



مقاله علمی-مروی:

اخلاق تحقیقاتی برای مطالعات درد و استرس در ماهی زبرا (*Danio rerio*)

عماد خلیل زاده

*e.khalilzadeh@tabrizu.ac.ir

دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی، بخش فیزیولوژی، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۱

چکیده

ماهی زبرا یکی از آبزیانی است که به صورت فرآیندهای در مطالعات نوروفیزیولوژی درد و نیز تحقیقات دارویی و سم‌شناسی مورد توجه قرار گرفته است. همچنان که اقبال از ماهی زبرا در مطالعات زیست پژوهشی در حال رشد است، جنبه‌های حقوقی کاربردهای آن با این میزان از پیشرفت به صورت همزمان رشد نکرده و از قافله عقب مانده است. بنابراین، نیاز به ارزیابی جنبه‌های حقوقی کاربردهای آن در تحقیقات دارویی و علوم اعصاب وجود دارد. در این مطالعه هدف بررسی مسائل اخلاقی کار با ماهی‌های زبرا در آزمایش‌های نظیر ارزیابی درد و تاثیر داروهای مختلف در کنترل درد و نیز مطالعات مربوط به استرس است. لذا، در این بررسی به معرفی روش‌هایی که در تحقیقات علمی جهت کاهش درد و استرس ناشی از آزمایش‌های علمی در ماهی زبرا مورد توجه قرار گرفته‌اند اعم از تکنیک‌های بی‌هوشی و مرگ با ترحم، خواهیم پرداخت.

کلمات کلیدی: اخلاق زیستی، علوم اعصاب، ماهی زبرا، حقوق آبزیان در مطالعات زیستی

مقدمه

ماهی زبرا یکی از ماهی‌های کوچک آب شیرین، به دلیل هزینه کم نگهداری و شباهت بالای فیزیولوژیک و ژنتیکی با پستانداران به عنوان یکی از آبزیان جذاب در تحقیقات عصبی و دارویی شناخته شده است (Kalueff *et al.*, 2014). ماهی زبرا دارای بیش از ۲۶۰۰۰ ژن کد کننده پروتئینی است که تقریباً ۷۱ درصد از این ژن‌ها دارای ارتو لوگ در انسان هستند (Howe *et al.*, 2013). مطالعات ژنتیکی در مقیاس بزرگ منجر به شناسایی صدha ژن جهش یافته شده است که بسیاری از آنها بیماری‌های مختلف انسان را تقلید می‌کنند (Kettleborough *et al.*, 2013). مشاهده اثرات دارویی بر اهداف مولکولی شباهت قابل توجهی را در مکانیسم عمل هنگام مقایسه ماهی زبرا و انسان بهویژه در مکان‌های بسیار فعال آزمیزم‌ها، کانال‌های یونی و گیرنده‌های انتقال دهنده Milan *et al.*, 2003; Schaaf *et al.*, 2008).

ماهی‌های زبرای بالغ و نیز لارو آنها خصوصیات رفتاری شناخته شده‌ای را در مواجهه با طیف وسیعی از داروهای موثر بر اعصاب (Cachat *et al.*, 2010) و نیز عوامل استرس‌زای de Abreu *et al.*, 2019) حاد و مزمن از خود بروز می‌دهند (Williams *et al.*, 2017). فیزیولوژی ماهی‌های زبرا تشابه زیادی با انسان دارد و به‌نظر می‌رسد که در آینده نزدیک از این آبزی به صورت متدالول تری در مدل سازی‌های مربوط به بیماری‌های انسان و غربال‌گری‌های دارویی استفاده خواهد شد. همچنان که پذیرش کاربرد ماهی زبرا در زیست پژوهشی در حال رشد است، جنبه‌های حقوقی کاربردهای آنها مغفول مانده است (Kalueff *et al.*, 2014). در اینجا، طیف وسیعی از موضوعات مرتبط با این خلاء را در تحقیقاتی که از ماهی زبرا به عنوان مدل حیوانی استفاده می‌شود بررسی خواهد شد و اخلاق زیستی و وضعیت حقوقی مدل‌های مختلف مورد استفاده در ماهی زبرا مورد بررسی قرار می‌گیرد.

ماهی زبرا در مدل‌های تحقیقاتی درد و استرس

قرار گرفتن در معرض عوامل استرس‌زا می‌تواند تأثیر بسیار ناتوان کننده‌ای بر موجودات زنده داشته باشد. با این حال، اثرات آن باید به صورت تجربی در مدل‌های حیوانی مورد مطالعه قرار گیرد تا بتوان اثرات آن بر فیزیولوژی و پاتوفیزیولوژی بیماری‌های انسان را شبیه‌سازی نمود و نیز Piato *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2018 استراتژی‌های درمانی کارآمدی را توسعه داد (Song *et al.*, 2011; Cachat *et al.*, 2010; de Abreu *et al.*, 2019). ماهی زبرا یک مدل عالی برای تحقیقات استرس است. زیرا پاسخ‌های فیزیولوژیک خوبی را در برابر عوامل استرس‌زای مختلف ارائه می‌دهد. برای مثال، استرس حاد منجر به افزایش سطح کورتیزول، پانزده دقیقه پس از قرار گرفتن در معرض عامل استرس‌زا می‌شود که به تدریج پس از ۹۰-۶۰ دقیقه به سطح اولیه آن پس از حذف محرك باز می‌گردد (de Abreu *et al.*, 2010; Marcon *et al.*, 2019). مدل‌هایی که در ماهی زبرا وجود دارد، بینش ارزشمندی در مورد اثرات قرار گرفتن در معرض استرس مزمن و حاد و پشتونه مولکولی آنها ارائه کرده است (Williams *et al.*, 2017). به طور کلی، ماهی زبرا برای تحقیقات استرس بسیار مناسب است، زیرا می‌تواند تغییرات رفتاری و فیزیولوژیک ناشی از قرار گرفتن در معرض عوامل استرس‌زا در آزمایشگاه و محیط را نیز نشان دهد (Currie, 2014; Barrallo *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2006).

ماهی زبرا می‌تواند در مطالعات چالش برانگیزتر مانند تحقیقات درد مورد استفاده قرار گیرد، زیرا آنها دارای پاسخ‌های قوی درد و گیرنده‌های درد هستند که از نظر تکاملی حفظ شده‌اند و شباهت بالایی با پستانداران دارند (Demin *et al.*, 2018). با توجه به نقش اساسی سیستم ضد درد اپیوئیدی در کنترل درد، مطالعه سیستم اپیوئیدی ماهی زبرا برای ایجاد درک بهتر از پاتوفیزیولوژی درد، ضروری است مطالعه درد است، زیرا از این ماهی می‌توان در ایجاد لاین‌های مختلف آزمایشگاهی که دارای جهش‌های خاص در ژن‌های مرتبط با درک درد هستند یا حذف ژنی به خصوص در ارتباط با ژن‌های گیرنده‌های کاپا، دلتا و موی اپیوئیدی که همه با ژن‌های انسانی مربوطه بسیار همگن هستند، بهره برد (Barrallo *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2006).

اخلاق زیستی در به کارگیری ماهی زبرا در مطالعات آزمایشگاهی

پیشرفت های علمی در پژوهشی زیستی امکان تشخیص و درمان بیماری های انسانی را ممکن ساخته است که به طور قابل ملاحظه ای از آزمایش های پیش بالینی با استفاده از مدل های حیوانی محقق شده است. ارزش ذاتی استفاده از حیوانات برای اهداف علمی در قوانین مربوط به استفاده از حیوانات در سراسر جهان منعکس شده است (Barre-
Sinoussi and Montagutelli, 2015).

اساس این دستورالعمل ها این اجماع است که هنگام بر نامه ریزی آزمایش ها بر حیوانات و آبزیان، یک محقق باید تجزیه و تحلیل کاملی از آسایش، رفاه و مزایای نتایج پروژه ای که می خواهد به انجام رساند، ارائه نماید. چنین دیدگاهی مستلزم درک عمیق از شدت و وسعت وضعیت بیماری است که بر انسان تأثیر می گذارد و نیز درک عمیق از مفهوم رفاه حیوانات و آبزیان و کاربرد آن مفاهیم در گونه های مورد استفاده در تحقیقات زیست پژوهشی، از جمله مسئولیت Ethical responsibility of researchers in animal research (Festing and Wilkinson, 2007). برای مثال، در ایالات متحده و برخی دیگر از کشورها، محقق باید به عنوان اولین گام برای انجام تحقیقات، از پروتکل ماهی زبرای بالغ یا لارو از کمیته نهادی مراقبت و استفاده از حیوانات^۵ (IACUC) تأییده لازم را اخذ کند و در کل روند آزمون قوانین مربوط به رفاه ماهیان را رعایت کند. در ایالات متحده آمریکا، IACUC یک کمیته دارای اختیار فدرال است که از طریق تجربه و تخصص اعضای خود، واجد شرایط است که بر برنامه های تحقیقاتی بر آبزیان و حیوانات، امکانات و رویده های تحقیقاتی جاری در موسسات پژوهشی نظارت نماید. در اتحادیه اروپا، IACUC اجباری نیست، اما هر کشوری مجموعه ای متفاوت از مقررات و نهادهای نظارتی دارد که تحقیقات ماهی های زبرا که به طور مفهومی در دستورالعمل ۱۰/۶۳ اتحادیه اروپا مشخص شده است، کنترل می کنند. برای مثال، در آلمان، نگهبان رفاه حیوانات (AWO) ارگان اصلی برای بحث در مورد مشکلات تحقیق و بهینه سازی روش های موجود در موسسات پژوهشی است در حالی که یک

ماهی های بالغ زبرا و لا روهای آنها پاسخ های آشکاری به درد، مشابه با پستانداران نشان می دهند (Currie, 2014) از جمله این پاسخ ها می توان به کاهش فعالیت اشاره نمود که می تواند به راحتی با استفاده از سیستم های ویدئو تراکینک مورد ارزیابی رفتاری قرار گیرد. برای مثال، مدل سازی های مربوط به تست هایپر آرژزی حرارتی^۱ (افزایش پاسخ رفتاری به یک درجه دما در دزای استاندارد)، یکی از مدل هایی است که به خوبی جهت سنجش حساسیت گرمایی ماهی زبرا مورد آزمون قرار گرفته است. در این آزمون مشخص شده است که افزودن ترکیب آلیل ایزو تیوسیانات (ماده محرک التهاب و آگونیست گیرنده های TRPA1) می تواند موجب افزایش حساسیت لارو ماهی های زبرا به گرما و افزایش رفتار اجتنابی از محیط گرم شود (Curtright et al., 2015).

رفتار شناختی ماهی زبرا را می توان به دنبال تجویز انواع مختلف مواد آلگوژنیک^۲ (دردزا) مانند هیستامین، سینام آلدھید،^۳ روغن خردل، اجوانت فراند^۴ و اسید استیک مورد بررسی قرار داد. به طور کلی، قرار گرفتن در معرض این ترکیبات بر تحرک ماهی و حتی لارو آن تأثیر منفی دارد و در نتیجه، کل مسافت طی شده را در دوره آزمایش کاهش می دهد. این کاهش تحرک می تواند به عنوان یک تظاهر رفتاری از درد در ماهی تعبیر شود که به طور قابل پیش بینی با تجویز یک مسکن متدائل مانند مورفین تضعیف می شود. مطالعات به انجام رسیده بر ماهی زبرا و با استفاده از مواد دردزا و نیز تست داروهای ضد درد، این موضوع را تأیید می کنند که ماهی زبرا دارای جنبه های متعددی از درک درد است و می تواند به عنوان یک جایگزین تحقیقاتی مناسب به جای پستانداران آزمایشگاهی مورد استفاده و اقبال عمومی محققین قرار گیرد (Malafoglia et al., 2013). در مجموع، این مطالعات ماهی زبرا را به عنوان یک مدل مناسب آزمایشگاهی برای مطالعات استرس و آسیب شناسی درد نشان می دهند.

¹ Thermal hyperalgesia

²- Algogenic

³- Cinnamadehyde

⁴- Freund's complete adjuvant.

⁵- Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)

حیوانات (زیباهای لارو یا بالغ) را پس از بررسی دقیق تحقیقات پیشنهادی اعطای می‌کنند. در مقابل، روسیه و چین قوانین خاصی برای تنظیم تحقیقات ماهی ندارند (جداول ۱ و ۲).

کمیته مشاوره نیز در این مرکز قرار دارد تا جنبه‌های اخلاقی و علمی تحقیق را با استفاده از ماهی‌های زیرای بالغ یا لارو تعیین نمایید. در انگلستان، دفاتر پلیس انگلستان تأیید کار با

جدول ۱: مقایسه قوانین و مقررات آزمایش حیوانات از کشورهای منتخب، مربوط به تحقیقات ماهی زبرا (de Abreu *et al.*, 2019)

کشورها	قوانین	سن تحت پوشش آیا قوانین ماهی زبرا را پوشش می‌دهند.	لارو - بالغ
بلژیک	قانون ۱۴ اوت ۱۹۸۶ در مورد حمایت و رفاه از حیوانات؛ فرمان سلطنتی در مورد حفاظت از حیوانات تجربی (10.07.2013)	بله	بله
برزیل کانادا	CEUA/ CONCEA CCAC	-	لارو - بالغ
چین	ندارد	بله	لارو - بالغ
اگوادور	IACUC	بله	-
فرانسه	ماده ۱37 و R214-87 قانون روسیابی دستورالعمل قانون رفاه حیوانات وزارت آموزش،	بله	لارو - بالغ
ژاپن	فرهنگ، ورزش، علم و فناوری	بله	لارو بالغ
آلمان	قانون و مقررات رفاه حیوانات برای حمایت از حیواناتی که برای مقاصد آزمایشی یا علمی دیگر استفاده می‌شوند	بله	لارو - بالغ
مکزیک	اداره کشاورزی مکزیک	بله	لارو - بالغ
روسیه	ندارد	بله	-
انگلستان	قانون حیوانات (رویه‌های علمی) ۱۹۸۶	بله	لارو - بالغ
اوروگوئه	CEUA/ CNEA	بله	لارو - بالغ
آمریکا	OLAW PHS NIH guidelines	بله	لارو بالغ

CCAC: شورای کانادایی مراقبت از حیوانات، CONCEA: کمیته اخلاق برای استفاده از حیوانات، NIH: مؤسسه ملی بهداشت ایالات متحده، PHS: دفتر رفاه حیوانات آزمایشگاهی، OLAW: خدمات بهداشت عمومی ایالات متحده

جدول ۲: نمونه‌هایی از اصول R3 برای مدل‌های ماهی زبرا (de Abreu *et al.*, 2019)

اصل	تعریف	مدل‌های ماهی زبرا
جایگزینی ^۱	روش‌های اجتناب یا جایگزینی استفاده از حیوانات	استفاده از جنین ماهی زبرا برای جایگزینی جوندگان؛ استفاده از تصاویر ماهی یا ماهی رباتیک برای جایگزینی حیوانات زنده
کاهش ^۲	روش‌هایی برای به حداقل رساندن تعداد حیوانات در هر آزمایش	ماهی زبرا به دستکاری‌های آزمایشی بسیار حساس است، اما همسانی ژنتیکی و فیزیولوژیک بالایی با پستانداران دارد. استفاده از ماهی زبرا در کشف داروها، انتخاب ترکیبات کاندید را محدود می‌کند، در نتیجه تعداد جوندگان برای استفاده در مراحل بعدی تحقیقاتی را کاهش می‌دهد.
اصلاح ^۳	روش‌هایی برای به حداقل رساندن رنج حیوانات و بهبود رفاه آنها	مدل استفاده از ماهی زبرا اجازه می‌دهد تا دارو را با غوطه وری در آب به جای روش تزریقی به عنوان یک روش کم استرس / غیر تهاجمی جهت کاهش درد و استرس به کار گرفت.

¹ Replacement; ² Reduction; ³ Refinement

جایگاه ماهی زبرا در قوانین حمایت از رفاه حیوانات

تحقیقات بر ماهی زبرا تحت همان دستورالعمل‌هایی قرار می‌گیرید که حمایت و رفاه سایر مهره‌داران آزمایشگاهی را پوشش می‌دهد. همان‌طوری که ذکر شد، قوانین ایالات متحده هنگام بررسی استفاده از مدل‌های ماهی زبرا برای آزمایش حیوانات، استناد راهنمای مختلفی (خط مشی‌ها، دستورالعمل‌ها و برگه‌های اطلاعاتی) ارائه می‌دهد. اجازه برای شروع یک پروژه تحقیقاتی پس از ارائه یک پروتکل مورد قبول (پروپوزال اولیه) از محقق و بررسی و انطباق قوانین مربوط به رفاه، تعداد ماهی مورد استفاده که باید حداقل لازم برای مقبولیت تست‌های آماری باشد و رعایت اصول بی‌دردی و مرگ با ترحم و بررسی کمیته دائمی IACUC از امکانات موسسه درخواست کنند و پس از احراز عدم تناقض با قوانین اخلاقی و علمی صادر می‌گردد. در جدول ۱ مقایسه قوانین و مقررات آزمایش حیوانات از کشورهای مختلف در ارتباط با تحقیقات بر ماهی زبرا به صورت خلاصه ارائه شده است.

جهت ایجاد اطمینان از پیروی محققین و موسسات از قوانین اصول کار اخلاقی با حیوانات و مهره‌داران آزمایشگاهی موسسات نظارتی مختلفی شامل سرویس بهداشت عمومی ایالات متحده (PHS)، دفتر رفاه حیوانات آزمایشگاهی (OLAW) و دفتر منابع حیوانات (OAR) نظارت لازم را در کلیه روندهای تحقیقاتی اعمال می‌کنند. سرویس بهداشت عمومی ایالات متحده (PHS) از موسسات می‌خواهد تا تدابیری را برای اطمینان از مراقبت و استفاده مناسب از همه حیوانات دخیل در تمام جنبه‌های تحقیقاتی که یک موسسه در ایالات متحده با بودجه فدرال آن را حمایت می‌کند، ایجاد نمایند. دفتر رفاه حیوانات آزمایشگاهی (OLAW) راهنمایی و تفسیر سیاست خدمات بهداشت عمومی (PHS) در مورد مراقبت انسانی و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (سیاست) را ارائه داده است که از برنامه‌های آموزشی پشتیبانی کرده و بر رعایت این سیاست در همه موسسات پژوهشی قابل اعتماد اعمال نظارت می‌کند. دفتر منابع حیوانات (OAR) تخصص، مراقبت و منابع لازم برای نگهداری از حیوانات تحقیقاتی را ارائه می‌دهد. مأموریت OAR ایجاد و حفاظت از قوانین

موسسات تحقیقاتی مختلف IACUC را تأسیس می‌کنند و ملاحمات علمی و اخلاقی پژوهش‌هایی که از ماهی زبرا به عنوان مدل استفاده می‌کنند نیز این نهادها و بر اساس اصل R3 R3 مورد بحث و بررسی قرار می‌دهند. بیش از ۵۰ سال اصل (اصلاح، جایگزینی و کاهش) را سازمان‌هایی که تحقیقات حیوانی در آنها به انجام می‌رسید، بر اساس مقررات ملی و بین‌المللی در مورد استفاده از حیوانات در رویه‌های علمی تصویب Hubrecht and Carter, (2019) که کلیات آن در جدول ۲ به صورت خلاصه ارائه شده است. این اصول در قانون R3 به طور گسترده به عنوان یک چارچوب اخلاقی قوی برای کاهش استفاده و نیز کاهش درد و رنج حیوانات و آبزیان پذیرفته شده‌اند. همچنین به رفع نگرانی‌های اجتماعی در مورد تحقیقات بر حیوانات نیز کمک می‌کنند. به طور کلی، این مدل‌ها باید از نظر علمی قوی و از نظر اخلاقی در مقایسه با مدل حیوانی موجود ترجیح داده شوند که باعث پالایش روش‌ها و کاهش تعداد حیوانات می‌شود. این که چگونه مدل‌های ماهی زبرا بایستی به این اصول پایبند باشند در جدول ۲ ارائه شده است.

نوآوری و اصلاح پایدار پروتکل‌های موجود برای توسعه مدل‌های بهتر و سازگارتر با ماهی زبرا بسیار مهم است (Hutchinson et al., 2016). یک مثال جالب، آزمایش سمیت در ماهی است که اولین بار در دهه ۱۸۶۰ برای کمک به تعیین سطح ایمن مواد شیمیایی مختلف در آب استفاده شد. آزمایش سمیت حاد ماهی که در دستورالعمل‌های سازمان همکاری و توسعه اقتصادی (OECD) بیان شده است، رایج‌ترین آزمایش مهره‌داران برای ارزیابی خطرات و ارزیابی خطر زیست محیطی در ماهیان بالغ است. آزمایش سمیت جنین ماهی با مطالعات استاندارد شده و معتبر برای ارزیابی سمیت شکل جنینی ماهی پیشنهاد شده است. با توجه به همبستگی بالای آن با آزمایش سمیت حاد ماهی و این واقعیت که مراحل تکاملی ماهیان در دوران جنینی مطابق با دستورالعمل اتحادیه اروپا EU/63/2010 «حفظ شده» طبقه‌بندی نمی‌شوند (جدول ۱)، آزمایش سمیت جنین ماهی می‌تواند نه تنها برای مطالعات دامنه‌یابی بلکه برای آزمایش سمیت حاد داخل بدن (*In vivo*، مطابق با اصول RS3 جدول ۲) و مقررات مختلف ملی و بین‌المللی مورد استفاده محققین قرار بگیرد (Braunbeck et al., 2015).

تغییر می‌دهد و بر اساس کلیشه‌های درد و ترس (مانند مدل‌های شکارچی) حرکت می‌کند. به منظور بهبود تفسیر نتایج منتشره از مطالعات درد در ماهی زبرا، فهرست جامعی از رفتارهای ماهی زبرا تهیه شده است، این فهرست معروف به کاتالوگ رفتار ماهی زبرا (ZBC¹) است که مدل‌های ماهی بالغ و لاروها را نیز پوشش می‌دهد. در ZBC واژه نامه‌ای وجود دارد که با ارجاع رفتارهای خاص به اعداد موجب استانداردسازی رفتار ماهی زبرا در این نوع از تحقیقات شده است (Kalueff *et al.*, 2013). هرچند ماهی زبرا جزو حیواناتی با طبقه‌بندی علمی تکاملی رده پایین است، با این حال بایستی نگرانی‌ها از جنبه‌های اخلاقی استفاده از چنین حیواناتی در تحقیقات مورد توجه قرار گیرد. یک مطالعه نشان می‌دهد که در کشورهای توسعه یافته بیشتر کمیته‌های اخلاق رویه‌هایی که در مهره داران استفاده می‌کنند، برای ارزیابی کار با ماهی زبرا نیز به کار می‌گیرند، اما گاهی اوقات، حتی توجه کمیته‌های اخلاق به این گونه می‌تواند بسیار سهل‌گیرانه و بدون توجه کافی به حقوق آنها باشد. از ابزارهایی که در تحقیقات جهت کاهش درد و استرس ناشی از آزمایش‌های علمی در ماهی زبرا مورد توجه کمیته‌های اخلاق در پژوهش قرار گرفته‌اند، تکنیک‌های بی‌هوشی و مرگ با ترجم در این گونه است که در ادامه به آنها پرداخته می‌شود.

استفاده از مواد بی‌حس‌گننده و بی‌هوش‌گننده

برای ارزیابی روش‌های مرگ با ترجم در حیوانات، برخی معیارها در بیهوشی مانند توانایی ایجاد هوشیاری، مرگ با کمترین درد ممکن، حداقل استرس یا اضطراب، برگشت‌پذیری هوشیاری و زمان مورد نیاز برای ایجاد بیهوشی، همه متناسب با نوع گونه و سن ماهی در نظر گرفته شوند (Hudson-Shore, 2016). بیهوشی ایده‌آل برای ماهی‌ها آن است که در سه دقیقه یا کمتر، القاء شود و در سطوح درمانی سمیت ایجاد نکند (Wong *et al.*, 2014).

یکی از داروهای بیهوشی که بیشتر در ماهی زبرا استفاده می‌شود، تری کائین متان سولفونات (MS-222) است. این داروی بی‌حسی با مسدود کردن کانال‌های سدیم غشاء، از انتشار پتانسیل‌های عمل جلوگیری می‌کند. اثربخشی-MS

تحقیقات در حیوانات دانشگاه‌های ایالات متحده و حفاظت از کیفیت برنامه مراقبت و استفاده از حیوانات است.

در ایالات متحده (۱۹۸۵) پس از پرونده بحث برانگیز Silver (پرونده‌ای که در آن، میمون‌ها در شرایط بهداشتی و فیزیکی وحشتناک نگهداری شده بودند) و در مورد شرایط جسمانی وحشتناک بهداشتی، فرآیند بررسی و بازبینی قوانین آمریکایی شمالی در مورد رفاه حیوانات انجام شد. متعاقب آن در بزریل، کمیسیون ملی اخلاق در تحقیقات و کمیته‌های اخلاق تحقیقاتی طی قطعنامه شماره ۱۹۶۱ شورای ملی بهداشت بزریل تشکیل شد. همچنین در انگلستان به منظور هدایت کمیته‌های اخلاق در تحقیق، دکترین "R3" (اصلاح، جایگزینی و کاهش) در سال ۱۹۵۹ ایجاد شد. اصلاح یعنی استفاده از روش‌هایی که درد، رنج یا ناراحتی احتمالی را کاهش می‌دهد یا به حداقل می‌رساند و رفاه حیواناتی که باید پرسنل آموزش دیده مورد استفاده قرار دهنده، بهبود می‌بخشد. جایگزینی یعنی استفاده از روش‌هایی مانند کشت سلولی و مدل‌های رایانه‌ای به جای حیوانات است. پستانداران باید جانشین حیواناتی شوند که سیستم عصبی آنها کمتر توسعه یافته است. کاهش یعنی استفاده از حداقل حیوانات ممکن، به همان اندازه که نتایج آماری قابل توجهی را ارائه می‌دهد. طبق گزارش انجمن سلطنتی برای پیشگیری از ظلم به حیوانات (Simonetti *et al.*, 2016) طی سال‌های ۱۹۵۵-۲۰۱۳ تعداد مطالعات علمی که از ماهی زبرا استفاده نموده‌اند، استفاده از ۱۳۱۰۰ به ۵۰۷۴۰ عدد افزایش یافته است.

مطالعات بر ماهی زبرا به تنها یکی ۱۶۱۳۳۰ مورد از مطالعات علمی انجام شده در سال ۲۰۱۳ را به خود اختصاص داده است، بر این اساس دومین گروه پرکاربرد حیوانات پس از جوندگان (Matthews and Varg, 2012). بیهوشی ایده‌آل برای ماهی زبرا باشد (Hudson-Shore, 2016). تصور می‌شود که ماهی زبرا یک مدل حیوانی جایگزین است که می‌توان آن را با سایر حیوانات نظیر پستانداران جایگزین کرد، زیرا سیستم عصبی آنها کمتر توسعه یافته است. این در حالی است که محققان تأیید کردند که این ماهی از نظر سیستم عصبی حسی دارای گیرنده‌های درد (گیرنده‌های حسی که سیگنال‌هایی که باعث احساس درد می‌شود، ارسال می‌کنند) و نیز پاسخ‌های احساسی ناخودآگاه مجهر هستند، اما از درد و احساسات آگاه رنج نمی‌برند (Rose *et al.*, 2014). ماهی زبرا رفتار خود را در واکنش به وجود مواد مضر

اوژنول و ایزوژنول اجزاء روغن میخک هستند. آنها کانال‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم را مهار می‌کنند. هر دو باعث کاهش فعالیت سیستم قلبی عروقی، کاهش فشار خون و افزایش کاتکول آمین‌های پلasmایی خون می‌شوند که نشان‌دهنده پاسخ به استرس با استفاده از این داروی بی‌حسی است (Davis *et al.*, 2015). غلظت پیشنهادی به عوامل مختلفی بستگی دارد اما باید کمتر از ۱۷ میلی‌گرم در لیتر باشد و غلظت‌های بالا می‌تواند موجب بروز مرگ در ماهی گردد. حیوان باید حداقل ده دقیقه در محلول تا زمان توقف حرکات چشمی نگهداری شود. این اجزاء بر اساس برنامه ملی سم شناسی، سلطان‌زا هستند (AVMA, 2013)، بنابراین، پرسنل آموزش‌دیده باید به طور معقول آنها را استفاده کنند. محققان دریافتند که ماهی زبرا از تماس با MS-222 اجتناب می‌کند، اما شواهد کمتری از این بی‌زاری برای متومیدات و روغن میخک گزارش شده است و این نشان می‌دهد که این عوامل نسبت به ماهی زبرا بی‌خطرت هستند (Wong *et al.*, 2014). علاوه‌براین، در معرض MS-222 قرار گرفتن ماهی باعث افزایش اضطراب می‌شود. اوژنول به دلیل حلالیت زیاد کارآمدتر در نظر گرفته شده است که منجر به القاء سریع بی‌هوشی می‌شود، حتی وقتی از غلظت کم آن استفاده شود بی‌هوشی می‌شود، (Keene *et al.*, 1998). محققان حدس می‌زنند که روغن میخک (اوژنول ۹۵٪) آبشش‌ها را می‌پوشاند، از این‌رو، این ویژگی‌ها اثرات بیهوشی را طولانی می‌کند (Sladky *et al.*, 2001). در مورد هزینه‌ها، در مقایسه با MS 222، متومیدات شش برابر گران‌تر، بنزوکائین ۲۰ برابر ارزان‌تر، ۲-فنوکسی اتانول ۳۰ برابر ارزان‌تر و روغن میخک ۱۰۰ برابر ارزان‌تر است. برخی از محققان به این نتیجه رسیدند که متومیدات و روغن میخک روش‌های جایگزینی هستند که برای مرگ با ترجم در ماهی زبرا توصیه می‌شوند (Wong *et al.*, 2014). همچنین روغن میخک چون منجر به افزایش میزان کورتیزول نمی‌شود، به عنوان یک ماده مناسب در مطالعاتی که استرس را ارزیابی می‌کنند، می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (Davis *et al.*, 2015).

مرگ با ترجم

مرگ باید با مشاهده توقف علائم حیاتی حیوان تأیید شود. مرگ با ترجم (اتانازی) با سه مکانیسم اساسی: هیپوکسی،

۲۲۲ به عوامل محیطی بستگی دارد که برای مثال می‌توان به دما، اکسیژن، pH، سختی و شوری آب و حتی عوامل بیولوژیک مانند سن، جنس، اندازه، وزن، محتوای چربی، گونه ماهی و چگالی زیست توده اشاره کرد (Topic Popovic *et al.*, 2012). مطالعات دوز ۴۰۰-۵۰۰ میلی‌گرم به ازاء وزن بدن برای ماهی زبرا یا ۵۰۰-۵۰۰ میلی‌گرم به ازاء وزن بدن را برای Sneddon, (2012; AVMA, 2013) چندین اثر نامناسب بر پارامترهای فیزیولوژیک ماهی در موقع استفاده از MS-222 مانند تغییرات پلاسمای خون، هیپوکسی، اسیدوز تنفسی و افزایش قند خون نیز گزارش شده است. همچنین مشخص شده است که استفاده از ماده MS-222 بدون استفاده از بافر و به دلیل بروز استرس حاد در ماهی زبرا که با حرکات سریع چشمی Topic Popovic *et al.*, (2012). هیچ‌یک از حیواناتی که در معرض MS-222 بافری قرار گرفتند، حرکات سریع چشمی نشان ندادند.

داروهای بیهوشی متنوعی برای استفاده در ماهی وجود دارند که می‌توان به بنزوکائین، متومیدات، اوژنول، ایزوژنول، ۲-فنوکسی اتانول، کینالدین و سولفات کینیدین اشاره کرد. همچنین برخی از عوامل ضد التهابی غیر استروئیدی مانند کتوپروفن و کارپوفن را نیز می‌توان استفاده کرد. بنزوکائین یا بنزوکائین هیدروکلراید یک محلول غوطه‌وری است که باید در غلظت‌های بیش از ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شود و برای کاهش استرس ناشی از کاهش اسیدیته حتماً توصیه می‌شود (AVMA, 2013; Collymore *et al.*, 2014).

متومیدات یک خواب‌آور غیر باربیتوراتی است که با تحریک گیرنده نوع A گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) موجب القاء اثرات خواب‌آوری و آرامبخشی می‌شود که برای مصارف انسانی و دامپزشکی مورد تایید قرار گرفته است. عوارض مضر متومیدات بر ماهی کاهش تنفس و گردش خون و هیپوکسی متعاقب آن و کاهش pH خون است. ۲-فنوکسی اتانول نیز معمولاً در واکسن‌ها، محصولات مراقبت از پوست و عطرها استفاده می‌شود. مکانیسم دقیق اثر آن بر ماهی مشخص نیست، اما ممکن است غشاء سلول‌های عصبی را درگیر کند (Sneddon, 2012).

CO_2 به طور دقیق تنظیم شده باشد. زیرا اپراتور باید در مورد AVMA، 2013) با این گاز اقدامات احتیاطی انجام دهد (در بزرگ، این روش به دلیل ایجاد اسیدیته در آب و حفظ طولانی مدت فعالیت مغزی در ماهیان نباید استفاده شود (CONCEA، 2013). از نظر اتحادیه اروپا، نیز این روش قابل قبول نیست (Olsson *et al.*, 2017).

در آمریکای شمالی، سرد شدن سریع (شوك هیپوترمی) (2-4 درجه سانتی گراد) برای ماهی زیرا تا زمان از بین رفتن AVMA، 2013) جهت‌گیری و حرکت زیر چشمی پذیرفته می‌شود (برخلاف آن در بزرگ، سرمادگی سریع یک روش پذیرفته شده نیست، اگرچه متابولیسم را کند و کار را آسان می‌کند، اما هیچ مدرکی مبنی بر این که این روند درد را به حداقل می‌رساند، وجود ندارد. با این حال، در شوک هیپوترمی، باید در نظر داشت که وقتی دما تغییر می‌کند، ماهی زیرا نمی‌تواند دمای بدن خود را حفظ کرده و یک استرس گرمایی کشنده ایجاد کند (CONCEA، 2013).

انجمان پزشکی دامپزشکی آمریکا پیشنهاد می‌کند که پس از بیهوشی ماهی بایستی سر بریده شود (AVMA، 2013). در اروپا، استفاده از ضربه مغزی یا ضربه به سر، یک روش پذیرفته شده است و در صورت استفاده از تجهیزات تخصصی الکتریکی (شوکر) نیز قابل قبول است (Olsson *et al.*, 2017).

انجام سریع در حیوانات بدون بیهوشی یک روش غیرقابل قبول است (AVMA، 2013). در بزرگ، انجام سریع تنها زمانی پذیرفته می‌شود که حیوانات قبلًا بیهوش شده باشند. در مقابل، برخی از محققان نشان دادند که در ماهی‌های بالغ، انجام سریع استرس‌زا و موثرتر از مصرف بیش از حد-MS-222 است. با این حال، بافت‌ها حاوی کریستال‌های یخ تشکیل شده هستند که این موضوع می‌تواند موجب آسیب بافتی و ایجاد مشکل در تفسیر نتایج بافتی باشد (Wilson *et al.*, 2009).

نتیجه‌گیری

شیوه‌هایی که در آن از گونه‌های حیوانی برای مطالعات مرتبط با سلامت انسان استفاده می‌شوند، بایستی به صورت دقیق و علمی مورد بازبینی و ارزیابی قرار گیرند تا رعایت اصول اخلاق کار با موجودات آزمایشگاهی سر لوحه کار محققین باشد

دژرسیون نورونی و اختلال فیزیکی در فعالیت مغز، انجام می‌شود (AVMA, 2013). با توجه به نظر شورای مراقبت از حیوانات کانادا (CCoA, 2005) و قوانین بزرگ (Simonetti *et al.*, 2016) اثنازی ماهی باید در دو مرحله: بیهوشی تا از دست دادن تعادل؛ به دنبال آن استفاده از یک روش شیمیایی یا فیزیکی منجر به مرگ مغزی، انجام شود. طبق نظر اتحادیه اروپا (Olsson *et al.*, 2017) ممکن است از این روش‌ها در حیوانات استفاده شود، به شرط آنکه حیوان قبل از مرگ به هوش نیاید. کشنن حیوانات باید با یکی از روش‌های: تأیید توقف دائمی گردن خون، تخریب مغز، دررفتگی گردن یا تأیید شروع جمود نعشی، تکمیل شود. یوتانازی می‌تواند با اوردوز داروی رایج بیهوشی (MS-222) در ماهی زیرا، با مکانیسم عمل القاء هیپوکسی مناسب باشد (Matthews and Varg, 2012 MS-222 روش ترجیحی اثنازی در ماهی‌هاست (MS-222). در ایالات متحده نیز، MS-222 باید بافر (CCoA, 2005) شود، غلظت بستگی به گونه دارد، ماهی‌های بزرگ را می‌توان با دوز کشنده این ماده و اعمال آن بر آبشش ها یوتانازی نمود (AVMA, 2013). در بزرگ، MS-222 را می‌توان از طریق مسیرهای مختلف، آب، آبشش، یا فضاهای لنفاوی و حفره‌های پلوروپریتونال تجویز کرد (Simonetti *et al.*, 2016). علاوه بر این، هنگامی که MS-222 در غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده می‌شود، محلول باید بافر شود. در اروپا، در صورت لزوم با آرام بخشی قبلی می‌توان از دوز بیهوشی در ماهی استفاده کرد (Olsson *et al.*, 2017).

اثنازی ممکن است با غوطه‌وری در نیتروژن مایع رخ دهد (Westerfield, 2000). این تکنیک، برای مثال، برای جداسازی RNA و سایر آماده‌سازی‌هایی که مواد بیولوژیک را از تخریب سریع حفظ می‌کنند، مورد نیاز است. در بزرگ، این روش با محدودیت در مورد ماهی‌های کوچک (زیر ۲۰۰ میلی‌گرم) پذیرفته شده است (CONCEA, 2013). روش دیگر غوطه‌وری در آب اشباع شده با دی‌اکسید کربن است که باعث افزایش اپیوئیدهای درون‌زاد در مغز ماهی و از دست دادن هوشیاری می‌شود، اما به آرامی عمل می‌کند و برای ماهی‌ها استرس‌زاست. در کانادا، روش دی‌اکسید کربن در اثنازی پذیرفته نیست (CCoA, 2005) انجمن پزشکی دامپزشکی آمریکا تنها در صورتی آن را می‌پذیرد که منع

منابع

- Abreu, M.S.D., Koakoski, G., Ferreira, D., Oliveira, T.A., Rosa, J.G.S.D., Gusso, D., Giacomini, A.C.V., Piatto, A.L. and Barcellos, L.J.G., 2014.** Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. *PloS one*, 9(7), p.e103232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103232>
- Alvarez, F.A., Rodriguez-Martin, I., Gonzalez-Nuñez, V., de Velasco, E.M.F., Sarmiento, R.G. and Rodríguez, R.E., 2006.** New kappa opioid receptor from zebrafish Danio rerio. *Neuroscience Letters*, 405(1-2): 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.06.028>
- American Veterinary Medical Association (AVMA), 2013.** American Veterinary Medical Association Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 ed. Schaumburg (IL): American Veterinary Medical Association. [Google Scholar]. 102 P.
- Baeder, F.M., Padovani, M.C.R.L., Moreno, D.C.A. and Delfino, C.S., 2012.** Percepção histórica da bioética na pesquisa com animais: possibilidades. *Bioethikos*, 6(3): 313-20.
- Barrallo, A., González-Sarmiento, R., Alvar, F. and Rodríguez, R.E., 2000.** ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish (Danio rerio). *Molecular Brain Research*, 84(1-2): 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00152-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00152-2)
- Barré-Sinoussi, F. and Montagutelli, X., 2015.** Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future science OA*, 1(4). <https://doi.org/10.4155/fso.15.63>

(Baeder *et al.*, 2012). همچنین لازم است که نه تنها اصول اخلاقی آزمایش حیوانات را در نظر گرفت بلکه حیوانات را به طور کلی با در نظر گرفتن رفاه، سلامت جسمی و روحی آنها مورد استفاده قرار داد و در صورتی که نیاز است در انتهای مطالعه، نمونه برداری بافتی داشت، از روش‌های توصیه شده در آن گونه برای مرگ با ترحم که درد و رنج کمتری به همراه داشته باشد، استفاده نمود. براین اساس، روش‌های بیهوده و اتانازی در روش‌ها و پروتکلهای آزمایش با ماهی زبرا نیز باید اساسی تلقی شوند.

هدف از استفاده از مدل حیوانی درک یک بیماری خاص بدون ایجاد خطر برای انسان است. اگرچه از روش‌های کشت سلولی آزمایشگاهی به طور گسترده استفاده می‌شود، اما نتایج ممکن است پیش‌بینی‌های واقعی را در مقایسه با نتایج *In vivo* ایجاد نکند. بنابراین، استفاده از آزمایش بر حیوانات هنوز ضروری است. جستجوی مدل‌های تجربی جدید برای کاهش، اصلاح و جایگزینی استفاده از مدل‌های حیوانی، راه را برای مدل‌های جدید هموار کرده است. بنابراین، ماهی زبرا که شباهت زیادی به پستانداران دارد، به عنوان یک مدل مهم برای تحقیقات زیستی و پزشکی مطرح می‌شود. بسیاری از ویژگی‌ها و شباهت‌های فیزیولوژیک بالا با پستانداران، سهل‌الوصول بودن، ارزان بودن و نیز توانایی تولید ماهی زبرا در مقیاس زیاد در یک اتاق کوچک باعث می‌شود که ماهی زبرا به عنوان یک مدل حیوانی از اهمیت بالایی برخوردار شود. با این حال، هنوز کار زیادی برای فهم فیزیولوژی و رفتارهای این گونه وجود دارد. بر اساس مطالب ارائه شده می‌توان نتیجه گرفت که مفهوم رفاه و کاهش رنج و درد ماهی زبرا بخشی از اخلاق در تحقیقات زیست پزشکی است که نیازمند پایش آن در کمیته‌های اخلاق در پژوهش موسسات علمی بوده و آگاهی رسانی مستمر مسئولین ذی‌ربط به محققین این حوزه حائز اهمیت است. امکان استفاده از حیوانات در تحقیقات مستلزم سلامت روحی و جسمی حیوانات موردنظر است. بنابراین، تلاش‌های بیشتر در شناسایی مکانیسم‌های فیزیولوژیک، عوامل رفاهی و نیز عواملی که از بروز بیماری در فارم‌های آزمایشگاهی حمایت می‌کنند، برای پیشرفت تحقیقات زیست پزشکی با ماهی زبرا اساسی است.

- Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider, K., Stengel, D. and Strecker, R., 2015.** The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21): 16247-16261. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3814-7>
- Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K.M., Wu, N., Wong, K., Roy, S., Suciu, C., Goodspeed, J., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Tan, J., Denmark, A., Gilder, T., Kyzar, E., Dileo, J., Frank, K., Chan, K., Utterback, E., Hart, P. and Kalueff, A.V., 2010.** Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature Protocols*, 5(11): 1786-1799. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.140>
- CCoA, C., 2005.** Canadian Council on animal care guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing. 94P.
- Collymore, C., Tolwani, A., Lieggi, C. and Rasmussen, S., 2014.** Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 53(2): 198-203.
- CONCEA, 2013.** Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. 54P.
- Currie, A.D., 2014.** Toward a novel model of pain in zebrafish: Exposure to water containing dilute concentrations of acetic acid. 78P.
- Curtright, A., Rosser, M., Goh, S., Keown, B., Wagner, E., Sharifi, J., Raible, D.W. and Dhaka, A., 2015.** Modeling nociception in zebrafish: a way forward for unbiased analgesic discovery. *PloS one*, 10(1): p.e0116766. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116766>
- Davis, D.J., Klug, J., Hankins, M., Doerr, H.M., Monticelli, S.R., Song, A., Gillespie, C.H. and Bryda, E.C., 2015.** Effects of clove oil as a euthanasia agent on blood collection efficiency and serum cortisol levels in *Danio rerio*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(5): 564-567.
- de Abreu, M.S., Giacomini, A.C., Echevarria, D.J. and Kalueff, A.V., 2019.** Legal aspects of zebrafish neuropharmacology and neurotoxicology research. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 101: 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.11.007>
- Demin, K.A., Meshalkina, D.A., Kysil, E.V., Antonova, K.A., Volgin, A.D., Yakovlev, O.A., Alekseeva, P.A., Firuleva, M.M., Lakstygal, A.M., de Abreu, M.S. and Barcellos, L.J., 2018.** Zebrafish models relevant to studying central opioid and endocannabinoid systems. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 86: 301-312. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.03.024>
- Festing, S. and Wilkinson, R., 2007.** The ethics of animal research: talking point on the use of animals in scientific research. *EMBO Reports*, 8(6): 526-530. <https://doi.org/10.1038/sj.embo.7400993>
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L. and McLaren, S., 2013.** The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human

- genome. *Nature*, 496(7446): 498-503.
<https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hubrecht, R.C. and Carter, E., 2019.** The 3Rs and humane experimental technique: implementing change. *Animals*, 9(10), p.754. <https://doi.org/10.3390/ani9100754>
- Hudson-Shore, M., 2016.** Statistics of Scientific Procedures on Living Animals Great Britain 2015—Highlighting an ongoing upward trend in animal use and missed opportunities for reduction. *Alternatives to Laboratory Animals*, 44(6): 569-580.
- Hutchinson, T.H., Wheeler, J.R., Gourmelon, A. and Burden, N., 2016.** Promoting the 3Rs to enhance the OECD fish toxicity testing framework. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 76: 231-233. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.02.006>
- Kalueff, A.V., Gebhardt, M., Stewart, A.M., Cachat, J.M., Brimmer, M., Chawla, J.S., Craddock, C., Kyzar, E.J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C.P., Pittman, J., Rosemberg, D.B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhauss, S.C., Weng, W., Bally-Cuif, L., Schneider, H. and Zebrafish Neuroscience Research Consortium, 2013.** Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10(1): 70-86. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.03.024>
- Kalueff, A.V., Echevarria, D.J. and Stewart, A.M., 2014.** Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research.
- Keene, J.L., Noakes, D.L.G., Moccia, R.D. and Soto, C.G., 1998.** The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29(2): 89-101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x>
- Kettleborough, R.N., Busch-Nentwich, E.M., Harvey, S.A., Dooley, C.M., de Brujin, E., van Eeden, F., Sealy, I., White, R.J., Herd, C., Nijman, I.J. and Fényes, F., 2013.** A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*, 496(7446): 494-497. <https://doi.org/10.1038/nature11992>
- Malafoglia, V., Bryant, B., Raffaeli, W., Giordano, A. and Bellipanni, G., 2013.** The zebrafish as a model for nociception studies. *Journal of Cellular Physiology*, 228(10): 1956-1966. <https://doi.org/10.1002/jcp.24379>
- Marcon, M., Herrmann, A.P., Mocelin, R., Rambo, C.L., Koakoski, G., Abreu, M.S., Conterato, G.M., Kist, L.W., Bogo, M.R., Zanatta, L. and Barcellos, L.J., 2016.** Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. *Psychopharmacology*, 233(21): 3815-3824. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4408-5>
- Matthews, M. and Varga, Z.M., 2012.** Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR Journal*, 53(2): 192-204. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.192>
- Milan, D.J., Peterson, T.A., Ruskin, J.N., Peterson, R.T. and MacRae, C.A., 2003.**

- Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circulation*, 107(10): 1355-1358. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000061912.88753.87>
- Olsson, I.A.S., Silva, S.P.D., Townend, D. and Sandøe, P., 2017.** Protecting animals and enabling research in the European Union: An overview of development and implementation of directive 2010/63/EU. *ILAR Journal*, 57(3): 347-357. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw029>
- Piato, Â.L., Capiotti, K.M., Tamborski, A.R., Oses, J.P., Barcellos, L.J., Bogo, M.R., Lara, D.R., Vianna, M.R. and Bonan, C.D., 2011.** Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(2): 561-567. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.12.018>
- Rose, J.D., Arlinghaus, R., Cooke, S.J., Diggles, B.K., Sawynok, W., Stevens, E.D. and Wynne, C.D., 2014.** Can fish really feel pain?, *Fish and Fisheries*, 15(1): 97-133. <https://doi.org/10.1111/faf.12010>
- Schaaf, M.J., Champagne, D., van Laanen, I.H., van Wijk, D.C., Meijer, A.H., Meijer, O.C., Spaink, H.P. and Richardson, M.K., 2008.** Discovery of a functional glucocorticoid receptor β-isoform in zebrafish. *Endocrinology*, 149(4): 1591-1599. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1364>
- Simonetti, R.B., Santos Marques, L., Streit Jr, D.P. and Oberst, R., 2016.** Zebrafish (*Danio rerio*): ethics in animal experimentation. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science* Ver. I, 9(7): 2319-2372. <http://doi.org/10.9790/2380-090701106110>
- Sladky, K.K., Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R. and Lewbart, G.A., 2001.** Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *American Journal of Veterinary Research*, 62(3): 337-342. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.337>
- Sneddon, L.U., 2012.** Clinical anesthesia and analgesia in fish. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 21(1), 32-43. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2011.11.009>
- Song, C., Liu, B.P., Zhang, Y.P., Peng, Z., Wang, J., Collier, A.D., Echevarria, D.J., Savelieva, K.V., Lawrence, R.F., Rex, C.S. and Meshalkina, D.A., 2018.** Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 81: 384-394. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.08.021>
- Topic Popovic, N., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Barisic, J., Jadan, M., Persin Berakovic, A. and Sauerborn Klobucar, R., 2012.** Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(4): 553-564. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.01950.x>
- Westerfield, M., 2000.** The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish. http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html.

- Williams, T.A., Bonham, L.A. and Bernier, N.J., 2017.** High environmental ammonia exposure has developmental-stage specific and long-term consequences on the cortisol stress response in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 254: 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.09.024>
- Wilson, J.M., Bunte, R.M. and Carty, A.J., 2009.** Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of

euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48(6): 785-789.

- Wong, D., von Keyserlingk, M.A., Richards, J.G. and Weary, D.M., 2014.** Conditioned place avoidance of zebrafish (*Danio rerio*) to three chemicals used for euthanasia and anaesthesia. *PLoS One*, 9(2): e88030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088030>

Research ethic for pain and stress studies on Zebrafish (*Danio rerio*)Khalilzadeh E.^{1*}

1-University of Tabriz, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz, Iran.

*e.khalilzadeh@tabrizu.ac.ir

Abstract

Zebrafish are one of the creatures that have been increasingly considered in neurophysiological studies of pain as well as pharmacological and toxicological research. As the popularity of zebrafish grows in biomedical studies, the legal aspects of its applications have not grown at the same time and lagged behind. It seems that the evaluation of the legal aspects of Zebrafish applications in pharmaceutical and neuroscience research is important.

The aim of this study was to investigate the ethical aspects of working with zebrafish in experiments such as the neurophysiology of pain and the effect of various drugs, and stress-related studies. Therefore, in this study, we will introduce the methods that have been considered in scientific research to reduce the pain and stress caused by experiments in zebrafish, including anesthesia and euthanasia techniques in this species.

Keywords: Bioethics, Neuroscience, Zebrafish, Aquatic Rights in Biological Studies