hayati önem taşıyan nöronların baskılanması, beyin aktivitesinin ve önemli nöronların tahrip edilmesidir [7].

Ötenazide sonucun onaylanması

Ölümün tanımlanmasında en önemli bulgular; kalp ve solunumun durması, reflekslerin olmaması ve ölüm sertliği (rigor mortis) gözlenmesidir. Küçük

laboratuvar hayvanlarında vücut sıcaklığının 25°C'nin altına düşmesi de ölümün diğer bir belirtisi olarak tanımlanmaktadır. Ölüm teyidi konusunda herhangi bir şüphe söz konusu ise ikinci bir ötenazi yöntemi kullanılmalıdır [7, 9]. Ölümün gerçekleştiğini onaylamak için solunum, kalp atışı, nabızın olmaması, mukozalarda renk kaybı, kornea ve palpebra reflekslerinin kaybolması, gözlerde buzlu cam görüntüsü ve rigor mortis işaretleri kullanılmaktadır [20, 17].

Kalıntıların ortadan kaldırılması

Hayvanlarda ölüm onaylandıktan sonra seçilen ötenazi yöntemine bakılmaksızın kalıntılar dikkatli ve uygun bir şekilde ortadan kaldırılmalıdır. Kalıntıların imha edilmesinde gömme, yakma ve gübreleştirme gibi yöntemler kullanılmaktadır. Yalnızca hayvan kalıntıları değil kullanılan ilaçlar ve ötenazi sırasında ortaya çıkan diğer atıklar da dikkatli bir şekilde imha edilmelidir. Özellikle zoonoz hastalık taşıyan ya da radyoizotop ve toksik kimyasalların uygulandığı bilinen hayvanlar taşınırken olası tehlikeler değerlendirilmeli ve korunmak için gerekli tedbirler alınmalıdır [7, 20, 28].

Ötenazi Yöntemleri

Laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde kullanılan yöntemler; kimyasal ve fiziksel olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kimyasal yöntemler; hayvanlarda ölüme neden olan farmasötik ya da kimyasal formülasyonların uygun yollarla verilmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde kullanılan enjektabl ya da uçucu bileşikler, ilk olarak merkezi sinir sistemini daha sonra kardiyovasküler sistemi baskı altına alarak etkilerini gösterirler. Bu yöntem genellikle anestezik maddelerin yüksek dozları uygulanarak gerçekleştirilir. Fiziksel yöntemlere göre daha hızlı ve estetik metotlardır. Fiziksel yöntemler ise beyin ya da medulla spinalisin fiziksel travması ile hızlı bir şekilde bilinç kaybı oluşturmaktadır. Fiziksel yöntemler, farmasötik maddelerin kalıntı problemi-ne yol açmadığı ve kimyasal yöntemlerden meydana gelen fizikohistokimyasal ve biyokimyasal değişimler oluşturmayan yöntemlerdir. Tür, yaş, vücut ağırlığı, kullanılacak teknik, uzmanlık ve ötenazi sonrası incelemeler gibi çeşitli faktörler göz önüne alınarak farklı ötenazi yöntemleri seçilebilir ya da birlikte uygulanabilir [7, 14, 15, 24].

Kimyasal yöntemler

Kimyasal yöntemler; inhalasyon anestezipler, karbonmonoksit (CO), nitrojen (azot, N₂), argon (Ar) ve karbondioksit (CO₂) gibi uçucu bileşiklerin uygun kapalı sistemler aracılığıyla veya barbitürik asit ve türevleri, pentobarbital kombinasyonu, potasyum klorid, T-61, tribromoetanol, dissosiyatif ajan kombinasyonu ve alkoller gibi uçucu olmayan bileşiklerin uygun yollarla laboratuvar hayvanlarına verilmesi ile gerçekleştirilir [33, 36].

Uçucu bileşikler

a) İnhalasyon anestezipler ajanlar; halotan, izofluran, enfluran, sevofluran ve desfluran gibi ajanlar tek başlarına ya da azot peroksit ile birlikte laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde kullanılmaktadır. Ancak azot protoksit tek başına ötenazi amacıyla kullanılmaz [5]. Oluşabilecek hipoksiyi önlemek için inhalasyon anestezipler ajanlarıyla birlikte kapalı sisteme hava veya oksijen (O₂) verilmelidir [20]. Halotan; laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde sıklıkla kullanılan hızlı ve etkili bir ajandır [10]. %4'lük halotan fare, rat, kobay ve tavşanlarda 90 saniye için de kalbi baskı altına alarak ölüm şekillendirir [28]. Halotan; rat ve fareler için enfluran ve izofluran ile karşılaştırıldığında daha az irkilticidir. Enfluran karaciğerde metabolize olduğundan; ilaç metabolizması ya da toksikolojik çalışmalarda tercih edilmemelidir. Bunun yerine halotan tercih edilebilir [19]. İzofluran, laboratuvar hayvanlarının ötenazisine yaygın olarak kullanılan diğer bir anestezipler ajan olup etkisini solunum ve kardiyovasküler sistemini baskılayarak meydana getirir. Karaciğerde metabolize olmadığı için karaciğer dokusu ile ilgili toksikolojik veya mikrozomal çalışmalarda ilk tercih edilen kimyasal bileşiklerdendir. Fakat kan glikoz konsantrasyonunu yapay olarak arttırdığı için kan-glikoz düzeyi çalışmalarında ve bunun etkileyebileceği çalışmalarda kullanılmamalıdır [20]. Keskin kokusu nedeniyle izofluran nefesini uzun süre tutabilecek hayvan türlerinde kullanılmamalıdır [15]. Koku; hayvanların nefesini tutmasına neden olur ve bunun sonucunda da bilinç kaybı süresi uzar [26]. İnhalasyon anestezipler ajanların kapalı sistemlerde verilme hızı 0,5-10 L/dakika arasında olmalıdır. Eğer O₂ ile beraber verilecekse akış hızındaki oranı en fazla %5-7 arasında olmalıdır [30]. Anesteziye girişi hızlandırmak için %70'e kadar

N₂O diğer inhalasyon anestezipler ajanlarla beraber kullanılabilir. İnhalasyon anesteziplerin ötenaziye sağlayan dozları damar içi uygulandığında genellikle 5 saniyeden daha kısa sürede bilinç kaybı, 10 saniyede de ölüm şekillenir. Periton içi uygulamalarında ise genellikle 1-3 dakikada bilinç kaybı, 5-20 dakika arasında ölüm şekillenir [27]. Uçucu bileşiklerin; damar içi enjeksiyon gerektirmemesi, küçük hayvanlara (<7 kg) kolay uygulanabilmeleri ve normal laboratuvar şartlarında yanıcı ve patlayıcı olmamaları gibi avantajları vardır. Ancak hayvanlarda anesteziye girişte endişeye yol açmaları, taşıyıcı gaz olarak O₂ kullanılması durumunda ötenazi süresinin uzaması, dokularda kalıntıya yol açmaları ve istismar için kullanılabilirmeleri gibi dezavantajları vardır. [20].

b) Karbonmonoksit; (CO); renksiz, kokusuz ve patlayıcı olmayan (<%10-12) bir gazdır [20]. Ötenazi amacıyla kullanımı bazı ülkelerde yasaklanmıştır. Konsantrasyonu %10-12 üzerinde olduğu durumlarda, patlayıcı ve personel için toksik etkili olduğundan güvenilirlik problemleri ortaya çıkar [27]. Kobaylara kapalı sistemde hacimce %8 oranında CO uygulandığında 2 dakika içinde kollaps ve 6 dakika içinde de ölüm şekillenir [19]. Rat ve farelerde ise % 4-6 konsantrasyondaki CO uygulaması sonrasında 40 saniye içinde kollaps ve bilinç kaybı, 2 dakika içinde solunumu ve 5-7 dakika içinde de kalbin çalışmasını baskılayarak ölüm şekillenir. Ağrısız bir yolla bilinç kaybı oluşturması, CO ile oluşan hipoksiye vücutta bir tepki şekillenmemesi gibi avantajları, laboratuvar hayvanları için tiksindirici, CO gazına maruz kalan ışık, fan gibi elektrikli aletlerde patlama riskinin olması gibi bazı dezavantajları vardır [20].

c) Nitrojen ve argon (İnert gazlar); yanıcı/patlayıcı olmayan, renksiz, kokusuz ve inert gazlardır. Tek başlarına ötenazi için kullanılmazlar. Anesteziye alınmış ya da sedatif ilaç uygulanmış tavşan ve ratların ötenazisinde kullanılır. Ancak sedatif ya da anestezipler ajanlar ötenazi süresini uzatırlar [20]. Gerekli şartlar yerine getirildiğinde nitrojen ratlarda 30 saniye içinde bilinç kaybı ve 60 saniye içinde de ölüm şekillendirmektedir. Bu yöntemin deney hayvanlarında kortikosteron konsantrasyonunu belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda kullanılabileceği önerilmektedir [20, 33]. İnert gazlar; yanıcı olmayıp, ucuz olmalarına rağmen, ratların

ötenazisinde tiksindirici bir kokuya sahip olduklarından ve anesteziklerle beraber kullanıldıklarından dolayı ölüm süresini uzatabilmektedirler. [20].

d) Karbondioksit; Laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde yaygın olarak kullanılan CO₂ tek seferde çok sayıda laboratuvar hayvanının ötenazisini sağlar. Deney hayvanlarında hipoksi şekillenmeden bilinç kaybı oluşturmak için oksijen ya da hava içinde en az %70 oranında CO₂ verilmesi tavsiye edilmektedir. Fakat kobaylar için bu oranın %100 olması önerilmektedir [7]. Kapalı sistem haznesi %10–30 hacim/dakika gaz akışıyla kademeli olarak CO₂ ile doldurulmalıdır. Fare ve ratlarda %3-20 arasındaki CO₂ konsantrasyonu tiksintmeye, % 10-35 arasındaki CO₂ konsantrasyonu korku oluşumuna neden olmaktadır [18, 38]. Laboratuvar hayvanlarına kapalı sistemle %10–30 hacim/dakika gaz akışıyla CO₂ verildiğinde 1-3 dakika içinde bilinç kaybı, 5-10 dakika sonra da ölüm şekillenebilir [29].

Uçucu olmayan bileşikler

Deney hayvanlarının ötenazisinde kullanılan enjektabl ajanlar intravenöz yolla uygulandığında hızlı ve güvenli bir şekilde etki meydana getirirler [7]. Ancak intravenöz yolla uygulamanın pratik olmadığı veya mümkün olmadığı durumlarda, iritan özelliğe olmayan ötenazi ajanları periton içi yolla verilebilir. Ayrıca anestezi altındaki deney hayvanlarına intrakardiyak yolla da verilebilir [20, 36]. Ötenazi için genellikle anestezi dozunun üç katı olacak şekilde doz hesaplanması yapılmalıdır [7].

a) Barbitürik asit ve türevleri; barbitüratlar önce sinir sistemini baskı altına alarak bilinç kaybı oluşturur, daha sonra solunum ve kalbin çalışmasını baskılayarak etki gösterirler [19]. Barbitüratlar periton içi yolla uygulandığında bağırsaklarda artefakt ve üreme hormonlarının seviyesinde değişikliğe yol açabilirler [1, 2]. Tüm barbitürik asit türevleri ötenazi amacıyla anestezi dozunun üç katı miktarında kullanılabilir [7]. Laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde en yaygın kullanılan barbitürik asit türevi sodyum pentobarbital'in %18 (200 mg/ml) konsantrasyonu 200 mg/kg dozda intravenöz veya intraperitoneal yolla uygulanabilir. İntrakardiyak enjeksiyon, şiddetli ağrıya neden olduğu için sadece genel anestezi altındaki deney hayvanlarına uygulanabilir. Ayrıca 50 mg/kg konsantrasyonda %10'luk etanol ve steril su içinde sodyum pentobarbitalin

çözdürülerek kullanılması ötenazi sırasında deney hayvanlarında hemoliz oluşmasını engeller [33, 36]. Düşük seviyede huzursuzluğa neden olarak hızlı şekilde ölüm şekillendirmesi, diğer ötenazi ajanları ile karşılaştırıldığında daha ekonomik olması gibi avantajlarının yanında, yeşil reçeteye tabi olması, diğer farmasotik ve kimyasal maddelerden ayrı muhafaza edilmesi ve kaydının tutulması gibi dezavantajları vardır [20].

b) Pentobarbital kombinasyonu; ötenazi için pentobarbital lokal anestezik ya da çırpınma önleyici bileşikler ile kullanılmalıdır [20]. Pentobarbital ötenazi amacıyla nöromusküler bloke edici ajanlar ile birlikte kullanılmamalıdır. Karın boşluğu organlarının ve solunum yollarının histopatolojik çalışmalarında tercih edilen bir bileşiktir. Fakat ratlarda sperm motilitesini azalttığı için bu konuyla ilgili yapılacak çalışmalarda tercih edilmemelidir [33]. Pentobarbital kombinasyonu periton içi verilmesine takiben 5-10 dakika, damar içi verilmesine takiben 20-60 saniye arasında ölüm şekillenebilir [29, 36].

c) Potasyum klorid (KCl); halojenür bir metal tuzudur [33]. Anestezi altındaki deney hayvanların ötenazisi için intravenöz ya da intrakardiyak yolla uygulandığında kalp kası hücrelerinde depolarizasyona yol açarak kalbin çalışmasını baskılar [14, 33]. Ancak ötenazi için kullanılması Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmamıştır [20].

d) T-61; embudramide, mebezonyum iyod ve tetrakain hidroklorid karışımından oluşur. Etkisini hızlı bir şekilde gösterir fakat sadece intravenöz yolla ve çok yavaş bir şekilde uygulanmalıdır. Deney hayvanlarında damar içi enjeksiyon zor olduğundan ötenazi için T-61 çok tercih edilmemektedir. Diğer uygulama yollarıyla kesinlikle verilmemelidir [7, 8].

e) Dissosiyatif ajan kombinasyonları; ketamin gibi dissosiyatif ajanların yüksek dozları laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde sıklıkla kullanılmaktadır [34]. Ötenazi amacıyla ketamin/ksilazin kombinasyonu anestezi oluşturan dozunun dört katı miktarında kullanılmalıdır [6]. Bilinci açık kemirgenlerde ketamin ve benzer dissosiyatif ajanlar, α -2-adrenerjik reseptör agonisti (ksilazin gibi) veya benzodiazepinler (diazepam gibi) ile kombinasyon halinde kullanılmalıdır [34].

f) Alkoller; sinir ve solunum sistemini bas-
kılı altına alarak anoksi ve anestezi oluşturarak etki
gösterirler [20]. Etanol; fiziksel yöntemlere ihtiyaç
duyulmadığında veya diğer ötenazi yöntemleri için
gerekli bileşiklerin bulunmadığı durumlarda bilinç
kayıbı şekillenmiş rodentlerin ötenazisinde uygula-
nabilir. %70'lik etanolün periton içi uygulanması
ötenazi için uygun bir yöntem olabileceği öneril-
miştir [7, 21]. Farelere %70'lik 0,5 ml etanol enjekte
edildiğinde 1-2 dakika içinde koma, 2-4 dakika
içinde de ölüm meydana gelebilir [21]. Farelerden
antikor üretimi gibi uygulamalarda etanolle ötenazi
kabul edilirken diğer uygulamalarda kullanıp kulla-
nılmaması konusunda görüş ayrılığı bulunmaktadır
[22]. Tribromoetanol, farelerin anestezisinde kullanı-
lan ilaç dışı kimyasal ajan enjektabl bir ajandır [35].
Ayrıca peritonitis şekillendirdiği için kullanımı tar-
tışmalıdır [23].

Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemler; servikal dislokasyon, dekapitasyon, maserasyon, mikrodalga ve beyin sarsıntısı uygulamalarını içerir [33].

Servikal dislokasyon; yıllardır küçük laboratuvar hayvanlarının ötenazisinde kullanılan bir yöntemdir. Fare, erişkin olmayan tavşan (<1 kg) ve 200 g'dan düşük vücut ağırlığına sahip sıçanların ötenazisinde uygulanır [6, 7, 14]. Servikal dislokasyon yönteminde omurilik kopararak beyin ile hayati organlar arasındaki bağlantı kaybolur [14]. Büyük yapılı rodentlerde ve yaşlı sıçanlarda uygulama öncesi sedasyona alınmaları tavsiye edilmektedir [8]. Yapılan araştırmalara göre sıçanlarda, servikal dislokasyon meydana geldikten sonra beyindeki elektriksel aktivitenin 13 saniye daha devam ettiği daha sonra kaybolduğu tespit edilmiştir. 200 g'dan fazla vücut ağırlığına sahip sıçan ve olgunlaşmış tavşanlarda boyun bölgesinde yoğun kas kitlesi bulunduğu için fiziksel olarak boyun omurunu kafatasından ayırmak oldukça zordur ve bu yöntem tavsiye edilmez [6, 20]. Ayrıca hamster ve kobaylarda boyun bölgesinin kısa ve kasların güçlü olması, boyun ile omuzlardaki deri kısmının gevşek olmasından dolayı servikal dislokasyon yönteminin gerçekleştirilmesi oldukça zordur [8]. Laboratuvar hayvanlarında servikal dislokasyon gerçekleştirildikten sonra 10-15 saniye arasında bilinç kaybı, bilinç kaybı şekillendikten sonra 10-15 saniye arasında ölüm şekillenir

[29]. Dokularda kimyasal madde kalıntısına yol açmaması ve hızlı ölüm şekillendirmesi gibi avantajları, yöntemi uygulayan personel için estetik olarak hoş gitmeyen bir durum olması, uygulanabilecek hayvan (fare, olgunlaşmamış tavşan ve 200 g'dan daha az vücut ağırlığına sahip sıçan) skalasının dar olması gibi dezavantajları vardır [20].

Dekapitasyon; keskin bir alet yardımıyla deney hayvanının boynu kesilerek baş ile gövde kısmının birbirinden ayrılması işlemidir. Baş ve gövde kısmı tam olarak birbirinden ayrıldığı için beyin dokusu yetersiz kanlanmadan dolayı tüm fonksiyonlarını kaybeder. Çeşitli türlerde dekapitasyon sonrası beyindeki elektriksel aktivite ortalama 13-14 saniye devam etmektedir. Ancak bu durum anestezinin kullanılıp kullanılmadığına bağlı olarak 3-40 saniye arasında değişebilmektedir [4]. Dekapitasyon işlemi için özel dizayn edilmiş giyotinler kullanılmaktadır [14, 34]. Dokularda kimyasal madde kalıntısına yol açmaması, ölümün hızlı ve kolay meydana gelmesi, anatomik olarak hasar görmemiş beyin dokusu elde edilebilmesi gibi avantajları yanında, yöntemi gerçekleştirmek için gerekli olan tutma işleminin hayvanlarda strese yol açabilmesi, dekapitasyon sonrası beyindeki elektriksel aktivitenin varlığının yorumlanmasının zor olması gibi dezavantajları vardır [20].

Mikrodalga; mikrodalga cihazları fare, sıçan ve küçük tavşanların (<300g) ötenazisinde kullanılmak üzere özel olarak (maksimum güç çıkışı 1,3-10 kW) tasarlanmıştır [7]. Cihaz deney hayvanının baş kısmına mikrodalga enerji göndererek ölüm şekillendirir [20, 31]. Bilinç kaybı ve ölüm şekillenmesi için gereken zaman cihazlar arasında farklılık göstermektedir [20]. Ötenazi için rutin olarak kullanılan bir yöntem olmayıp daha çok nörobiyologlar tarafından beyin dokusundaki kimyasalların *in vivo* olarak incelenmesinde tercih edilmektedir [2, 7].

Beyin sarsıntısı (Concussion); deneyimli personel tarafından tavşanların oksipital bölgedeki boynun üst kısmına yardımcı ekipman ile hızlı bir şekilde vurularak gerçekleştirilir. Ölümün gerçekleştiği süre dolaşımın durması ile teyit edilmelidir [8, 15]. Bu uygulamada 0,1 saniyeden daha kısa sürede bilinç kaybı, 5 saniye içinde de ölüm şekillenir [29]. Laboratuvar hayvanların ötenazisinde kullanılan yöntemler aşağıdaki tablo 1' de özetlemiştir [7, 15, 20, 29].

Yeni doğan ve fetüslerde ötenazi

Yeni doğan hayvanlar ve fetüslerin ötenazisinde özel durumlar vardır. Yeni doğan hayvanlar ve fetüsler hipoksiye karşı dayanıklı oldukları için ötenazide CO₂ uygulaması önerilmez. Enjektabl anestetik maddelerin (örneğin pentobarbital) yüksek dozları önerilmektedir. Servikal dislokasyon, yeni doğan hayvanların vücutlarının küçük olması nedeniyle ergin hayvanlarla karşılaştırıldığında uygulanabilirliği zordur. Fetüs, rahim (uterus) içinde bulunduğu süre boyunca bilinçli değildir. Eğer gebeliğin sonuna gelmiş hayvanlar öldürülecek ve fetüsün dokularını elde etmek için bilimsel gereksinime ihtiyaç yoksa anestetik maddelerin yüksek dozları anneye

verilerek ötenazi gerçekleştirilebilir. Bunun sonucunda fetüsler rahim içinde hipoksi şekillenmesinden dolayı ölürlere [29].

Deney hayvanlarının ötenazisinde kabul edilmeyen yöntemler

Sitriknin, nikotin, kafein, magnezyum sülfat, dezenfektanlar, tüm nöromusküler bloke edici ajanlar, toksinler, solventler, hidrojen siyanür, kloralhidrat, boğma, trikloretilen, metoksifloran, hipotermi, nitrojen (tek başına olduğu zaman), azot oksit, opioidler, α -kloraloz, üretan vb. fiziksel ve kimyasal yöntemlerin deney hayvanlarının ötenazisinde kullanılması uygun değildir [7, 8, 20].

Tablo 1. Rodentlerin ötenazisinde kullanılan bazı yöntemler ve özellikleri [7, 15, 20, 29]

Ajan	Etki oluşturma mekanizması	Etki şekli	Hız	Etki	Uygulama kolaylığı	Personel güvenliği	Estetik değeri	Derecelendirme (1-5)	Görüş
Halotan, enfloran, izofloran	Hipoksi	Serebral korteks, subkortikal yapılar ve hayati öneme sahip merkezlerin doğrudan baskılanması	++	++	++	+	++	5	Uygulanabilir
Sodyum pentobarbital	Hipoksi ve kalpte ritim bozukluğu	MSS' nin baskılanması	++	++	+	+	++	5	Uygulanabilir
Servikal Dislokasyon	Hipoksi	Beyin fonksiyonlarının doğrudan baskılanması ve kardiyak fibrilasyon	++	++	+	++	-	4	150-200 g'ın altındaki rodentler için uygulanabilir
T-61	Hipoksi	Serebral korteks, subkortikal yapılar ve solunumun baskılanması	++	++	-	+	++	4	Sadece intravenöz uygulanmalıdır
Karbondioksit	Solunum asidozu ve anestezi sonrası hipoksi, hayati öneme sahip merkezlerin baskılanması	Serebral korteks, subkortikal yapılar, hayati merkezlerin ve kalp kasının doğrudan baskılanması	+	++	++	++	++	4	%70 konsantrasyondan fazla olmalıdır
Potasyum klorid	Kardiyotoksik	Serebral korteks, subkortikal yapılar, hayati merkezlerin ve kalp kasının doğrudan baskılanması	+	+	-	+	++	4	Bilinçsiz hayvanlara intrakardiyak ya da intravenöz uygulanabilir
Mikrodalga ışıma	Beyindeki enzimlerin inaktivasyonu	Beyin sıcaklığının ani bir şekilde artması sonucu beyin enzimlerinin inaktivasyonu	++	++	-	++	+	3	Sadece deneyimli personel tarafından uygulanabilir. Rutin uygulama değildir
Dekapitasyon	Hayati öneme sahip merkezlerin hasarından dolayı gelişen hipoksi	Beynin doğrudan baskılanması	+	+	+	++	-	2	Diğer yöntemler tercih edilmelidir
Karbonmonoksit	Hipoksi	Hemoglobine bağlanarak O ₂ 'nin bağlanmasının engellenmesi	+	+	+	-	++	2	Personel için tehlikelidir

Hız: ++ çok hızlı, + hızlı, - yavaş. Etki: ++ çok etkili, + etkili, -etkili değil. Uygulama kolaylığı: ++ kolay uygulanabilir, + deneyim gereklidir, - uzmanlık gerektirir. Personel güvenliği: ++ tehlikeli değil, + az tehlikeli, - tehlikeli. Estetik değeri: ++ estetik, + çoğu insan için onaylanmış, - birkaç insan için kabul edilmez. Derecelendirme: 1 çok kötü 5 oldukça iyi.

Kaynaklar

- Arnold M, Langhans W, (2010). Effects of anesthesia and blood sampling techniques on plasma metabolites and corticosterone in the rat. *Physiol Behav.* 99(5), 592-598.
- Artwohl J, Brown P, Corning B, Stein S, (2006). Report of the ACLAM task force on rodent euthanasia. *J Lab Anim Sci.* 45(1), 98-105.
- Baumans V, (2005). Science-based assessment of animal welfare: Laboratory Animals. *Rev Sci Tech.* 24(2), 503-514.
- Brown MJ, Smiler K, (2001). Ethical Considerations and Regulatory Issues. Suckow AM, Stevens AK, Ronald P. eds. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster and Other Rodents.* Academic Press, Cambridge. p. 3-11
- Brunson DB, (1997). Pharmacology of inhalation anesthetics. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals* 2, 83-93.
- Charbonneau R, Niel L, Olfert E, Von Keyserlingk M, Griffin G, (2010). 7-26. CCAC guidelines on Euthanasia of animals used in science. Canadian Council on Animal Care, Canada.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C, (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Lab Anim.* 30(4), 293-316.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C, (1997). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Lab Anim.* 31(1), 1-32.
- Dolan K, (2007). Laboratory animal law: Legal control of the use of animals in research. 1-7. Blackwell Publishing, Oxford.
- Flecknell P, Roughan J, Hedenqvist P, (1999). Induction of anaesthesia with sevoflurane and isoflurane in the rabbit. *Lab Anim.* 33(1), 41-46.
- Fraser D, Weary DM, Pajor EA, Milligan BN, (1997). A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. *Anim Welf.* 6, 187-205.
- Melikoğlu Gölcü B, Aksoy A, (2017). Avrupa Birliği ve Türkiye’ de Deney Hayvanları Mevzuatına Genel Bir Bakış. *Türkiye Klinikleri J Lab Anim.* 1(1), 56-62.
- Guedes SR, Valentim AM, Antunes LM, (2017). Mice aversion to sevoflurane, isoflurane and carbon dioxide using an approach-avoidance task. *Appl Anim Behav Sci.* 189, 91-7.
- Hellebrekers LJ, Hedenqvist P, (2011). Laboratory Animal Analgesia, Anesthesia, and Euthanasia. Morton D, Hau J. eds. *Handbook of Laboratory Animal Science Essential Principles and Practices.* CRC Press, ABD, p. 485-534.
- Jiménez-Coello M, Acosta-Viana KY, Ortega-Pacheco A, Guzmán-Marín E, (2011). Medical and Bioethical Issues in Laboratory Animal. Kure J. eds. *Euthanasia-The” Good Death” Controversy in Humans and Animals.* In Tech, Croatia. p. 191-219.
- Voipio HM, Baneux P, Gomez de Segura IA, Hau J, Wolfensohn S, (2008). Guidelines for the veterinary care of laboratory animals: report of the FELASA/ECLAM/ESLAV Joint Working Group on Veterinary Care. *Lab Anim.* 42(1), 1-11.
- Keyvan E, (2010). Sığır karkaslarında post-mortem değişiklikler. *Vet Hekim Der Derg.* 81(2), 43-6.
- Kirkden RD, Niel L, Lee G, Makowska IJ, Pfaffinger MJ, Weary DM, (2008). The validity of using an approach-avoidance test to measure the strength of aversion to carbon dioxide in rats. *Appl Anim Behav Sci.* 114(1), 216-34.
- Leach M, Bowell V, Allan T, Morton D, (2002). Degrees of aversion shown by rats and mice to different concentrations of inhalational anaesthetics. *Vet Rec.* 150(26), 808-15.
- Leary SL, Underwood W, Anthony R, Gwaltney-Brant S, Poison A, Meyer R, (2013). AVMA guidelines for the euthanasia of animals. Illinois, Schaumburg.
- Lord R, (1991). Humane killing. *Nature,* 350(6318), 456.
- Lord R, (1989). Use of ethanol for euthanasia of mice. *Aust Vet J.* 66(8), 268.
- Meyer RE, Fish R, (2008). Pharmacology of injectable anesthetics, sedatives, and tranquilizers. In: Fish R, Danneman P, Brown M, Karas A. eds. *Anesthesia and analgesia of laboratory animals.* 2nd edition. San Diego. Academic Press. p. 27-83.
- Musthaq S, Daş YK, Aksoy A, (2018). Alternative Methods to Animal Experiments. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 38 (2), 161-170.
- Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, (1993). Guide to the care and use of experimental animals. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA.eds. *Euthanasia,* Canadian Council on Animal Care, Ottawa. p. 222-239.
- Preckel B, Bolten J, (2005). Pharmacology of modern volatile anaesthetics. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 19(3), 331-48.
- Raub JA, Mathieu-Nolf M, Hampson NB, Thom SR, (2000). Carbon monoxide poisoning—a public health perspective. *Toxicology,* 145(1), 1-14.
- Reilly J, (2001). Euthanasia of animals used for scientific purposes. 2nd Edition, Adelaide, Anzccart, p. 6-60.
- Richardson C, Leach M, Roughan J, (2018). eModule-Humane Methods of Killing Laboratory Animals. Erişim adresi: <https://flairelearning.com/course/humane-methods-of-killing-laboratory-animals/ErişimTarihi: 23.03.2018>.
- Schmid RD, Hodgson DS, McMurphy RM, (2008). Comparison of anesthetic induction in cats by use of isoflurane in an anesthetic chamber with a conventional vapor or liquid injection technique. *J Am Vet Med Assoc.* 233(2), 262-266.
- Stavinoha W, (1983). Study of brain neurochemistry utilizing rapid inactivation of brain enzyme activity by heating with microwave irradiation. Blank CL, Stavinoha WB, Maruyama Y. eds. *Microwave Fixation of Labile Metabolite,* Pergamon Press, Oxford. p. 1-12.
- Stokes WS, (2002). Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR J.* 43(1), 31-38.
- Gagae-Iurascu M, Craig S, (2011). Euthanasia and Necropsy. Suckow AM, Stevens AK, Ronald P. eds. *The Laboratory*

- Rabbit, Guinea Pig, Hamster and Other Rodents. Academic Press, Cambridge. p. 117-136.
34. Vaupel D, McCoun D, Cone EJ, (1984). Phencyclidine analogs and precursors: rotarod and lethal dose studies in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 230(1), 20-7.
35. Weiss J, Zimmermann F, (1999). Tribromoethanol (Avertin) as an anaesthetic in mice. *Lab Anim.* 33(2), 192-193.
36. Aksoy A, Nuhoğlu Z, (2018). Laboratuvar Hayvanlarında İlaç Uygulama. Yarsan E. eds. *Veteriner Hekimliğinde İlaç Uygulama Yöntemleri.* Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara. p. 183-204.
37. Wolfensohn S, (2010). Euthanasia and other fates for laboratory animals. Hubrecht RC, Kirkwood J. eds. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals.* Wiley-Blackwell, ABD. p. 219-226.
38. Wong D, Makowska IJ, Weary DM, (2013). Rat aversion to isoflurane versus carbon dioxide. *Biol Lett.* 9(1), 20121000.
39. Zatroch KK, Knight CG, Reimer JN, Pang DS, (2017). Refinement of intraperitoneal injection of sodium pentobarbital for euthanasia in laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *BMC Vet Res,* 13(1), 60.