CC BY

مقاله علمی– مروری:

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 دریافت: فروردین ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

چکیده

ماهی زبرا یکی از آبزیانی است که به صورت فزآینده‌ای در مطالعات نوروفیزیولوژی درد و نیز تحقیقات دارویی و سم‌شناسی مورد توجه قرار گرفته است. همچنان که اقبال از ماهی زبرا در مطالعات زیست پزشکی 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 آزمایش‌هایی 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

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

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 ارتولوگ در انسان هستند (Howe *et al*., 2013). مطالعات ژنتیکی در مقیاس بزرگ منجر به شناسایی صدها ژن جهش یافته شده است که بسیاری از آنها بیماری های مختلف انسان را تقلید می‌کنند (Kettleborough *et al*., 2013). مشاهده اثرات دارویی بر اهداف مولکولی شباهت قابل‌توجهی را در مکانیسم عمل هنگام مقایسه ماهی زبرا و انسان به‌ویژه در مکان‌های بسیار فعال آنزیم‌ها، کانال‌های یونی و گیرنده‌های انتقال‌دهنده عصبی را نشان می‌دهند (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 حاد و مزمن از خود بروز می‌دهند (de Abreu *et al*., 2019). فیزیولوژی ماهی‌های زبرا تشابه زیادی با انسان دارد و به‌نظر می‌رسد که در آینده نزدیک از این آبزی به صورت متداول‌تری در مدل سازی‌های مربوط به بیمار ی‌های انسان و غربال‌گری‌های دارویی استفاده خواهد شد. همچنان که پذیرش کاربرد ماهی زبرا در زیست پزشکی 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 این‌حال، 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 استراتژی‌های درمانی کارآمدی را توسعه داد (Piato *et al*., 2011; Song *et al*., 2018). ماهی زبرا یک مدل عالی برای تحقیقات استرس است. زبرا پاسخ های 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 به‌تدریج پس از ۹۰-۶۰ دقیقه به سطح اولیه آن پس از حذف محرک باز می‌گردد (Cachat *et al*., 2010; de Abreu *et al*., 2019). مدل‌هایی که در ماهی زبرا وجود دارد، بینش ارزشمندی در مورد اثرات قرار گرفتن در معرض استرس مزمن و حاد و پشتوانه مولکولی آنها ارائه کرده است (Marcon *et al*., 2016). 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 (de Abreu *et al*., 2019; Williams *et al*., 2017).

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 (Currie, 2014). با توجه به نقش اساسی سیستم ضد درد اپیوئیدی در کنترل درد، مطالعه سیستم اپیوئیدی ماهی زبرا برای ایجاد درک بهتر از پاتوبیولوژی درد، ضروری است (Demin *et al*., 2018). ماهی زبرا یک مدل عالی برای 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 به‌خصوص 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).

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

ماهی‌های بالغ زبرا و لاروهای آنها پاسخ‌های آشکاری به درد، مشابه با پستانداران نشان می‌دهند (Currie, 2014) از جمله این پاسخ‌ها می‌توان به کاهش فعالیت اشاره نمود که می‌تواند به‌راحتی با استفاده از سیستم‌های ویدئو تراکینک مورد ارزیابی رفتاری قرار گیرد. برای مثال، مدل‌سازی‌های مربوط به تست هایپرآلژزی حرارتی[1] (افزایش پاسخ رفتاری به یک درجه دما دردزای استاندارد)، یکی از مدل‌هایی است که به‌خوبی جهت سنجش حساسیت گرمایی ماهی زبرا مورد آزمون قرار گرفته است. در این آزمون مشخص شده است که افزودن ترکیب آلیل ایزوتیوسیانات (ماده محرک التهاب و آگونیست گیرنده‌های TRPA1) می‌تواند موجب افزایش حساسیت لارو ماهی های زبرا به گرما و افزایش رفتار اجتنابی از محیط گرم شود (Curtright *et al*., 2015).

رفتار شنای ماهی زبرا را می‌توان به دنبال تجویز انواع مختلف مواد آلگوژنیک[2] (دردزا) مانند هیستامین، سینام آلدهید[3]، روغن خردل، اجوانت فراند[4] 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 می‌دهند. این کاهش تحرک می‌تواند به عنوان یک تظاهر رفتاری از درد در ماهی تعبیر شود که به طور قابل پیش‌بینی با تجویز یک مسکن متداول مانند مورفین تضعیف می‌شود. مطالعات به انجام رسیده بر ماهی زبرا و با استفاده از مواد دردزا و نیز تست داروهای ضد درد، این موضوع را تأیید می‌کنند که ماهی زبرا دارای جنبه‌های متعددی از درک درد است و می‌تواند 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 مطالب ماهی زبرا را به عنوان یک مدل مناسب آزمایشگاهی برای مطالعات استرس و آسیب‌شناسی درد نشان می‌دهند.

[1] Thermal hyperalgesia
[2]- Algogenic
[3]- Cinnamadehyde
[4]- Freund's complete adjuvant.

اخلاق زیستی در به‌کارگیری ماهی زبرا در مطالعات آزمایشگاهی

پیشرفت‌های علمی در پزشکی زیستی امکان تشخیص و درمان بیماری‌های انسانی را ممکن ساخته است که به طور قابل ملاحظه‌ای از آزمایش‌های پیش‌بالینی با استفاده از مدل‌های 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 دستورالعمل‌ها این اجماع است که هنگام برنامه‌ریزی آزمایش‌ها بر حیوانات و آبزیان، یک محقق باید تجزیه و تحلیل کاملی از آسایش، رفاه و مزایای نتایج پروژه‌ای که می‌خواهد به‌انجام رساند، ارائه نماید. چنین دیدگاهی مستلزم درک عمیق از شدت و وسعت وضعیت بیماری است که بر انسان تأثیر می‌گذارد و نیز درک عمیق از مفهوم رفاه حیوانات و آبزیان و کاربرد آن مفاهیم در گونه‌های مورد استفاده در تحقیقات زیست پزشکی، از جمله مسئولیت اخلاقی جامعه علمی است (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[5] (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 برنامه‌های تحقیقاتی بر آبزیان و حیوانات، امکانات و رویه‌های تحقیقاتی جاری در موسسات پژوهشی نظارت نماید. در اتحادیه اروپا، IACUC اجباری نیست، اما هر کشوری مجموعه‌ای متفاوت از مقررات و نهادهای نظارتی دارد که تحقیقات ماهی های زبرا که به طور مفهومی در دستورالعمل ۶۳/۲۰۱۰/ اتحادیه اروپا مشخص شده است، کنترل می‌کنند. 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 درحالی‌که یک

[5]- Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

کمیته مشاوره نیز در این مرکز قرار دارد تا جنبه‌های اخلاقی و علمی تحقیق را با استفاده از ماهی‌های زبرای بالغ یا لارو تعیین نمایید. در انگلستان، دفاتر پلیس انگلستان تأیید کار با حیوانات (زبراهای لارو یا بالغ) را پس از بررسی دقیق تحقیقات پیشنهادی اعطا می‌کنند. در مقابل، روسیه و چین قوانین خاصی برای تنظیم تحقیقات ماهی ندارند (جداول ۱ و ۲).

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

کشورها	قوانین	آیا قوانین ماهی زبرا را پوشش می دهند.	سن تحت پوشش
بلژیک	قانون ۱۴ اوت ۱۹۸۶ در مورد حمایت و رفاه از حیوانات؛ فرمان سلطنتی در مورد حفاظت از حیوانات تجربی (10.07.2013)	بله	لارو - بالغ
برزیل	CEUA/ CONCEA	بله	لارو - بالغ
کانادا	CCACدستورالعمل	بله	لارو - بالغ
چین	ندارد	خیر	-
اگوادور	IACUC	بله	لارو - بالغ
فرانسه	ماده R214-87 و R214-137 قانون روستایی	بله	لارو - بالغ
ژاپن	دستورالعمل قانون رفاه حیوانات وزارت آموزش، فرهنگ، ورزش، علم و فناوری	خیر بله	لارو بالغ
آلمان	قانون و مقررات رفاه حیوانات برای حمایت از حیواناتی که برای مقاصد آزمایشی یا علمی دیگر استفاده می شوند	بله	لارو - بالغ
مکزیک	اداره کشاورزی مکزیک	بله	لارو - بالغ
روسیه	ندارد	خیر	-
انگلستان	قانون حیوانات (رویه های علمی) ۱۹۸۶	بله	لارو - بالغ
اوروگوئه	CEUA/ CNEA	بله	لارو - بالغ
آمریکا	OLAW PHS NIH guidelines	خیر بله	لارو بالغ

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

جدول ۲: نمونه هایی از اصول R۳ برای مدل های ماهی زبرا (de Abreu *et al.*, 2019).

اصل	تعریف	مدل های ماهی زبرا
جایگزینی[1]	روش های 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[2]	روش هایی برای به حداقل رساندن تعداد حیوانات در هر آزمایش	ماهی زبرا به دستکاری های 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 می کند، در نتیجه تعداد جوندگان برای استفاده در مراحل بعدی تحقیقاتی را کاهش می دهد.
اصلاح[3]	روش هایی برای به حداقل رساندن رنج حیوانات و بهبود رفاه آنها	مدل استفاده از ماهی زبرا اجازه می دهد 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

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

موسسات تحقیقاتی مختلف IACUC را تأسیس می‌کنند و ملاحضات علمی و اخلاقی پروژه‌هایی که از ماهی زبرا به عنوان مدل استفاده می‌کنند نیز این نهادها و بر اساس اصل R3 مورد بحث و بررسی قرار می‌دهند. بیش از ۵۰ سال اصل R3 (اصلاح، جایگزینی و کاهش) را سازمان‌هایی که تحقیقات حیوانی در آنها به انجام می‌رسید، بر اساس مقررات ملی و بین المللی در مورد استفاده از حیوانات در رویه‌های علمی تصویب و مورد استفاده قرار داده‌اند (Hubrecht and Carter, 2019) که کلیات آن در جدول ۲ به صورت خلاصه ارائه شده است. این اصول در قانون R۳ 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. این‌که چگونه مدل‌های ماهی زبرا بایستی به این اصول پایبند باشند در جدول ۲ ارائه شده است.

نوآوری و اصلاح پایدار پروتکل های 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/۶۳/۲۰۱۰ «حفاظت 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 Rs۳ (جدول ۲) و مقررات مختلف ملی و بین‌المللی مورد استفاده محققین قرار بگیرد (Braunbeck *et al*., 2015).

جایگاه ماهی زبرا در قوانین حمایت از رفاه حیوانات

تحقیقات بر ماهی زبرا تحت همان دستورالعمل‌هایی قرار می گیرد که حمایت و رفاه سایر مهره‌داران آزمایشگاهی را پوشش می‌دهد. همان‌طوری‌که ذکر شد، قوانین ایالات متحده هنگام بررسی استفاده از مدل‌های ماهی زبرا برای آزمایش حیوانات، اسناد 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 کننده 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

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

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 Spring(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 آمریکای شمالی در مورد رفاه حیوانات انجام شد. متعاقب آن در برزیل، کمیسیون ملی اخلاق در تحقیقات و کمیته‌های اخلاق تحقیقاتی طی قطعنامه شماره ۱۹۶ سال ۱۹۹۶ شورای ملی بهداشت برزیل 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 دهند، 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 قابل‌توجهی را ارائه می‌دهد. طبق گزارش انجمن سلطنتی برای پیشگیری از ظلم به حیوانات (Simonetti *et al*., 2016) طی سال‌های ۲۰۱۳-۱۹۵۵ تعداد مطالعات علمی که از ماهی زبرا استفاده نموده‌اند، استفاده از ۱۳۱۱۰۰ به ۵۰۷۴۰۰ عدد افزایش یافته است.
مطالعات بر ماهی زبرا به تنهایی ۱۶۱۳۳۰ مورد از مطالعات علمی انجام شده در سال ۲۰۱۳ را به‌خود اختصاص داده است، بر این اساس دومین گروه پرکاربرد حیوانات پس از جوندگان اکنون متعلق به 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 مجهز هستند، اما از درد و احساسات آگاه رنج نمی‌برند (Rose *et al*., 2014). ماهی زبرا رفتار خود را در واکنش به وجود مواد مضر 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 (ZBC[1]) 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 این‌حال 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 به‌کار 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 کمیته های اخلاق در پژوهش قرار گرفته‌اند، تکنیک‌های بی‌هوشی و مرگ با ترحم در این گونه است که در ادامه به آنها پرداخته می‌شود.

استفاده از مواد بی‌حس‌کننده و بی‌هوش‌کننده

برای ارزیابی روش‌های مرگ با ترحم 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 (Matthews and Varg, 2012). 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

[1]- Zebrafish Behavior Catalog

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

222به 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 ۴۰۰-۵۰ میلی‌گرم به ازاء وزن بدن برای ماهی زبرا یا ۵۰۰-۲۵۰ میلی‌گرم به ازاء وزن بدن را برای اکثر گونه‌های ماهی، نشان مناسب اعلام نموده‌اند (Sneddon, 2012; AVMA, 2013). چندین اثر نامناسب بر پارامترهای فیزیولوژیک ماهی در مواقع 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 اثبات شده است، مناسب نیست (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 نمود. همچنین برخی از عوامل ضد التهابی غیر استروئیدی مانند کتوپروفن و کارپروفن 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 که محلول تولیدی، بافری باشد (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).

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 پلاسمایی 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، سرطان‌زا 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 بی‌خطرتر 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 (Keene *et al*., 1998). محققان حدس می زنند که روغن میخک (اوژنول ۹۵٪) آبشش‌ها را می پوشاند، 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 ترحم 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 ترحم

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

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

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 برزیل (Simonetti *et al*., 2016) اتانازی 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. کشتن حیوانات باید با یکی از روش‌های: تأیید توقف دائمی گردش خون، تخریب مغز، دررفتگی گردن یا تأیید شروع جمود نعشی، تکمیل شود. یوتانازی می‌تواند با اوردوز داروی رایج بیهوشی (MS-222) در ماهی زبرا، با مکانیسم عمل القاء هیپوکسی مناسب باشد (Matthews and Varg, 2012). در کانادا، استفاده از سطح کشنده داروی بافری MS-222، روش ترجیحی اتانازی در ماهی‌هاست (CCoA, 2005). در ایالات متحده نیز، MS-222 باید بافر شود، غلظت بستگی به گونه دارد، ماهی‌های بزرگ را می‌توان با دوز کشنده این ماده و اعمال آن بر آبشش ها یوتانایز نمود (AVMA, 2013). در برزیل، MS-222 را می‌توان از طریق مسیرهای مختلف، آب، آبشش، یا فضاهای لنفاوی و حفره های پلوروپریتونئال تجویز کرد (Simonetti *et al*., 2016). علاوه‌براین، 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).

اتانازی 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 برزیل، این روش با محدودیت در مورد ماهی‌های کوچک (زیر ۲۰۰ میلی‌گرم) پذیرفته شده است (CONCEA, 2013). روش دیگر غوطه‌وری در آب اشباع شده با دی اکسید 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 دی اکسید کربن در اتانازی پذیرفته نیست (CCoA, 2005) انجمن پزشکی-دامپزشکی آمریکا تنها در صورتی آن را می‌پذیرد که منبع CO_2 به طور دقیق تنظیم شده باشد. زیرا اپراتور باید در مورد تماس با این گاز اقدامات احتیاطی انجام دهد (AVMA, 2013). در برزیل، این روش به دلیل ایجاد اسیدیته در آب و حفظ طولانی‌مدت 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 (شوک هیپوترمی) (۴-۲ درجه سانتی گراد) برای ماهی زبرا تا زمان از بین رفتن جهت‌گیری و حرکت زیر چشمی پذیرفته می‌شود (AVMA, 2013). برخلاف آن در برزیل، سرمازدگی 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 این‌حال، در شوک هیپوترمی، باید در نظر داشت که وقتی دما تغییر می‌کند، ماهی زبرا نمی‌تواند دمای بدن خود را حفظ کرده و یک استرس گرمایی کشنده ایجاد کند (CONCEA, 2013).

انجمن پزشکی دامپزشکی آمریکا پیشنهاد می کند 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).

انجماد سریع در حیوانات بدون بیهوشی یک روش غیرقابل قبول است (AVMA, 2013). در برزیل، انجماد سریع تنها زمانی پذیرفته می‌شود که حیوانات قبلاً بیهوش شده باشند. در مقابل، برخی از محققان نشان دادند که در ماهی‌های بالغ، انجماد سریع استرس‌زا و موثرتر از مصرف بیش از حد MS-222است. با این‌حال، 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

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

(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، نمونه‌برداری بافتی داشت، از روش‌های توصیه شده در آن گونه برای مرگ باترحم که درد و رنج کمتری به‌همراه داشته باشد، استفاده نمود. براین اساس، روش‌های بیهوشی 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 این‌حال، 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.

منابع

Abreu, M.S.D., Koakoski, G., Ferreira, D., Oliveira, T.A., Rosa, J.G.S.D., Gusso, D., Giacomini, A.C.V., Piato, 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. Schaumberg (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

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

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

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.embor.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

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

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 Bruijn, 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.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

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.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

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

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]

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

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.6.4]