



מדריך שימושי לקביעה ופיתוח של END POINT לניסויים בבעלי חיים

מחברים : ד"ר יעקב פישר, ד"ר דפנה ססלר

עקרונות

ככל האפשר מחקר יתוכנן כך שיושגו מטרותיו בטרם יופיעו סימני כאב וסבל בבעלי חיים. באם צפויים להופיע סימנים שכאלו, תבוצע תוך שיתוף פעולה בין החוקר לווטרינר המוסדי הערכה זהירה לסימנים הרלוונטים למודל ואשר בעזרתם יקבעו ויפותחו תנאים להפסקת הניסוי הספציפים למודל. תנאים אלו יגדירו את המצב בו ערך הכאב והסבל הוא כזה שמייתר את ערך המידע החדש שבמחקר, ואו שכזה שאינו מאפשר הסקת מסקנות מדעיות הרלוונטיות לשאלה המדעית.

ככל האפשר תנאי להפסקת ניסוי יקבע לפני הופעת כאב וסבל ו/או בנקודה המוקדמת ביותר המוצדקת מדעית בה הכאב והסבל של בעלי החיים נמנע, מופסק או מוקל (תוך השגת מטרת המחקר).

בנוסף לסימנים הצפויים, במהלך כל מחקר יתכננו גם מופעים שאינם חזויים. מופעים שכאלה החושפים את בעלי החיים לכאב וסבל החורג מהצפוי ו/או מהתרחישים הקבועים בהיתר המחקר ראוי שידווחו ויטפלו מיידית ע"י הגורמים האחראיים (ראו בהמשך).

בישראל שימוש בניסוי בקריטריון מדעי הכרוך במוות ואו בסימני גסיסה כנקודת סיום אינו מקובל, ויש לפתח מדדים לשלבים הקודמים למופעים אלו. רק במקרים חריגים במיוחד יתאפשר שימוש במדדים אלו ובכל מקרה זאת בכפוף להתייעצות עם גורמי המקצוע של המועצה לניסויים בבעלי חיים.

קביעת אחריות

בהתייחס לקביעה ופיתוח של END POINT, יש להגדיר ברורות את האחריות של כל אדם המעורב בקיום המחקר, וכן את שרשרת הדיווח הדרושה. הווטרינר המוסדי הנו הסמכות העליונה להורות על euthanasia (המתה), סמכות אשר מגובה ע"י הוועדה המוסדית לטיפול ושימוש בעלי חיים.

יש לדווח מיידית לגורם האחראי על כל תצפית על התנהגות חריגה של בעל החיים ו/או סימנים חריגים של כאב וסבל. סמכות הגורם האחראי להורות על euthanasia (המתה) עם התממשות התנאים המוגדרים בהיתר להפסקת הניסוי, ו/או הופעת סמני כאב וסבל חריגים שלא הוגדרו בהיתר, צריכה להיות מוגדרת בצורה ברורה לפני תחילת הניסוי.

מובהר כי הסמכות הנתונה לווטרינר המוסדי (כאמור בפסקה הראשונה לסעיף) תקפה הן להתממשות תנאים המוגדרים בהיתר והן להתרחשות מופעי כאב וסבל חריגים. כן חשוב להבהיר לגורמי צוות המחקר ומטפלי החיות את חובתם לדווח לווטרינר המוסדי על כל מופע כאב וסבל חריג סמוך ככל האפשר למועד גילוי.

קביעה ופיתוח של END POINT למודל לא מוכר

ככל שיש צורך בביצוע מחקר במודל שלגביו אין ניסיון במוסד, ו/או שלא ניתן להסתמך על תנאים הרלוונטים למודל להפסקת הניסוי מהמידע הזמין בספרות המדעית, ו/או שאפקט הטיפול המוצע במודל בעלי החיים אינו ידוע, מומלץ לקיים ניסוי פיילוט לשם קביעה ופיתוח של תנאים להפסקת הניסוי הרלוונטים למודל קודם לאישור תוכנית המחקר המלאה.



משרד
הבריאות
נחיים בריאים יותר

המדען הראשי
המועצה לניסויים בבעלי חיים
The Council for Experiments on Animal Subjects

קביעה ופיתוח של END POINT לניסויים בבע"ח
גרסת 6/2018

יש להקפיד בתכנון ניסוי הפיילוט על קיום מעקב ותיעוד הסממנים השונים בתדירות גבוהה לשם איסוף מיטבי של המאפיינים הרלוונטים לצורך קביעה ופיתוח של END POINT. מעקב ותיעוד צריך שיעשו בשיתוף פעולה של החוקר והוטרין המוסדי.

ניסוי פיילוט יכול לספק מידע חיוני רב לגבי תכנון המחקר המלא. זאת בין היתר לגבי: חומרת המודל/הטיפול המוצע למודל; מהלך הזמן של המופעים וזמנים קריטיים בניסוי; תדירות המעקב הנדרשת לשם קביעת התנאי להפסקת הניסוי בניסוי המלא; שונות המודל/הטיפול המוצע למודל; הכרות הצוות עם הסממנים הצפויים של המודל/הטיפול המוצע למודל. מידע זה יאפשר להציע תנאים להפסקת הניסוי הרלוונטים למודל הניסוי.

מובן כי תדירות המעקב הדרושה בניסוי עשויה להשתנות על פי התקדמות סממני המודל/הטיפול המוצע למודל והפוטנציאל למופעי כאב, סבל ועקה.

מדדים כלליים לבריאות החיה

מקובל לסווג את הבריאות הכללית של בעלי החיים לפי חמש קטגוריות עיקריות: משקל הגוף; מופע פיזי; סימנים קליניים מדידים; התנהגות טבעית, ותגובה לגירוי חיצוני.

לכל קטגוריה רצוי לקיים מערכת דרוג ארבע-ספרתית בין אפס (מופע נורמלי) לשלוש (חריגה משמעותית מהנורמה). הדרוג המצטבר, המתקבל מחיבור ערכי הקטגוריות, נותן הערכה למידת הסטייה מהמצב הנורמלי של בעל החיים, וניתן לפרשו כאינדיקטור לכאב ועקה. ניתן באמצעותו לקבוע ערך מדדי מסויים (סקור) בו ינקטו פעולות התערבות במחקר, בין אם בשימוש באמצעים לשיכוך כאב ובין אם בהפסקת הניסוי והרחקת בעל החיים.

בין היתר קטגורית משקל בגוף תכלול שינויים במשקל בגוף ושינויים הקשורים בצריכת מזון ומים. קטגורית סימנים קליניים מדידים תכלול כמינימום שינויים בקצב פעימות הלב והנשימה ותורחב לפרמטרים קליניים נוספים על פי אופי הניסוי וסוג בעל החיים. קטגורית ההתנהגות הכללית תכלול שינויים בהתנהגות הטבעית של בעל החיים. קטגורית התגובה לגירוי חיצוני תכלול שינויים התנהגותיים לגירויים חיצוניים.

מעשית יש להתחיל בביצוע תצפית זהירה ככל האפשר ללא הפרעה לבעל החיים מצד החוקר למאפייני המופע הכללי ומנח בעל החיים. כן ניתן להעריך במקביל חלק ממאפייני התגובה לגירוי חיצוני, למשל: רעש, עוצמת תאורה, שאינם כרוכים בגישה לכלוב. לאחר מכן רצוי לקיים בחינה קלינית לבעל החיים ולתעד את תוצאותיה. כחלק מהבחינה הקלינית ניתן לבצע בדיקה התנהגותית לגירוי חיצוני בה נוכחות המעריך במרחב בעל החיים ברורה.

ניתן להשתמש בכלי ה-scoring table לניקוד מצב בעל החיים כבסיס אובייקטיבי להחלטה על תנאי להפסקת ניסוי. שימוש ב-scoring table גם יכול לשפר את המיומנות התצפיתית של החוקרים. חשוב לדעת שכלי ה-scoring table אינו מכסה חריגות מהמתווה החזוי לניסוי, ולכן אינו יכול להחליף בחינה פיזית של בעל החיים.

ראוי להרחיב את המדדים הכלליים לשם התאמתם למודל הניסויי שצפוי להיות בשימוש. כך יוערכו לא רק הבריאות הכללית של בעל החיים אלא גם מידת הסטייה של המודל מהנורמה הבסיסית. דהיינו ניסוי הפיילוט יכול הערכת מדדים גם לחיה נאיבית. זאת לפני המעבר למהלך הניסוי הספציפי - שעבורו יקבעו נקודות סיום פרטניות נוספות בצורה של פיילוט או בדרך אחרת.

ירידה במשקל בעל החיים יכולה לשמש כמדד להתדרדרות במצבו של בעל החיים, אולם השימוש במדד זה אפקטיבי רק כאשר הוא משמש בהשוואה לזה של בעל חיים נאיבי בן אותו מין וגיל. שימו לב שמדד זה אינו רלוונטי בניסויים קצרי מועד.

חום הגוף יכול לשמש כמדד להתדרדרות במצב בעל החיים עבור מודלים של מחלות (נגיפיות וזיהומיות) או מצב טוקסי.



משרד
הבריאות
נחיים בריאים יותר

המדען הראשי
המועצה לניסויים בבעלי חיים
The Council for Experiments on Animal Subjects

קביעה ופיתוח של END POINT לניסויים בבע"ח
גרסת 6/2018

מובן כי קביעת מאפיינים התנהגותיים בצורה מקיפה עשויה להוות מחקר בפני עצמו ולכן אינה ראלית תמיד למטרת הערכת המצב הכללי של בעל החיים המיועד למחקר שאינו בתחום ההתנהגותי. למרות זאת שימוש בניסוי פיילוט לקביעת קריטריונים תצפיתיים התנהגותיים לשם קביעת נקודת סיום מומלצת בשלב הכניסה לפרוייקט המחקר.

תפקיד הוועדה המוסדית לטיפול ושימוש בבעלי חיים

לוועדה המוסדית תפקיד חשוב בהבטחת קביעת נקודות סיום מוקדמות ככל האפשר תוך מתן אפשרות לקבלת תוצאות מדעיות מהימנות. בבואה לקבוע נקודת סיום לניסוי הוועדה צריכה לבחון את:

- ההצדקה המדעית לשימוש בנקודת הסיום המוצעת.
- מהו מהלך הזמן להתפתחותם של סימני הכאב והסבל ומאפייניהם בפרק בזמן הרלוונטי למודל הניסוי הספציפי.
- באיזו נקודת זמן בניסוי הפעולה של המודל אמורה להיות חמורה.
- במידה וסממני המודל אינם מוכרים, האם ניתן לקיים ניסוי פיילוט והאם עריכתו יכולה לענות על החוסר?
- האם יש scoring table בעזרתו ניתן לבסס נקודת סיום?
- מי האחראי לקיים מעקב על החיות ולתעדו?
- האם יש שרשרת דיווח ברורה?
- מהי תדירות המעקב הדרושה בכל שלב של הניסוי?
- האם צוות המחקר מיומן בהערכת הסמנים שישמשו כנקודת סיום במודל הניסוי הספציפי?
- כיצד יפעלו במקרה של חריגות מהמתאר החזוי של הניסוי?
- במחקר טוקסיקולוגי; האם הוערך מידע טוקסיקולוגי קיים?



מקורות

Guidelines for Endpoints in Animal Study Proposals (2016). https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/asp_endpoints.pdf

CCAC guidelines on: choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing (1998). http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (1997), UKCCCR Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia, 2nd ed. London, England. <http://ciepal-azur.unice.fr/Oncology%20animal%20guides.pdf>

Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane END-POINTS for Experimental Animals Used in Safety Evaluation (2000). https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gd19.pdf ; [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono\(2000\)7](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2000)7)

Humane Endpoints

<http://altweb.jhsph.edu/resources/refinement/sections/endpoints.html>

Humane Endpoints <https://www.nc3rs.org.uk/humane-endpoints>

3Rs-Centre Utrecht Life Sciences. <https://www.humane-endpoints.info/en>

eModule : Recognition and Prevention of Pain, Suffering and Distress in Laboratory Animals <https://flairelearning.com/course/recognition-and-prevention-of-pain-suffering-and-distress/>

The reporting of clinical signs in laboratory animals (2015). FELASA Working Group Report JM Fentener van Vlissingen, M Borrens, A Girod, P Lelovas, F Morrison and Y Saavedra Torres. Laboratory Animals 2015, Vol. 49(4) 267–283. <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0023677215584249>

Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report (2018). [Smith D](#), [Anderson D](#), [Degryse AD](#), [Bol C](#), [Criado A](#), [Ferrara A](#), [Franco NH](#), [Gyertyan I](#), [Orellana JM](#), [Ostergaard G](#), [Varga O](#), [Voipio HM](#). Laboratory Animals 2018, Vol. 52(1 suppl) 5-57. <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0023677217744587>



משרד
הבריאות
נחיים בריאים יותר

המדען הראשי
המועצה לניסויים בבעלי חיים
The Council for Experiments on Animal Subjects

קביעה ופיתוח של END POINT לניסויים בבע"ח
גרסת 6/2018

מדדי בריאות לבעלי חיים להערכה בזמן שהותם במוסד (ביו אם בניסוי ובין אם לא) - סימנים קליניים
טבלה 1 : מדדי בריאות לבעלי חיים

ממד	סממן
מופע כללי	דה-הידרציה (יובש); המנעות משתיה;
	ירידה במשקל; איבוד מסת גוף מתמשכת /או מהירה; אנוורקסיה (רזון); שקיעת צלעות; מסת רקמות;
מומים	פגיעה עצמית; חסרים אנטומיים; שברים; גפה שבורה;
	מנח חריג; קיפוחה (עקמת); לרדוקסיס; תנוחת גיבנתית/קשיחות תנוחתית;
חוס הגוף	היפרטרמיה והיפוטרמיה; רעד;
מופע	נפיחות; צניחת איברים; פארא-פימוזיס; כל מצב הפוגע בתפקודים היומיים של אכילה ושתייה; הפלות; סימני גסיסה; בצקות; השמעת קולות חריגה;
עור	דיסקולורציה; כתמי שתן; חיוורון; אודם; כיחלון; צהבת; אנמיה;
	התקרחות; פרווה סמורה; פרווה סתורה /או לא מטופלת; חוסר טיפוח הפרווה; חבורות בעור;
פגעים וחריגות	פצעים; מורסות; כיבים; בצקות; הגדלה בטנית /או אסייטיס; דרמטיטיס; קשיחות ביטנית; יובש; חוסר חלב אם; חריגות בבלוטות החלב; חבורות בעור;
עיניים	עיניים בולטות (אקסופהטרלמוס); עיניים קטנות (מיקרופהטרלמוס); צניחת עפעפיים; סגירת עפעפים; אודם; דמיעה; פלט עיני; עכירות; דימום עיני; זיהום עיני; קיבעון עיני; תגובתיות אישון;
אף, פה וראש	הטיית ראש; פלט אפי; סגר פה לא תקין; ריוך; דימום אפי; אודם אפי; השמעת קולות חריגה; הקאות;
נשימה	שיעול ועיטוש; נשימה כבדה; נשימה מהירה; חרחור נשימתי; נשימה מאומצת; קשיי נשימה; בצקות; הפרשות ריאתיות;
הפרשות (שתן וצואה)	דיסקולורציה; דימום מסוגרים; דם בהפרשה; כל מצב הפוגע בתפקודים היומיים בנוגע להפרשות; הפרשות לא רצוניות;
	מתן שתן בעודף (שתן דליל); חסימת דרכי השתן (אי מתן שתן); מתן שתן בחוסר; עצירת שתן; הפרשות וגינליות;
צואה	הפרשה דלילה; שלשול; שלשול מתיש; עצירות; הצטברות רקטלית;
	היפראקטיביות; אטקסיה; אפתיה; שיתוק; רעד; תרדמת או שכיבה מתמדת; הפרעת תנועה (הגבלה); חוסר הכרה; חוסר תנועתיות; צליעה; השתטחות; כל מצב הפוגע בתפקודים היומיים בנוגע לתנועתיות;
תנועה	יצובה כפופה; התנפחות מפרקים; קיפוחה (עקמת); צליעה; לרדוקסיס;
	התקפי עווית; שיתוק; תנועה סיבובית; עיוורון; רעד; התקפים (לא רצוניים); עוויתות;
רפלקסים	רפלקסים שונים; הליכה במעגלים; איבוד אפסק הישור; התנהגות: פגיעה עצמית; הפרעת תנועה (הגבלה); התנהגות כפיתית; התקפים (לא רצוניים); חריגה בהתנהגות התנועתית; השתטחות;
מינים ימיים	עיוות שדרת; רזון; נגעי עור; חשיפת רקמת שריר /או רקמות אחרות.



משרד
הבריאות
נחיים בריאים יותר

המדען הראשי
המועצה לניסויים בבעלי חיים
The Council for Experiments on Animal Subjects

קביעה ופיתוח של END POINT לניסויים בבע"ח
גרסת 6/2018

להערכת בריאות בעלי החיים וניתור נקודות סיום ניסויים ניתן להשתמש גם באמצעים טכנולוגיים: למשל שימוש ב-MRI, ב-CT, אמצעי הדמיה נוספים ועוד, כתלות במודל ובשאלה המחקרית. שימו לב כי בזמן שהות בעלי החיים במוסד יתכנו מופעים בריאותיים מסוגים שונים ללא כל קשר לעריכת הניסוי. גם להם יש להערך.

דוגמאות

סרטן

חיה שמאבדת 20% ממשקל התחלתי או 10% בין שקילות עוקבות תוצא מהניסוי, מעקב שקילה לפחות פעם בשבוע, יש לחסר ממשקל החיה את משקל הגידול כאשר חוק אצבע אומר שבעכבר גידול של 1,000 מ"מ"ק שווה בערך למשקל של 1 גרם.

שימוש בקריטריון של ירידה במשקל הגוף (למשל עד 20%) כנקודת סיום חייב שיעשה תוך השוואתו למשקל הגוף של חיה נורמלית באותה נקודת זמן (ובהתחשב במסת הגידול הסרטני).

ככלל עומס הגידול הסרטני אסור שיעבור ערך משקלי של 5% ממשקל הגוף הנורמלי של בעל החיים למודלים של העברת סרטן וערך משקלי של 10% ממשקל הגוף הנורמלי למודלים של טיפול בסרטן. שיעור משקלי זה תואם בעכברים לקוטר של 17 מ"מ בהשתלות ב-flank או קוטר של 15 מ"מ בהשתלות באזורים אחרים (ובחולדות לקוטר של 35 מ"מ). בעכבר נפח גידול של עד 1,500 מ"מ"ק מספיק לרוב המחקרים, שימוש בנפח גידול של עד 2,000 מ"מ"ק הוא חריג ודורש הצדקה ספציפית.

מדדי בריאות נוספים הרלוונטים למחקר בסרטן והמשמשים כנקודת סיום: רזון קיצוני (קחקציה), אפטיה, נשימה מאומצת, התכייבות הגידול, שיתוק כלשהו.

יצור נוגדנים חד-שבטיים במכרסמים

ככל שיש צורך להשתמש במכרסמים על מנת ליצר נוגדנים חד-שבטיים יש להבטיח כי: א. הגידול במשקל הגוף עקב הצטברות נוזל אסציטי בחלל הבטן/או שגשוג התאים הסרטניים לא יגרמו בפני עצמם לכאב וסבל לבעל החיים. ב. בהנתן מצבו הבריאותי של העכבר, יש להחזיר עד שני נקזים כאשר השני מוחדר רק בהליך טרמינלי. יש לבצע את החדרת הנקז תחת הרדמה כללית.

עקב ההתפתחות בשיטות *in vitro* ליצור נוגדנים, ניתן להצדיק את השימוש בטכניקת הנוזל האסציטי רק לאחר שוודאה אי יעילות שיטת ה-*in vitro*. ניסויים מעין אלה מחייבים משטר מעקב הדוק על בריאות בעלי החיים.

מהניסיון בישראל נראה כי על מנת לשפר את רווחת בעלי החיים בניסויים אלו עדיף לקיים בזכרים ולקיים בין 3-5 ניקוזים כל יומים, לאחר הבדיקה הקלינית בבוקר.

ישנם מקורות מידע הן לגבי שיטות חלופיות ליצור הנוגדנים החד-שבטיים והן לגבי עידון *refinement* הניסוי.

משקל בעל החיים

ירידת משקל של 10% בין שתי שקילות תכופות (במרווח של עד 3 ימים) או ירידת משקל של 20% יחסית למשקל ההתחלתי/המקסימאלי של החיה. (שימו לב שבהתאם למודל יתכנו ערכי מטרה שונים - לא רק 10% או 20%)

במידה וחיה נמצאת בשלבי גדילה, חוסר עליה במשקל יחסית לקבוצת הביקורת.



משרד
הבריאות
נחיים בריאים יותר

המדען הראשי
המועצה לניסויים בבעלי חיים
The Council for Experiments on Animal Subjects

קביעה ופיתוח של END POINT לניסויים בבע"ח
גרסת 6/2018

יש לשים לב שקריטריון המשקל אינו מתאים לכל ניסוי, במיוחד אם מדובר בניסוי קצר מועד. כן יש לשים לב שהערכת שינויים במשקל תעשה אל מול זה של חיה נאיבית בת אותו מין וגיל.

התייבשות

התייבשות ניתנת להערכה ע"י זיהוי ירידה באלסטיות העור – בזה שהעור לא חוזר למצבו לאחר מתיחה. במידה ומזוהה מצב שכזה, דורש טיפול בהתייעצות עם הווטרנר. במידה ואין שיפור במצב החיה, לאחר יומיים של טיפול, יש להוציא את החיה מהניסוי. החזקה מעבר לכך בכפוף לאישור הווטרנר.

מודל מחקר סכרתי

מחלת הסכרת היא מחלה מטבולית חמורה שממנה עשויות החיות למות, המחלה פוגעת בעיקר במערכת העצבים, בכליות וברטינה. הסכרת גורמת לשתייה והשתנה מרובה ולכן: לחיות סכרתיות יש להחליף את מצע הכלובים בתדירות מוגברת (לפחות כפולה מהרגיל). יש לבדוק מים ואוכל כל יום. יש להמנע מהגבלת מזון ומים (צום) של יותר מ-6 שעות. כמו כן, אם נדרשת הגבלת מזון ומים (צום) יש לבצעה בשעות היום. (לפני מבחן העמסת גלוקוז או לפני מתן STZ). יש לבדוק את רמת גלוקוז בדם לפחות פעם בשבוע ע"י לקיחת טיפת דם מקצה הזנב.

ניתן להשתמש במדד המשקל כנקודת סיום, לפי ירדה במשקל יותר מ 20% ממשקל התחלתי או 10% בין שקילות עוקבות תוצא מהניסוי, תדירות בדיקה פעמים בשבוע, בכפוף למגבלות על השקילה שתוארו לעיל.

ניתן להשתמש במדד רמת הגלוקוז בדם כנקודת סיום, למשל לעכבר או חולדה עם רמת גלוקוז גבוהה (למשל מעל 400 מ"ג/דציליטר) - יש לסיים את הניסוי או לטפל (לדוג' באינסולין), אם החיה מטופלת יש לבדוק אותה פעמיים ביום ולבצע שקילה יומית. חיה מטופלת שמראה רמת הגלוקוז בדם נמוכה (למשל מתחת ל- 70 מ"ג/דציליטר) נמצאת בסכנת תרדמת ותורחק. חיה שמטופלת באינסולין – יש לבדוק את רמת הגלוקוז בדם כל יום ביומיים אחרי מתן האינסולין.