

## Uśmiercanie z wykorzystaniem dwutlenku węgla (CO<sub>2</sub>)

### Wstęp

Dyrektywa 2010/63/UE, a w ślad za nią polska ustawa, dopuszcza jako jedną z metod uśmiercania dla gryzoni oraz ptaków zastosowanie dwutlenku węgla (CO<sub>2</sub>).

**Zalety** wykorzystania CO<sub>2</sub> do uśmiercania zwierząt to:

- i) wywołanie przez CO<sub>2</sub> szybkiego efektu przeciwbólowego i znieczulającego, a zatem ograniczenie negatywnego oddziaływania na zwierzęta;
- ii) bezpieczeństwo stosowania – CO<sub>2</sub> jest gazem niepalnym i niewybuchowym.

Stosowanie CO<sub>2</sub> jako środek do uśmiercania zwierząt ma również istotne **wady**:

- i) występują duże i nie w pełni poznane różnice w odpowiedzi na wdychanie CO<sub>2</sub> między gatunkami zwierząt oraz między szczepami w obrębie tego samego gatunku, co utrudnia opracowanie jednego zalecanego protokołu postępowania;
- ii) u niektórych grup zwierząt CO<sub>2</sub> wywołuje silną awersję i dyskomfort, bez względu na wybrany protokół postępowania;
- iii) ponieważ CO<sub>2</sub> jest cięższy od powietrza, tworzenie warstw gazu przy niekompletnym wypełnieniu komory, w której wykonywane jest uśmiercanie umożliwia zwierzętom unikanie ekspozycji i przedłuża procedurę uśmiercania.

### Właściwości CO<sub>2</sub>

Powietrze w mieście zawiera około 0.04% CO<sub>2</sub>, gazu który jest dla ludzi prawie bezwonny, nawet w stężeniu 30%. Myszy potrafią jednak wyczuć CO<sub>2</sub> już przy stężeniu 0.04%, a aktywnie unikają CO<sub>2</sub> w stężeniu zaledwie 0.2%. U gryzoni opisano neurony węchowe ulegające depolaryzacji w odpowiedzi na CO<sub>2</sub>, z progiem wykrywalności 0.1%, które prawdopodobnie nie mają odpowiednika u ludzi.

### Zwierzęta doświadczalne, u których można stosować CO<sub>2</sub>

Prawidłowe zastosowanie tej metody dla gryzoni wymaga umieszczenia zwierząt w atmosferze zawierającej stopniowo zwiększane stężenia dwutlenku węgla (CO<sub>2</sub>). Należy jednak zaznaczyć, że zgodnie z przepisami metody uśmiercania za pomocą CO<sub>2</sub> nie stosuje się w przypadku form embrionalnych i noworodków gryzoni. Obecnie dowiedziono także, że CO<sub>2</sub> nie powinno być stosowane także w przypadku uśmiercania zwierząt gatunków zdolnych do zapadania w odrętwienie.

U gryzoni CO<sub>2</sub> nie powinien być stosowany do uśmiercania noworodków i bardzo młodych zwierząt, do drugiego tygodnia życia, ponieważ noworodki różnych gatunków są szczególnie mało wrażliwe na działanie CO<sub>2</sub>, zwłaszcza w pierwszych dniach po narodzeniu. Nawet przy wykorzystaniu wysokich stężeń CO<sub>2</sub> utrata przytomności u noworodków następuje po 30-60 minutach, w zależności od stopnia dojrzałości w momencie urodzenia (zwierzęta bardziej dojrzałe są bardziej wrażliwe na działanie CO<sub>2</sub>).

Dyrektywa stanowi także, że zastosowanie ww. metody uśmiercania dopuszczalne jest w stosunku do ptaków. W odróżnieniu od regulacji dotyczących gryzoni, nie określono metody podawania CO<sub>2</sub> ani stadium rozwoju, w którym zastosowanie takiej metody jest niedopuszczalne. Należy jednak wyraźnie zaznaczyć, że obecnie dowiedziono, iż nie wolno stosować CO<sub>2</sub> do uśmiercania ptaków nurkujących, gdyż mogą one na długo wstrzymywać oddech i wydajnie wykorzystywać metabolizm beztlenowy.

U zwierząt chorych, u których częstość oddechów lub wydajność wentylacji jest zmniejszona, powinno się stosować premedykację przed zastosowaniem uśmiercania metodą wziewną lub należy wybrać inną, nieinhalacyjną metodę.

Przy planowaniu doświadczeń należy również uwzględnić, że CO<sub>2</sub> może powodować zmiany w obrębie płuc i górnych dróg oddechowych oraz zmiany biochemiczne w mózgu, oraz wpływać na biochemię krwi. Dlatego jeśli po śmierci zwierzęcia pobierane mają być próbki z układu nerwowego lub oddechowego lub krew, lepiej wykorzystać inną metodę uśmiercania.

## **Skutki źle zastosowanego CO<sub>2</sub>**

Aby podawany gaz wywołał efekt biologiczny musi osiągnąć określone stężenie w pęcherzykach płucnych i krwi. Dlatego utrata przytomności przez zwierzę nie jest natychmiastowa. Wdychany CO<sub>2</sub> może wywoływać u zwierząt kwasicę oddechową i powodować odwracalną anestezję poprzez obniżenie wewnątrzkomórkowego pH. Wykazano, że wdychanie CO<sub>2</sub> o stężeniu 7,5% podwyższa próg bólu, a stężenie wynoszące 30% może powodować głębokie znieczulenie i śmierć dopiero przy długotrwałej ekspozycji.

CO<sub>2</sub> może wywoływać stres u zwierząt poprzez:

- i) ból związany z tworzeniem się kwasu węglowego na powierzchni oczu i błonach układu oddechowego,
- ii) uczucie duszności,
- iii) bezpośrednią stymulację kanałów jonowych w ciele migdałowatym, wywołującą uczucie strachu.

CO<sub>2</sub> nawet w niskich stężeniach może tworzyć kwas węglowy na wilgotnej powierzchni tkanek. Podrażnienie błon śluzowych nosa może powodować swędzenie i nadmierne wydzielanie śluzu, prowadzące do rozdrażnienia zwierzęcia. Przy wyższych stężeniach CO<sub>2</sub> tworzenie kwasu węglowego może wywoływać ból.

Wysokie stężenia CO<sub>2</sub> wywołują natomiast bezdech i zmniejszają częstość skurczów serca. U szczurów ekspozycja na 100% CO<sub>2</sub> prowadzi do ciężkiej niewydolności oddechowej i bradykardii, czego nie obserwuje się przy stężeniach 10%, 25% i 50%. To wskazuje, że stopniowe zwiększanie stężenia CO<sub>2</sub> stwarza mniejsze ryzyko wywołania bólu przed utratą przytomności przez zwierzę. Umieszczenie przytomnych zwierząt w 100% CO<sub>2</sub> jest niedopuszczalne etycznie i prawnie.

## **Przebieg prawidłowego uśmiercania za pomocą CO<sub>2</sub>**

Uśmiercanie z wykorzystaniem CO<sub>2</sub> należy przeprowadzać w szczelnych pojemnikach, zapewniających regulację przepływu gazu tak, by można było dokładnie kontrolować stężenie CO<sub>2</sub> w komorze. Ma to kluczowe znaczenie dla humanitarnego przebiegu procedury. Komora powinna minimalizować hałas i ryzyko skaleczenia zwierzęcia. Strumień gazu nie może być kierowany bezpośrednio na zwierzęta. Do uśmiercania wykorzystywany jest wyłącznie sprężony CO<sub>2</sub> z butli. Nie wolno używać suchego lodu (zbyt niska temperatura) lub gaśnic przeciwpożarowych (hałas) jako źródła CO<sub>2</sub>.

Samo uśmiercanie może powodować u zwierzęcia stres, niepokój lub ból. Należy dołożyć wszelkich starań, by je zminimalizować. Zwierzęta mogą próbować ucieczki, mogą wykazywać przyspieszony puls, zmienioną aktywność układu współczulnego (SNS) i osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA). Należy przy tym pamiętać, że aktywacja SNS i HPA nie musi świadczyć o świadomym odczuwaniu stresu przez zwierzę.

Na dyskomfort zwierzęcia podczas uśmiercania wpływa nie tylko bezpośrednie działanie samego czynnika wywołującego śmierć, ale również czynności przygotowawcze: chwytanie, oddzielenie od znanych osobników, przenoszenie do nieznanego otoczenia, kontakt

z nieznanymi zwierzętami. Czynniki te mają istotny wpływ na dobrostan. Jeżeli zwierzęta są w procesie uśmiercania łączone w grupy, muszą należeć do tego samego gatunku i nie mogą wykazywać agresji. W miarę możliwości nie należy łączyć zwierząt z różnych klatek.

Podstawowym sposobem zmniejszenia stresu jest uśmiercenie w klatce bytowej, bez przenoszenia zwierząt, najlepiej w okresie, kiedy nie są aktywne. Jest to stosunkowo łatwe w przypadku klatek indywidualnie wentylowanych. U szczurów uśmiercanie za pomocą stopniowego zwiększania stężenia CO<sub>2</sub> (ok. 33% na minutę) w klatkach bytowych nie wywoływało behawioralnych i biochemicznych oznak stresu szacowanych na podstawie pomiaru poziomu ACTH, glukozy i kortykosteronu w surowicy.

Jeżeli uśmiercenia nie można przeprowadzić w klatce bytowej, komory do tego przeznaczone należy opróżniać i czyścić po każdym użyciu, aby zminimalizować zapachy mogące powodować dodatkowy stres u kolejnych uśmiercanych zwierząt.

W przypadku uśmiercania z wykorzystaniem CO<sub>2</sub> należy brać pod uwagę dwa czynniki: duszność i lęk, które mogą pojawiać się już przy niskich stężeniach gazu oraz ból, który może pojawiać się po przekroczeniu stężenia 40%. Z jednej strony należy dążyć do jak najszybszej utraty przytomności przez zwierzę – wymagany czas jest krótszy przy wysokich stężeniach gazu. Z drugiej strony konieczne jest zabezpieczenie zwierzęcia przed bólem poprzedzającym utratę przytomności.

Obecnie **wymagane jest stopniowe wypełnianie komory CO<sub>2</sub>**, by zminimalizować ryzyko, że aktywacja receptorów bólowych przez kwas węglowy wystąpi przed utratą przytomności. Przy takiej procedurze zaleca się szybkość podawania gazu od 10% do 30% objętości komory na minutę, przy utrzymywaniu stężenia CO<sub>2</sub> w komorze poniżej 40% dopóki zwierzęta są przytomne. Są również badania wskazujące, że optymalna szybkość podawania gazu to 50% objętości komory na minutę, ale wciąż przy utrzymywaniu stężenia CO<sub>2</sub> w komorze poniżej 40% do czasu utraty przytomności przez zwierzęta. Taki protokół minimalizuje czas (do ok. 30 sekund) między odczuciem duszności (ocenianej na podstawie ciężkiego oddechu) a utratą przytomności. Po utracie przytomności przez zwierzęta stężenie CO<sub>2</sub> jest zwiększane u świnki morskiej do 100%, u pozostałych gryzoni (co do zasady) do 70%.

W przypadku uśmiercania z wykorzystaniem CO<sub>2</sub> przepływ gazu (we właściwym stężeniu, tj. 70 lub 100%) należy utrzymywać przez co najmniej 1 minutę po zatrzymaniu oddychania zwierząt. Aby zminimalizować ryzyko przeżycia przez zwierzę, zwierzęta powinny pozostawać w komorze przez co najmniej 5-6 minut po zaprzestaniu aktywności ruchowej.

## Metody potwierdzania zgonu

Po zakończeniu stosowania CO<sub>2</sub> **śmierć musi zostać potwierdzona u każdego zwierzęcia**. Zgodnie z Załącznikiem IV do Dyrektywy 2010/63/UE stosuje się następujące metody:

- i) potwierdzenie trwałego zaniku krążenia;
- ii) zniszczenie mózgu;
- iii) dyslokacja kręgów szyjnych;
- iv) wykrwawienie;
- v) potwierdzenie początku stężenia pośmiertnego.

## **Literatura:**

ACUC guideline on the use and euthanasia procedures of chicken-avian embryos. Approved by the ACUC February 9, 2012.

American Veterinary Medical Association. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2007 Edition.

American Veterinary Medical Association. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 Edition.

Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. Zalecenia dotyczące eutanazji zwierząt doświadczalnych: część 1. Komentarz do zarządzenia 86/609/EEC Komisji Europejskiej nr L 358, ISSN 0378-6978.

Cressey D. Rodent euthanasia methods under scrutiny. *Nature*; 2012. doi:10.1038/nature.2012.12083.

Hawkins P, Prescott MJ, Carbone L, Dennison N, Johnson C, Makowska IJ, Marquardt N, Readman G, Weary DM, Golledge HDR. A good death? Report of the Second Newcastle Meeting on Laboratory Animal Euthanasia. *Animals* 2016; doi:10.3390/ani6090050.

Karmarkar SW, Bottum KM, Tischkau AA. Considerations for the use of anesthetics in neurotoxicity studies. *Comp Med* 2010; 60: 256–262.

Leach MC, Howell VA, Allan TF, Morton BD. Measurement of aversion to determine humane methods of anaesthesia and euthanasia. *Animal Welfare* 2004; 13: S77-86.

Moody CM, Chua B, Weary BM. The effect of carbon dioxide flow rate on the euthanasia of laboratory mice. *Lab Animals* 2014; 48: 298–304.

National Research Council. Recognition and alleviation of pain and distress in laboratory animals. Chapter 7: Euthanasia. The National Academies Press OpenBook. 1992.

National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition. National Academies Press 2010.

Pritchett K, Corrow D, Stockwell J, Smith A. Euthanasia of neonatal mice with carbon dioxide. *Comp Med* 2005; 55: 275-281.

Pritchett-Corning K. Euthanasia of neonatal rats with carbon dioxide. *JAALAS* 2009; 48: 23-27.

*Opracowanie powstało w oparciu o stan wiedzy na dzień 14 grudnia 2018 roku.*