بسمه تعالی

راهنمای ملاحظات اخلاقی در کار با موش های مدل سرطان

خرداد ۱۳۹۸

نسخه پیش از تصویب

مقدمه

نگاهی به مطالعات سرطان‌شناسی بعمل آمده بر روی مدل های زنده[۱] نشان می دهد که حدود ۹۷٪ حیواناتی که در تحقیقات سرطان استفاده می شوند، موش های آزمایشگاهی هستند. به همین جهت، رعایت استانداردهای بالای تکثیر، پرورش، نگهداری و کار با این حیوانات آزمایشگاهی به انجام هرچه بهتر و افزایش کیفیت پروژه های تحقیقاتی سرطان کمک می نماید. پیشرفت های اخیر در زمینه مهندسی بافت و سیستم های میکروفلوئید، به ارائه روش های جایگزین آزمایشگاهی جهت انجام پژوهش های سرطان شناسی منجر شده است که این امر می تواند نیاز به کار کردن با حیوانات آزمایشگاهی را تا حد ممکن کاهش دهد[۱]، اما به دلایل نیازهای علمی و اخلاقی برخی پژوهش ها برای اجرا بر روی انسان، مدل های حیوانات آزمایشگاهی همچنان ابزار مهم و ضروری در پیشرفت تحقیقات سرطان شناسی محسوب می شوند. با این حال، این موضوع از مسئولیت محققان در قبال کاهش رنج این حیوانات حین انجام پژوهش نمی کاهد. به علاوه، در سال های اخیر توجه ناشران پژوهش های علمی به مقوله رعایت حقوق حیوانات در پژوهش های علوم زیستی افزایش چشمگیری داشته است چرا که امروزه کاملاً مشخص شده است که رعایت اخلاق در کار با حیوانات، می تواند بر کیفیت نتایج حاصل از یک پژوهش تاثیر بسزایی داشته باشد. بر این اساس در راهنمای حاضر، ابتدا به ذکر مختصری از انواع روش های ایجاد مدل های سرطان در موش های آزمایشگاهی حسب منابع معتبر که در انتهای این سند آورده شده‌اند پرداخته و در ادامه به توضیح برخی نکات مهم حین کار با این مدل ها می پردازیم. راهنمای مذکور در طول زمان مورد بازنگری قرار خواهد گرفت و ابعاد بیشتری از ملاحظات اخلاقی حین کار با مدل های مختلف سرطان را نیز پوشش خواهد داد.

واژه شناسی[۲] انواع مدل های آزمایشگاهی سرطان

روش های مختلفی شامل روش های القای آزمایشگاهی و غیرالقایی برای ایجاد تومور در مدل های موش استفاده می شود که در زیر بصورت مختصر به آن ها اشاره می گردد:

۱. تزریق سلول های سرطانی با منشا موش کوچک آزمایشگاهی، موش بزرگ آزمایشگاهی یا انسان به حیوان آزمایشگاهی، به منظور تکثیر یک رده سلولی و یا بررسی آثار درمانی یک تیمار مشخص دارای خواص احتمالی ضد سرطانی.

- در صورتی که سلول های سرطانی با منشاء انسانی به موش تزریق شود، برای حفظ پیوند و رشد تومور، نیاز به سرکوب سیستم ایمنی موش می باشد که این موش ها، با عنوان حیوانات دچار نقص ایمنی[۳] نامیده می‌شوند و شامل انواع مختلف مانند موش های « دچار نقص ایمنی شدید[۴]» و موشهای «برهنه»[۵] می باشند. در برخی موارد نیز برای حفظ پیوند از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی و یا رادیوتراپی خفیف قبل از تزریق سلول های سرطانی استفاده می شود.

---

[۱] *in vivo*

[۲] Terminology

[۳] Immunedeficient

[۴] Sever Combined Immunodeficient mice

[۵] Nude mice

- در صورتی که منشا سلول سرطانی و موش از یک گونه و سویه باشد به طوری که برای حفظ پیوند نیاز به سرکوب سیستم ایمنی حیوان نباشد به این مدل ها، همگون[۱] گفته می شود [۲].
- در صورتی که سلول های سرطانی در محل اصلی خود تزریق شوند (بعنوان مثال سلول های سرطان روده بزرگ، بواسطه جراحی در روده بزرگ موش کاشته شوند، و یا سلول های سرطان پستان در ناحیه چربی اطراف پستان[۲] موش تزریق شود)، به این روش تزریق، پیوند در محل طبیعی[۳] گفته می شود.
- در صورتی که سلول های سرطانی در ناحیه ای غیر از محل اصلی تزریق شوند (بعنوان مثال تزریق سلول های سرطان روده بصورت زیرجلدی[۴] در ناحیه پهلوی موش)، به این روش تزریق نابجا[۵] گفته می شود.
- در صورتی که سلول های سرطانی پس از تزریق و ایجاد توده تومور، به بافت های اطراف تهاجم یابند و یا از طریق گردش خون، به سایر بافت ها دست اندازی نمایند، به این مدل ها، «متاستاتیک[۶]» گفته می شود.
- اخیرا روش های «پیوند غیر خودی بین گونه‌های مختلف جانداران[۷]» که در آن ها به جای تزریق سلول های سرطانی، قطعه ای از توده توموری خارج شده از بدن انسان بیمار به موش پیوند زده می شود به فراوانی مورد استفاده قرار گرفته اند. این مدل ها که PDX[۸] نامیده می‌شوند، به دلیل حفظ بافت سرطانی بیمار و دارا بودن سایر سلول های غیرسرطانی موجود در ریز محیط تومور، می توانند برای بررسی تاثیر ترکیبات ضدسرطان و بررسی نحوه گسترش و متاستاز تومورها مفید باشند.

۲. موش های ترانسژنیک: این مدل ها به واسطه القای جهش های ژنتیکی در آزمایشگاه مستعد ابتلا به سرطان های خاص (بسته به نوع جهش ایجاد شده) هستند.

۳.القای تومور با کمک مواد شیمیایی کارسینوژن (بعنوان مثال استفاده از دی متیل هیدرازین جهت القای سرطان روده)، **اشعه فرابنفش، ویروس یا باکتری** (مانند استفاده از باکتری Helicobacter pylori در ایجاد سرطان معده)

۴. روش های غیر القایی در این مدل ها از برخی گونه های حیوانات آزمایشگاهی (اغلب موش کوچک و موش بزرگ آزمایشگاهی) استفاده می شود که بواسطه پیشینه ژنتیکی خود، به صورت خود به خودی در طول زندگی مبتلا به مواردی مانند سرطان پستان می گردند.

استفاده از هر یکی از این مدل ها بسته به هدف تحقیق می باشد، بعنوان مثال، در بررسی های ارتباطات سلولی و یا پاسخ های ایمنی از مدل های دارای نقص سیستم ایمنی و یا همگون استفاده می شود در حالی که وقتی هدف بررسی نحوه ایجاد تومور و یا پیشگیری از ایجاد آن باشد از موش های ترانسژنیک و یا القای شیمیایی سرطان مربوطه استفاده می گردد. در این راستا می توان از اطلاعات موجود در بانک داده های زیست شناختی تومورهای موش آزمایشگاهی[۹] استفاده نمود. در هر صورت، بسته به هدف مطالعه، بایستی از مدلی استفاده شود که کمترین روش ایجاد درد و رنج برای حیوان آزمایشگاهی را شامل شود.

---

[۱] Syngeneic : به مدل هایی گفته می شود که برای ایجاد تومور از سلول ها یا بافت های سرطانی استفاده می شود که از نظر ژنتیکی بسیار شبیه حیوان مدل و بنابراین از نظر ایمونولوژیک سازگار می باشند. میزان سازگاری تا حدی است که پیوند بین آنها موجب بروز پاسخ ایمنی نمی شود.

[۲] Mammary fat pad

[۳] Orthotopic

[۴] Subcutaneous

[۵] Ectopic

[۶] Metastatic

[۷] Xenograft

[۸] Patient-derived xenograft

[۹] Mouse tumor biology (MTB) database (http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do)

ملاحظات اخلاقی کار با موش های دارای سرطان

۱. در تمام مطالعات سرطان بر روی مدل های حیوانی، رعایت اصول 3Rs مشابه سایر مطالعات حیوانی، الزامی است. برای این منظور مراجعه به سند «راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در امور علمی»[۱] وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی توصیه می‌گردد. اصول 3Rs به طور خلاصه عبارتند از:

الف: جایگزینی[۲] استفاده از حیوانات آزمایشگاهی با روش های دیگر؛

ب: کاهش[۳] تا حد امکان تعداد حیوانات مورد استفاده برای رسیدن به هدف تحقیق،

ج: بهینه سازی[۴] روش های کار با حیوانات آزمایشگاهی به منظور کاهش درد و رنج آن ها.

سازمان های تخصیص بودجه های پژوهشی و نشریات پژوهشی در حوزه سرطان نیز باید پژوهشگران را ملزم به رعایت اصول 3Rs نموده و مستندات نحوه اجرای این اصول هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی را درخواست نمایند.

۲. در صورت استفاده از روش تزریق سلول های سرطانی به موش، عدم آلودگی این سلول ها به انواع عوامل میکروبی و ویروسی و خصوصاً مایکوپلاسما بایستی بررسی شود تا نه تنها بر روی رفتار طبیعی سلول های سرطانی تاثیر منفی نگذارد (بعنوان مثال در شرایط عفونی، به دلیل ایجاد التهاب در بافت، متاستاز سلول های سرطانی در مدل مربوطه افزایش می یابد)، بلکه به حیوان آزمایشگاهی نیز آسیبی نرساند.

۳. در خصوص مدل های متاستاتیک، شدت و مدت زمان تهاجم تومور به سایر بافت های بدن حیوان باید توسط مطالعات پایلوت مشخص شود.

۴. در خصوص مدل های ایجاد تومور خودبخودی، از آنجا که زمان دقیق ایجاد تومور مشخص نیست و از طرفی این تومورها اغلب دارای سرعت رشد غیر قابل پیش بینی و پخش سریعی می باشند، نظارت مستمر بر این حیوانات توصیه می شود.

۵. جهت ایجاد مدل های زیرجلدی سرطان با استفاده از پیوند بافت سرطانی، بایستی از روشهای جراحی آسپتیک[۵] استفاده گردد. برای این منظور استفاده از روش بیهوشی و بی دردی مناسب حین جراحی و همچنین ایجاد بی دردی بعد از جراحی قویاً توصیه می گردد.

۶. در صورتی که برای تکثیر توده های سرطانی ایجاد شده در موش، نیاز به پیوند آن به موش های دیگر می باشد، این جراحی می بایستی در شرایط استریل و رعایت نکات عمومی جراحی حیوانات آزمایشگاهی شامل ایجاد بیهوشی، بی دردی و کنترل التهاب باشد. اندازه توده این موش ها نبایستی از اندازه استاندارد (که در ادامه ذکر می شود) بزرگ تر شود.

۷. در خصوص تومورهای وابسته به هورمون که نیاز به استفاده از پلت های استروژن یا تستوسترون برای برای اولین بار دارند، انجام یک مطالعه پایلوت با دوزها و زمان های مختلف تجویز این هورمون ها، به منظور سنجش عوارض دارو و میزان تحمل حیوان ضروری است. در خصوص استفاده از پلت های استروژن که می توانند برای حیوان عوارض ادراری ایجاد کنند، این موضوع اهمیت بیشتری دارد.

---

۱ http://ethics.research.ac.ir/

۲ Replacement

۳ Reduction

۴ Refinement

۵ Aseptic surgical techniques

۸. در صورت نیاز به تزریق سلول های سرطانی به صورت سوسپانسیون، بایستی کمترین میزان سلول در کمترین حجم مورد نیاز استفاده گردد. بعنوان مثال، در تزریق زیرجلدی، تزریق ۱ تا ۵ میلیون سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر معمول است. در خصوص مدل های تزریق در محل طبیعی (اورتوتوپیک)، تعداد سلول های سرطانی استفاده شده بایستی تا حد ممکن کاهش یابد تا منجر به آسیب بافتی یا نشت سلول های سرطانی به بافت های اطراف نشود. برای این منظور تعداد ۵۰ هزار سلول در حجم ۳۰ میکرولیتر برای ارگان هایی مانند پروستات و تعداد ۱۰-۵۰ هزار سلول در حجم ۵ میکرولیتر برای تزریق در مغز موش، توصیه می شود.

۹. تزریق سلول های سرطانی و ایجاد تومور در عضله پا منجر به محدودیت حرکتی شدید برای حیوان می گردد و استفاده از این مدل تنها منوط به داشتن توجیه قوی علمی و نبود سایر روش های جایگزین (در خصوص تومورهایی که در این بافت ایجاد می شوند) می باشد.

۱۰. تزریق در کف پای[۱] موش -که در گذشته بمنظور افزایش انتشار لنفی سلول های سرطانی استفاده می شد- در حال حاضر توصیه نمی شود؛ مگر اینکه توجیه قوی برای استفاده از این روش وجود داشته باشد. در این صورت تزریق تنها در کف یکی از پاها انجام می شود.

۱۱. در صورتی که برای افزایش احتمال گرفتن پیوند سلول سرطانی از روش های کمکی مانند اشعه و یا داروهای سرکوبگر ایمنی استفاده می شود، میزان آسیب این روش ها به حیوان باید در یک مطالعه پایلوت براورد شود.

۱۲. در خصوص تزریق ترکیبات شیمیایی به مدل های سرطانی به منظور بررسی اثرات ضد سرطان، فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک آن ها، فاکتورهای مهم تاثیرگذار بر کیفیت زندگی حیوان شامل موارد زیر می باشند:

- حجم مناسب تجویز (در این رابطه منابع مختلف توصیه های نسبتاً متفاوتی دارند که نمونه‌های آن در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. در هر صورت باید از کمترین حجمی که بتواند بدون ایجاد رنج برای حیوان، موجب کسب نتایج معتبر علمی شود، استفاده نمود.)
- مدت زمان تجویز،
- دفعات تجویز،
- نوع ترکیب تجویز شده.

جدول ۱. حداکثر حجم قابل تزریق در هر بار به موش کوچک و بزرگ آزمایشگاهی [۳]

روش تجویز	موش کوچک آزمایشگاهی	موش بزرگ آزمایشگاهی
تزریق بولوس، داخل وریدی	۱۰ ml/kg	۵ ml/kg
تزریق بولوس، داخل شریانی	انجام نشود.	۰/۱ میلی‌لیتر
تزریق بولوس، داخل صفاقی	۲۰ ml/kg [الف]	۱۰ ml/kg

[۱] Foot pad

روش تجویز	موش کوچک آزمایشگاهی	موش بزرگ آزمایشگاهی
تزریق بولوس، زیر جلدی	۲۰ ml/kg [الف،ب]	۱۰ ml/kg
تزریق بولوس، عضلانی	بطور کلی پیشنهاد می شود به دلیل حجم کم عضله در موش کوچک از روش تزریق عضلانی استفاده نشود. در صورت نیاز در هر محل حجم کمتر از ۰/۰۵ میلی‌لیتر تجویز شود و برای دوز بعدی از عضله عضو مقابل استفاده گردد. برای اطلاعات بیشتر در این خصوص به رفرنس [۴] مراجعه نمایید.	در هر محل ۰/۱ میلی‌لیتر تجویز شود و برای دوز بعدی از عضله عضو مقابل استفاده گردد. یا اینکه فقط یک بار تجویز با حجم ۰/۲ میلی‌لیتر انجام گردد.
تزریق بولوس، داخل جلدی	۰/۰۵ میلی‌لیتر در هر محل [پ]	۰/۱ میلی‌لیتر در هر محل [پ]
تجویز خوراکی به روش گاواژ	۲۰ ml/kg در صورت انجام دفعات متعدد؛ یا ۵۰ ml/kg فقط یک بار	۲۰ ml/kg در صورت انجام دفعات متعدد؛ یا ۳۰ ml/kg فقط یک بار.
تزریق آرام داخل وریدی/ داخل شریانی	۰/۸ میلی‌لیتر در طول دو دقیقه	۵ میلی‌لیتر در طول دو دقیقه
انفوزیون مستمر داخل وریدی	۰/۰۴ میلی‌لیتر در دقیقه	۰/۲ میلی‌لیتر در دقیقه [پ]
انفوزیون مستمر داخل شریانی	انجام نشود.	۰/۱ میلی‌لیتر در دقیقه
انفوزیون مستمر داخل صفاقی	۰/۰۴ میلی‌لیتر در دقیقه [ت]	۰/۲ میلی‌لیتر در دقیقه [ت]
تزریق بولوس، داخل توموری	۰/۱ میلی‌لیتر	۰/۱ میلی‌لیتر

توضیحات جدول

توجه شود که حجمهای مذکور حسب استاندارد «میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان» ارائه شده و لازم است مقدار مورد نیاز ماده تجویزی، حسب وزن بدن حیوانات (که اصولاً کمتر از یک کیلوگرم می‌باشد)، محاسبه گردد.

حجم مورد استفاده می باید کمترین میزان قابل انجام - بسته به میزان حلالیت ماده و دقت تجویز- باشد. میزان حجم تجویز لازم است بسته به وزن بدن حیوان در هر مرتبه تجویز دوز محاسبه شود. تجویز های مکرر می باید به طور معمول در فواصل زمانی بین ۶ تا ۸ ساعت انجام شوند. دفعات تجویز می باید در کنار طول کلی دوره درمان بررسی شوند، به نحوی که تعداد کل موارد تجویز از حد خاصی بیشتر نشود [۵] (در منبع [۳] به این رفرنس ارجاع داده شده است).

الف) در موارد استثناء، ترکیباتی که حلالیت ضعیفی در آب داشته باشند را می توان به صورت یک محلول رقیق با حجم تا ۵۰ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به موش کوچک آزمایشگاهی تجویز نمود. این امر به منظور پرهیز از استفاده از حلال های ارگانیک یا شوینده ها[۱] صورت می گیرد. به علاوه؛ محلول ۵ درصد دکستروز/سالین را می توان به حجم تا ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان برای اصلاح وضعیت مایعات بدن موش کوچک آزمایشگاهی پس از جراحی تجویز کرد. افزایش حجم به روشهای گفته شده را می توان در مورد موش بزرگ آزمایشگاهی نیز به انجام رساند.

ب) حداکثر در دو موضع از بدن یک حیوان.

پ) حداکثر سرعت تجویز می باید ۲/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بوده و کل مدت انجام انفوزیون نیز کمتر از یک دقیقه باشد.

ت) چنانچه لازم است مواد در طول چند روز یا چند هفته تجویز شود، می توان از پمپ اسموتیک زیر جلدی یا داخل صفاقی استفاده کرد. پمپ های مذکور را می توان تا ۴ هفته در محل نگه داشت.

[۱] Detergents

جدول ۲. اندازه پیشنهادی سر سوزن و حجمهای توصیه شده برای راههای مختلف تزریق در موش کوچک و موش بزرگ آزمایشگاهی[۶]

گونه حیوان	زیرجلدی		داخل جلدی		داخل صفاقی		عضلانی		وریدی			خوراکی	
	سایز سوزن	**حجم (mL)**	**سایز سوزن**	**حجم (mL)**	**سایز سوزن**	**حجم (mL)**	**سایز سوزن**	**حجم (mL)**	**سایز سوزن**	**حجم تزریق بولوس (mL)**	**حجم انفوزیون آهسته (mL)**	**سایز سوزن (یا سایز لوله حسب مقیاس فرنچ)**	**حجم (mL)**
موش، ۲۵ گرم	۲۶	۰/۲۵	۲۶	۰/۰۵	۲۵	۰/۵	۲۷	۰/۰۵ در هر محل (بهتر است استفاده نشود).	۲۶	۰/۲	۰/۳ (۱۲ mL/kg)	۲۰	۰/۲۵
رت، ۲۰۰ گرم	۲۵	۱	۲۶	۰/۰۵	۲۵	۲/۰	۲۵	۰/۱ در هر محل	۲۵	۱	۴ (۲۰ mL/kg)	۱۸	۱

در این جدول، «حجم» عبارت است از مقدار اصولی و مجاز تزریق یک یا چند دوز دارو که در موارد تکرار دوز، می‌بایست زمان مناسب جهت جذب شدن دوز قبلی ماده تجویزی را در نظر گرفت. این امر مخصوصاً درباره مواد با پایه غیرآبکی یا مواد تحریک کننده، دارای اهمیت است.
توجه شود که فارغ از «حجم تجویز»، «سرعت تجویز» در روش تجویز بولوس وریدی در مورد جوندگان تقریباً سه میلی‌لیتر در دقیقه است. تجویز آرام وریدی می‌بایست طی ۵ تا ۱۰ دقیقه و حتی بیشتر، به طول بیانجامد. میزان تحمل تزریق وریدی بستگی زیادی به ماده حامل[۱] داروی تزریقی دارد.
دوز تجویز خوراکی، به پر بودن یا خالی بودن معده بستگی دارد. حجم زیاد مواد با پایه آبکی بهتر از حجم معادل از مواد با پایه روغنی، تحمل می‌شود.

۱۳. بر طبق پروتوکل های استاندارد، برای تجویز به صورت خوراکی و داخل صفاقی حداکثر حجم مجاز مایع ۱۰ میلی لیتر به ازای کیلوگرم وزن بدن و برای تزریق وریدی حداکثر حجم مجاز ۵ میلی لیتر بر کیلوگرم می باشد که برای یک موش با وزن ۲۰ گرم این حجم ها به ترتیب ۲۰۰ و ۱۰۰ میکرولیتر خواهند بود.

۱۴. تا حد امکان، تجویز دارو باید به صورت محلول باشد و از حلال های آبی مانند آب مقطر استریل تزریقی، نرمال سالین ۰/۹٪، یا دکستروز ۵٪ در سالین، استفاده شود که به pH فیزیولوژیک نزدیک باشد. در صورتی که نیاز است ترکیب دارویی در حلال های آلی مانند DMSO[۲] حل شود، میزان حلال آلی بایستی حداکثر ۱۰٪ حجم محلول تزریقی را شامل شود و از ۵ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان، تجاوز ننماید. در خصوص استفاده از سورفکتانت هایی مانند Tween، حل کننده‌ها[۳] یا امولسیون کننده ها[۴]، میزان این ترکیبات نبایستی از ۲۰٪ حجم کل محلول بیشتر باشد. در خصوص سیکلودکسترین، حداکثر

[۱] Vehicle
[۲] Dimethylsulphoxide
[۳] Solubilisers
[۴] Emulsifiers

میزان مجاز ۲ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم (حداکثر ۴۵٪ حجم مورد استفاده) می باشد. در صورتی که نیاز است این ترکیب بیش از ۲۰٪ حجم مورد استفاده را داشته باشد، حیوان باید ظرف۲ تا ۴ ساعت از شروع استفاده مایع درمانی دریافت کند.

۱۵. در خصوص مطالعات فارماکوکینتیک بر روی ترکیبات دارای اثر ضدسرطان، تا حد ممکن جهت تعیین دوز از مدل های ریاضی و کامپیوتری یا مدل های "در شیشه[۱] " استفاده گردد تا تعداد حیوان مورد نیاز به حداقل ممکن کاهش یابد. در صورت استفاده از مدل های موشی، مطالعه بایستی به گونه ای طراحی شود که نیاز به استفاده از یک حیوان به کمترین دفعات ممکن باشد. در روش های معمول، برای ترکیبات شیمیایی، تزریق تک دوز دارو به صورت وریدی، داخل صفاقی یا خوراکی با دوزهای ۰/۵ تا ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم و جمع آوری نمونه در طی ۵ تا ۸ زمان (۲ تا ۳ موش به ازای هر زمان) در طول مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انجام می شود. در خصوص داروهای بیولوژیک (مانند واکسن ها و آنتی بادی ها) دوزهای ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم به ازای هر موش و در طول مدت ۱ تا ۲۱ روز به صورت زیرجلدی، وریدی یا داخل صفاقی تزریق می شود. در روشی که اخیراً به منظور کاهش تعداد حیوانات مورد نیاز برای انجام مطالعه، ارائه شده است، چندین بار خون گیری با حجم کم از یک ورید سطحی موش انجام می‌گیرد. سپس از خون بدست آمده می توان به منظور جدا کردن پلاسما و بررسی آن با روش بسیار دقیق کروماتوگرافی مایع - طیف سنجی جرمی/ طیف سنجی جرمی)[۲] [۷] (رفرنس شده در[۳]) استفاده کرد. یا اینکه با استفاده از روش دیگری که به طور خلاصه عبارت است از قرار دادن لکه‌ای از خون کامل با حجم در حد میکرولیتر بر روی کارتهای کاغذی خاص و استفاده از خون خشک شده برای انجام تجزیه و تحلیلهای آزمایشگاهی استفاده نمود [۸] (رفرنس شده در[۳]). با استفاده از این روش در «موش بزرگ آزمایشگاهی»، می توان با استفاده از ۲ تا ۶ حیوان، میزان ۵ تا ۸ بار نمونه گیری انجام داد. ذکر این نکته حائز اهمیت است که نیمه عمر داروهای بیولوژیک در مدل های موشی با سیستم ایمنی تضعیف شده، به دلیل عدم تولیدIgG بسیار بالاتر از حد معمول می باشد.

۱۶. در خصوص مطالعات فارماکودینامیک و بررسی مکانیسم اثر دارو، می توان از تعداد نمونه های کم و در حدود ۳ تا ۵ حیوان استفاده نمود.

۱۷. در مطالعاتی که هدف آن ها بررسی اثربخشی[۳] یک ترکیب ضد سرطان در طول مدت ۲ تا ۴ هفته است، در صورتی که از یک روش تجویز مناسب استفاده گردد (جدول ۱)، معمولا می توان این مطالعات را با تعداد ۶ تا ۱۰ حیوان برای هر گروه (تیمار و کنترل) به انجام رساند. در این صورت، در مدل های تومور سطحی، حجم تومور دوبار در هفته با کمک کالیپر[۴] اندازه گرفته می شود و یا تعداد گره های متاستاز داده شده به بافت های مختلف مانند ریه و کبد شمارش می شود.

۱۸. در صورت استفاده از مدل های موش سرطانی به منظور بررسی اثربخشی یک تیمار (مثلاً ترکیب ضد سرطان)، فاصله زمانی مناسب برای انجام تزریق های پی در پی، حداقل ۲۴ ساعت و در مورد تجویز های بلند مدت، حداقل ۵ روز است. رعایت این فاصله زمانی باعث می‌شود که میزان تحمل حیوان نسبت به تیمار و نیز عوارض جانبی ترکیب مورد استفاده مشخص شود. لازم به ذکر است که سرطان ایجاد شده در حیوان می تواند میزان تحمل حیوان نسبت به عوارض جانبی تیمار را کاهش دهد.

۱۹. تزریق یک ترکیب با دفعات بالاتر از حد معمول تنها در صورت داشتن شواهد فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک قابل توجیه است.

---

[۱] *in silico*

[2] Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS or tandem MS)

[۳] Efficacy

[۴] Caliper

۲۰. در صورتی که هدف مطالعه، آزمودن اثر هم‌افزایی (سینرژیک) چند ترکیب ضدسرطان باشد، در صورت تزریق آن ها به حیوان بایستی اثرات سمی مجموع این ترکیبات در حیوان لحاظ شود. برای این منظور نیاز به انجام مطالعات پایلوت با تعداد کم حیوانات می باشد.

۲۱. به منظور داشتن صحت علمی داده ها و از طرفی استفاده از کمترین تعداد حیوان، لازم است از اطلاعات و دانش آمار در مراحل طراحی و آنالیز مطالعه استفاده شود. برای این منظور مراجعه به رفرنس [۹] توصیه می گردد.

۲۲. در مطالعاتی که نیاز به استفاده از رادیوتراپی تومور می باشد، به منظور به حداقل رساندن التهاب و قرمزی پوستی[۱] حداکثر دوز اشعه بایستی کمتر از ۳۰ Gy در هر دوز باشد. پیشنهاد می شود از پروتوکل هایی با دوزهای کمتر و دفعات بیشتر (۲ تا ۵ Gy در طول ۱ تا ۲ هفته) استفاده شود. در پرتودهی تومورهای زیرجلدی، ایجاد زخم می تواند نشان دهنده پاسخ دهی تومور به اشعه دریافتی باشد؛ اما درصورتی که نشانه هایی از عفونت و یا عدم ترمیم زخم دیده شد، حیوان باید به روش صحیح یوتانزی شود. لازم به ذکر است که تا کنون ضابطه پایان کار معمول در مطالعات رادیوتراپی، ایجاد فیبروز در ریه حیوان بوده است. البته به تازگی از بررسی وضعیت تعداد تنفس حیوان، زمان اختتام مطالعه تخمین زده می شود تا حیوان قبل از رسیدن به مرحله درد و رنج به روش بدون درد کشته شود. در صورت استفاده از اشعه بر روی کل بدن حیوان (بعنوان مثال جهت تضعیف سیستم ایمنی یا درمان تومور بیماری منتشر شده در بدن حیوان)، بایستی عوارض تاخیری مانند مشکلات گوارشی (پس از ۵ روز) و مشکلات خونی (پس از ۳۰ روز) در نظر گرفته شود.

۲۳. در مطالعاتی که هدف بعنوان مثال بررسی علت شناسی تومورهای پوستی، غیر از ملانوما، ناشی از اشعه UV در موش است، دانستن این نکته حائز اهمیت است که پوستِ اصلاح شده و بدون مویِ موش، علائم سوختگی را نشان نمی دهد و باید از دوزهای غیر سوزاننده ۰/۲ تا ۰/۳ MED[۲] استفاده شود. از آنجا که اشعه UV می تواند برای گوش و چشم موش آسیب زننده باشد بایستی از پوشش های مناسب برای این نواحی استفاده نمود.

۲۴. درصورت نیاز به انجام عکس برداری[۳] از تومور در حالی که موش زنده است و برای بی حرکت نگه داشتن او نیاز به القای بیهوشی وجود دارد، بایستی دمای بدن حیوان بیهوش با کمک یک وسیله گرم کننده حفظ شود. در صورتی که مرحله به هوش آمدن موش و ریکاوری بیش از ۲ ساعت به طول بینجامد، بایستی حیوان را هیدراته نمود. در صورتی که لازم است در طول یک روز بیش از چند بار بیهوشی برای موش انجام شود، بعد از هربار بیهوشی موش باید کاملا به هوش آمده، غذا و آب مصرف کند و سپس مجدداً بیهوش شود. قبل از فرستادن موش برای عکس برداری، آب و غذا به میزان کافی در اختیار موش قرار گیرد. در صورتی که حیوان نباید قبل از عکس برداری به آب و غذا دسترسی داشته باشد، مدت زمان عکس برداری نبایستی طولانی تر از ۲ ساعت در هر جلسه و بیش تر از ۲-۳ ساعت در طول یک شبانه روز گردد. تکرار عکس برداری از یک موش مجاز است، اما این تکرار نبایستی بیش از ۵ بار در طول ۱ تا ۲ هفته باشد و در هر روز حداکثر یک عکس برداری برای حیوان انجام شود.

۲۵. یکی از مهم ترین نکات استفاده از موش های مدل در انجام مطالعات، تعیین ضوابط پایان کار با حیوان می باشد [۱۰]. این نقطه زمانی است که کار کردن با حیوان بیش از این زمان، او را متحمل درد و رنج و درد می نماید و یا محقق در می یابد که نمیتواند به هدف مطالعه خود دست یابد. مهم ترین معیار های تعیین کننده ضوابط پایان کار با موش های آزمایشگاهی مدل سرطان در ذیل اشاره می گردد:

---

[۱] Erythema

[۲] Minimal Erythema Dose

[۳] Imaging

- محل القای تومور: این فاکتور در میزان تحمل پذیری رنج ایجاد شده نقش مهمی دارد. تومورهایی که در چشم، کف دست و پا، دم، ماهیچه و یا استخوان ایجاد می شوند برای موش بسیار دردناک هستند و نیازمند اتمام هرچه سریعتر مطالعه می باشند. بعلاوه، تومورهای که به اعضای حساس حیوان متاستاز می یابند بایستی به دقت زیر نظر گرفته شوند. در صورتی که تومور در مغز موش ایجاد شده، سرعت کاهش وزن بدن یا انجام MRI معیارها و روش های حساسی برای تعیین ضوابط پایان کار با حیوان می باشد.

- اندازه تومور: در صورتی که هدف بررسی اثربخشی ضدسرطان یک ترکیب است، مطالعه باید به گونه ای طراحی شود که به محض رسیدن به یک نتیجه معتبر از نظر علمی، اجازه بزرگ شدن بیشتر به تومور (خصوصا به تومورهای گروه کنترل که دارو دریافت نمی نمایند) داده نشود و حیوان به روش صحیح یوتانزی شود. حداکثر قطر مجاز متوسط تومور در موش کوچک آزمایشگاهی ۱/۲ و در موش بزرگ آزمایشگاهی ۲/۵ سانتی متر می باشد. در مطالعات بررسی اثر تیمار، حداکثر قطر مجاز متوسط ۱/۵ سانتی متر در موش کوچک و ۲/۸ سانتی متر در موش بزرگ می باشد. در صورتی که حیوان دارای بیش از یک توده تومور باشد، حداکثر اندازه مجاز هر تومور کمتر از میزان ذکر شده است. تعیین اندازه تومور در مدل هایی که توده در داخل بدن موش تشکیل می شود دشوار است و به همین دلیل بایستی ابتدا با کمک یک مطالعه پایلوت و با تعداد کم حیوان، فاکتورهایی مانند سرعت و الگوی رشد تومور و زمان پایانی مطالعه تعیین شوند.

- مشاهده علائم بالینی خاص و نمره دهی شدت آن ها مانند ایجاد زخم شدید، کشیدگی عضو بر اثر تومور و یا ایجاد کاشکسی (کاهش وزن شدید) از جمله نشانه های نقطه پایان کار با حیوان است. در صورتی که پوست دچار نکروز شود و تا ۴۸ ساعت علائمی مانند تخریب پیشرونده پوستی و ترشح چرک بهبود نیابد نیز حیوان باید به روش صحیح یوتانزی شود. سایر نشانه های مهم شامل موارد زیر می شوند:

  - حیوان بیش از ۴۸-۲۴ ساعت نتواند بخورد یا بیاشامد.
  - کاهش وزن پیوسته و یا شدید به گونه ای که ۲۰٪ وزن حیوان کاهش یابد و یا در طول ۷۲ ساعت، نسبت به وزن ابتدای مطالعه یا گروه کنترل ۱۵٪ کاهش نشان دهد. لازم به ذکر است در برخی تومورها، وزن معیار مناسبی از سلامت حیوان نیست و باید از معیارهای جایگزین (نظیر آتروفی عضلات یا نمره وضعیت بدنی[۱]) استفاده گردد. سایر نشانه های زیر نیز علایم بسیار نامطلوبی از وضعیت حیوان هستند و در صورتی که یک مطالعه بخوبی طراحی شده باشد به ندرت اتفاق می افتند اما در صورتی که در حیوانی مشاهده شوند می توانند بعنوان معیارهایی برای نقطه پایان کار با حیوان در نظر گرفته شوند:
  - هیپوترمی پایدار
  - خروج خون یا چرک از حیوان
  - سختی تنفس خصوصا زمانی که همراه با ترشح از بینی یا سیانوز باشد.
  - بزرگ شدن غدد لنفی یا طحال
  - فلجی یا ضعف اعضا
  - کم خونی که به واسطه رنگ پریدگی پاها یا تغییرات هماتولوژیک مشهود است.
  - اتساع شدید شکم و یا افزایش توده آسیت به بیش از ۱۰٪ وزن موش های کنترل هم سن. تعیین دقیق این فاکتور دشوار است اما می توان از روی اندازه دور شکم آن را تخمین زد. حداکثر افزایش ۲۰٪ سایز دور شکم (مشابه اندازه یک موش باردار) مجاز است.

[۱] Body condition score

- بی اختیاری ادرار یا اسهال بمدت بیش از ۴۸ ساعت
- تومورهایی که در حرکت یا رفتارهای طبیعی حیوان تداخل ایجاد می نمایند.

۲۶. در خصوص تومورهایی که بصورت سوسپانسیون در ناحیه صفاق تزریق می شوند، لازم است ضوابط پایان کار به دقت تعیین شود و قبل از ایجاد ناتوانی شدید و درد و رنج زیاد برای حیوانات، نسبت به یوتانزی آنها اقدام شود. لازم به ذکر است استفاده از روش تزریق داخل صفاقی تنها در ایجاد سرطان هایی مانند تخمدان، مزوتلیوم، صفاق و تومورهای دستگاه گوارش کاربرد دارد. در خصوص سایر تومورها که در نواحی حساس مانند ماهیچه و مغز تزریق می شوند نیز تعیین ضوابط پایان کار ضرورت دارد.

منابع:

1. Tsai H-F, Trubelja A, Shen AQ et al. Tumour-on-a-chip: microfluidic models of tumour morphology, growth and microenvironment, Journal of the Royal Society Interface 2017;14:20170137.
2. Jong WY, Bhattacharya S, Yanamandra N et al. Tumor-immune profiling of murine syngeneic tumor models as a framework to guide mechanistic studies and predict therapy response in distinct tumor microenvironments, PloS one 2018;13:e0206223.
3. Workman P, Aboagye E, Balkwill F et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research, British journal of cancer 2010;102:1555.
4. Bullock GR, Hedrich HJ. The laboratory mouse. 2004.
5. Diehl KH, Hull R, Morton D et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, Journal of Applied Toxicology: An International Journal 2001;21:15-23.
6. Hau J, Schapiro SJ. Handbook of Laboratory Animal Science, Volume I: Essential Principles and Practices. CRC press, 2010.
7. Abatan OI, Welch KB, Nemzek JA. Evaluation of saphenous venipuncture and modified tail-clip blood collection in mice, Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 2008;47:8-15.
8. Barfield M, Spooner N, Lad R et al. Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies, Journal of Chromatography B 2008;870:32-37.
9. Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals, ILAR journal 2002;43:244-258.
10. Oliveira M, Nascimento-Goncalves E, Silva J et al. Implementation of Humane Endpoints in a Urinary Bladder Carcinogenesis Study in Rats, in vivo 2017;31:1073-1080.