

2023-2024 YLEISTAJUISET TIIVISTELMÄT JA TAKAUTUVAT ARVIOINNIT TUTKIMUSHANKKEISTA, JOISTA LAUTAKUNTA ON MÄÄRÄNNYT ARVIOIN- NIN TEHTÄVÄKSI HANKKEEN PÄÄTYTTYÄ

Hankkeet on hyväksytty vuosina 2017–2021. Takautuva arviointi tehdään hankkeen päätyttyä. Jos hanke on saanut luvallensa jatkoaikaa, arviointi tehdään tämän päätyttyä.

1. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ			
Hankkeen nimi	Geenien toiminnan, kudosteknologian ja hoitomahdollisuuksien tutkiminen endogeenisen geenien yliekspression avulla		
Hankeluvan kesto	3 vuotta		
Avainsanat (enintään 5)	Hermokasvutekijät, aivotoiminta, hermorappeumasairaus, Hirschsprungin tauti, munuaisten kehitys		
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	<u>Kyllä</u>	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	<u>Kyllä</u>	Ei
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Kyllä	<u>Ei</u>
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Kyllä	<u>Ei</u>
	Lajien säilyttäminen	Kyllä	<u>Ei</u>
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Kyllä	<u>Ei</u>
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Kyllä	<u>Ei</u>
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	<u>Kyllä</u>	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Projektilla on kaksi pääasiallista tutkimussuuntausta. Ensiksi tar- koituksena on karakterisoida endogeenisen gliasolulinjaperäisen hermokasvutekijän (GDNF) tehtäviä eri elinjärjestelmissä. GDNF:llä on tärkeä rooli Parkinsonin taudissa kuolevien dopamiini- neuronien selviämistä edistävä tekijänä. GDNF:llä on myös mo- nia muita tehtäviä sekä aivoissa että muualla kehossa eläimen kehitys- ja aikuisuusvaiheen aikana. Olemme kiinnostuneita jat- kamaan havaittujen ilmiöiden analysointia saadaksemme tie- toa, josta voisi olla hyötyä esimerkiksi Hirschsprungin taudin, pään ja kaulan alueen syöpien kemoterapiahoidon sivuvaikutuk- sena aiheuttaman suun kuivumisen, Parkinsonin taudin, lääke- riippuvuuden, amyotrofisen lateraaliskleroosin (ALS) ja munuais- ten ja virtsateiden synnynnäisten poikkeamien (CAKUT) hoi- dossa. Toinen tutkimuksemme päätavoite on nostaa eri geenien tasoja niiden luonnollisista ilmentymispaikoista saadaksemme tietoa useiden elinjärjestelmien kehityksestä ja toiminnasta. Endogee- nisen GDNF:n ilmentymistä voidaan lisätä koko eläimen eliniäksi tai tiettyyn aikaan valituissa kudoksissa muuntelemalla GDNF:n lähetin-RNA:n 3' ei-koodaavaa aluetta (3'UTR). Löytöjemme pe- rusteella olemme myös kehittäneet metodin, joka mahdollistaa endogeenisen GDNF:n ilmentymistasojen lisäämisen villityyppi- sissä hiiritsygooteissa. Lisäksi tulemme tutkimaan metodimme		

	mahdollisia terapeuttisia soveltamismahdollisuuksia Parkinsonin taudissa.
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	Projektimme ensimmäinen tavoite on edistää GDNF:n toimintojen ymmärtämistä eri elinjärjestelmissä. Useilla projektin tutkimuskysymyksillä on suora yhteys ihmisillä esiintyviin sairauksiin. Toinen tavoitteemme on arvioida geenien "knock-up" -lähestymistavan sovellettavuutta tutkimuksessa. Metodin potentiaalisia käyttökohteita löytyy perustutkimuksessa, terapeuttisissa sovellutuksissa, parempien tauteja mallintavien eläinmallien kehittämisessä, kudosteknologiassa ja synteettisessä biologiassa.
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 9600, Rotta, 200 eläintä
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Osalla geenimuunnelluista eläimistä voi esiintyä munuaisen vajaatoimintaa, emättimen suuaukon puuttumista tai suoliston laajentumaa. Näitä fenotyyppisiä ilmentävät poikaset lopetetaan ennen lopetuskriteerien täyttymistä. SOD1-G93A -muuntogeeniselle hiirelle kehittyy raajojen halvaus ja nämä lopetetaan lopetuskriteerien perusteella. Osalle hiiristä saattaa kehittyä ikääntymisen myötä hermo-lihasjärjestelmän toimintahäiriöitä. Toimenpiteistä koituvaa haittaa tulee kirurgiasta, verinäytteiden otosta, käyttäytymistesteistä, paastotuksista, annosteluista sekä säteilytyksistä. Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Solu- ja kudostiljelmillä ei voida korvata eläinmalleja tässä projektissa, koska niiden avulla ei ole mahdollista tutkia elinten toimintoja, aineenvaihduntaa eikä käyttäytymistä. Sekä ennen eläinkokeiden tekemistä sekä rinnakkain eläinkokeiden kanssa tehdään kuitenkin <i>in vitro</i> kokeita, jotta kokeissa tarvittavien eläinten lukumäärä voidaan saada mahdollisimman alhaiseksi.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Eläinkokeissa käytettävien eläinten määrä lasketaan tilastolliset seikat ja aikaisempi kokemus huomioon ottaen, jotta käytettyjen koe-eläinten lukumäärä on perusteltu. Vaihtelevuuden vähentämiseksi tehdään työtä, ja siten tarvittavien eläinten määrää saadaan myös vähennettyä.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Hiiret ovat riittävän samanlaisia kuin ihmiset ja niiden geenien ilmentymismallit, fysiologia ja käytös tunnetaan hyvin. b) Verrattuna muihin nisäkkäisiin, hiirille on verrattain helppo tehdä geenimuuntelua. Eri elinjärjestelmien kehitys ja toiminnot ovat hyvin karakterisoitu hiirillä. Eläinmallit valitaan niin, että ne edustavat parhaiten hiljattain kehittämämme metodin potentiaalisia käyttötarkoituksia elinjärjestelmien joukossa. c) Säteilytyskäsitely aiheuttaa joitakin sivuvaikutuksia. Annokset lasketaan niin, että sivuvaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä, tieteelliset tavoitteet huomioon ottaen. Sod1^{G93A}-hiirille kehittyy jalkojen halvaus ja sairauden loppuvaiheessa niiden on vaikeaa hakeutua syömään ja juomaan. Hiirille tarjotaan tarvittaessa helposti nieltävää, koostumukseltaan pehmeää

	ruokaa. Myös suolaliuosinjektioita voidaan antaa jos välttämättömyyttä. Eläinten hyvinvointia tarkkaillaan tarkasti yhteistyössä eläintenhoitajien kanssa. Kaikkiin hyvinvointiin liittyviin ongelmiin reagoidaan nopeasti, ja eläimet lopetetaan, mikäli lopetuskriteerit täyttyvät.	
ELLA täyttää: Tehdäänkö hankkeesta takautuva arviointi?	KYLLÄ	EI
	X	
	Takautuva arviointi tehdään hankkeen päättymisen jälkeen. Hakijan on toimitettava tiedot arviointia varten 3 kuukauden kuluessa päättymisestä. Arviointi tehdään 6 kuukauden kuluessa tietojen toimittamisesta ja tulokset lisätään yleistajuiseen tiivistelmään.	

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Käytetään apinoita

Muu peruste

Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen 1. tavoite oli karakterisoida endogeenisen gliaolulinjaperäisen hermokasvutekijän (GDNF) tehtäviä eri elinjärjestelmissä. Suurin osa tavoitteesta saavutettiin ja tämän tavoitteen osalta julkaistiin yli 10 tieteellistä artikkelia, jotka liittyvät keskushermosto-, suolisto- ja munuais-tutkimukseen.

Keskushermostoon liittyvässä tutkimuksessa pystyimme mm. osoittamaan, että endogeenisen GDNF:n lisäys parantaa motorikkaa ilman haitallisia sivuvaikutuksia. Hiirten pitkäaikainen seuranta osoitti myös, että GDNF:n noin 2-kertainen lisäys ei aiheuta syöpiä. Osoitimme myös, että GDNF hidastaa ikääntymiseen liittyvää kognition alentumista mikä liittyy oleellisesti esimerkiksi Alzheimerin tautiin. Havaitsimme myös, että endogeenisen GDNF:n 2-3-kertainen lisääntyminen pidentää tervettä elinaikaa noin 12 viikolla ALS-hiirillä. Tulokset tukevat GDNF pohjaisten ja GDNF:n vaikutuksia mukailevien pienmolekyylien kehittämistä. Yritimme parantaa lääkkeellä aiheutettua Parkinsonin hiirimallin sairautta nostamalla GDNF-tasoa. Vaikka tulokset olivatkin negatiiviset, niiden pohjalta julkaistiin artikkeli, jossa kokeen kulku ja tulokset esitetään.

Suolistoon liittyvässä tutkimuksessa karakterisoimme Gfra1-hypomorfisille hiirille aiheutuvaa Hirschsprungin tautia (HSCR) ja siihen liittyvää koliittia. Hiirimallin avulla olemme tuoneet uutta tietoa enterokoliitin patologisten tapahtumien aikajärjestyksestä. Tavoitteemme oli myös lievittää tautiin liittyviä oireita vaikuttamalla estrogeenijärjestelmään. Kokeen tulokset osoittivat, että estrogeenijärjestelmään vaikuttaminen kehityksen aikana ei vähennä HSCR:ään liittyviä oireita. Vaikkakin tulokset olivat negatiiviset, niiden pohjalta on tarkoitus julkaista artikkeli.

Julkaisimme myös kaksi artikkelia liittyen munuaisten kehitykseen, joissa karakterisoimme miten GDNF vaikuttaa munuaisten kehitykseen. Tulokset viittaavat siihen, että esimerkiksi osa munuaisten ja virtsateiden synnynnäisiä poikkeavuuksia (CAKUT) saattavat liittyä GDNF-tasojen säätelyhäiriöihin.

Hankkeen 2. tavoite oli nostaa eri geenien tasoa muokkaamalla RNA:n 3' ei-koodaavaa aluetta (3'UTR). Olimme käyttäneet kyseistä tekniikkaa GDNF-tasojen nostamiseen onnistuneesti, mutta muiden tutkittujen geenien kohdalla tekniikka ei toiminut sellaisella tavalla kuin GDNF-geeniin pohjautuvista tutkimuksista olisi voinut päätellä. Tästä syystä suurin osa tavoitteeseen liittyvistä kokeista jäi tekemättä.

Todelliset haittavaikutukset:

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (<i>Mus musculus</i>)	137	1725	796	16

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Eläinten arvioitu vakavuusluokka vastaa todettua vakavuusluokkaa noin 90% ajasta. Noin 10% ajasta eläinten vakavuusluokka on ollut pienempi kuin arvioitu. Tämä johtuu siitä, että kaikille eläimille ei ole tehty kaikkia eläinluvassa listattuja toimenpiteitä, kuten esimerkiksi leikkauksia, koska tarvittavat tulokset saatiin oletettua pienemmällä määrällä eläimiä.

Käytettyjen eläinten todellinen määrä on pienempi kuin arvioitu määrä. Osittain tämä selittyy sillä, että joidenkin osahankkeiden yksittäisiä kokeita ei toteutettu. Toinen selittävä tekijä on, että hankkeen 2. tavoite ei toiminut sillä tavalla kuin oletettiin GDNF-geeniin perustuvien tuloksen pohjalta, josta syystä suunniteltuja kokeita ei toteutettu.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

Emme pystyneet määrittämään keinoja, joilla käyttäytymiskokeita ja elinten toimintaan tähtääviä tutkimuksia oltaisiin voitu korvata *in vitro* tai *in silico* -menetelmillä.

Vähentäminen

Tutkimuksesta saatu tieto, että 2-3-kertaiset GDNF-tasot hidastavat ALS-taudin kehitystä tai ikäännytykseen liittyvää kognition heikentymistä (Alzheimerin tauti) ovat hyödyllisiä tutkimuksissa, joissa tutkitaan esimerkiksi jo kehitteillä olevia GDNF:n vaikutuksia mukailevia pienmolekyylejä. Tuottamamme tieto auttaa annostasojen valitsemisessa, jonka seurauksesta käytettyjen eläinten määrää voidaan vähentää.

Käytettyjen eläinten määrä oli pienempi kuin arvioitu määrä (Kts. tavoitteiden saavuttaminen).

Parantaminen

Käytetyt eläinmallit ovat tarkoituksenmukaisia, koska olemme pystyneet osoittamaan, että ne mallintavat ihmisten sairauksia hyvin. Valitsimme ALS-mallin, joka edustaa lannerangan alkavaa ALS:ää ja tuloksemme ihmisen selkäytimestä otetuista näytteistä osoittavat, että lannerangan selkäytimen GDNF-tasot korreloivat ihmisten eliniän kanssa. Näin ollen odotamme, että aikuisen GDNF-signaalin lisääminen esimerkiksi GDNF:n vaikutuksia mukailevilla pienmolekyyleillä lievittää ALS:n etenemistä lannerangan ALS-taudissa. Tämä on hyvin merkittävää, koska ALS-taudin hoitoon on tällä hetkellä hyvin vähän (tai ei ollenkaan) lääkkeitä, jotka parantavat tai lisäävät elämänlaatua merkittävästi.

Myös Gfra1-hypomorfisen hiiren käyttö suolistoon liittyvässä tutkimuksessa on tarkoituksenmukaista, koska se on ainoa hiirimalli, jolla voi tutkia Hirschsprungin taudin koliittia, joka johtuu GDNF signaalin puutoksesta.

Muuta

Tulokset julkaistaan tieteellisissä artikkeleissa.

2. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ

Hankkeen nimi	Neuropaattisen kivun ja hypoksis-iskeemisen enkefalopatian PET-kuvantaminen
----------------------	---

Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Neuropaattinen kipu, PET, Xenon, hypotermia, virikkeellistäminen	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonien ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Hypoksis-iskeeminen enkefalopatia (HIE) on vastasyntyneiden hapenpuutostilan tärkein komplikaatio, ja on arvioitu, että noin 25 %:lla selviytyjistä on hermostollisia ongelmia HIE:n seurauksena. Neuropaattisen kivun ja HIE:n mekanismin tunteminen, sekä uusien terapiamuotojen ja lääkkeiden kehittäminen on kliinisesti tärkeä tavoite. Neuropaattinen kipu saa ihmisissä aikaan elämänlaadun heikentymistä, joten kipu itsessään on tärkeä hoidon kohde. Kivun syntymisen mekanismeja ei kuitenkaan tiedetä, eikä tyypillisillä lääkkeillä ole tehoa. Tavoitteemme on kehittää kuvantamistapoja, joilla pystytään tarkemmin havainnoimaan hermostollisia sairauksia. Positroniemissio- tomografia (PET) on molekulaarinen kuvantamistapa, jolla voidaan kajoamatta kuvantaa elävän kehon toimintoja. Viime vuosina on huomattu, että koe-eläinten spontaania liikeaktiivisuutta lisäävä elinympäristön virikkeellistäminen vähentää stressiä ja lisää sosiaalista kehitystä ja on myös tehokas tapa helpottaa hermostollisia oireita. Parantavaa mekanismeja tai pitkän ajan vaikutuksia ei ole vielä kuitenkaan kunnolla tutkittu. Virikkeellistämisen hyötyjen osoittaminen voisi auttaa uusien hoitojen kehittämistä hermostollisiin sairauksiin. Uusien hoitomuotojen kehittämisellä on myös taloudellisia etuja. Kajoamaton kuvantaminen mahdollistaa saman yksilön pitkän seuranta-ajan, jonka kuluessa virikkeellistämisen vaikutusta voidaan tutkia.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteemme on kehittää PET-kuvantamistapoja, joilla pystytään havainnoida neurologisia sairauksia, ja joita voidaan käyttää kliinisessä diagnostiikassa, sekä mahdollisesti lääkkeiden kehityksessä. Lisäksi arvioimme elinympäristön virikkeellistämisen vaikutusta hermostollisia sairauksia mallintavassa rottamallissa (neuropaattinen kipu ja HIE) pitkällä aikavälillä. Tutkimuksen tulokset auttavat kehittämään uusia terapiamuotoja, jotka perustuvat käyttäytymisen stimulaation ja kuntoutumiseen ilman lääk pohjaista hoitoa, sekä ymmärtämään virikkeellistämisen vaikutusten mekanismeja. Pyrimme myös ymmärtämään elinympäristön vaikutusta tutkimustuloksiin.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Rotta 900 eläintä	

Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Rotille tehdään neuropaattisen kivun mallissa vasemman raajan iskiashermon ligaatio. Kokeen kuluessa rotille tehdään käyttäytymistestejä, kuvannetaan ja otetaan verinäytteitä. Neuropaattisen kivun mallissa kivulle herkistyminen ilmenee pääasiassa erikseen testattaessa, mutta myös spontaania kipua voi aiheutua noin kuukauden ajan. Kokeen lopussa eläimet lopetetaan. Vastasyntyneiden hapenpuutosmallissa viikon ikäisille rotille aiheutetaan hapenpuute aivoihin kirurgisella (kaulavaltimo sidotaan) operaatiolla ja pitämällä niitä matalassa happipitoisuudessa. Rottia kuvannetaan toistetusti ja tehdään käyttäytymistestejä. Kokeen päätteeksi rotat lopetetaan. Vakavuusluokka: kohtalainen, vakava
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Tutkimuksen tavoitteena on kehittää kuvantamismenetelmiä neurologisille sairauksille, sekä tutkia elinympäristön virikkeellistämisen vaikutuksia eläinten kuntoutumiseen ja stressin lievittämiseen. Koetta ei voi suorittaa ilman eläinmallia.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Käytettävien eläinten määrän arvio perustuu aiempaan kokeemukseemme ja viimeaikaisiin tutkimustuloksiin, jossa on toteutettu samankaltaisia tutkimuksia. Ryhmäkohti tarkistetaan joka kokeen alussa, ja varmistetaan, että käytetään pienintä mahdollista eläinmäärää.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Tutkimuksessa käytetään rottia, koska hermostollisia sairauksia on aikaisemmin kuvattu rotissa rutiininomaisesti PET-kuvantamistekniikalla. b) Hiiren pieni koko vaikeuttaisi PET-kuvien tulkintaa. c) Jos eläimillä havaitaan vakavaa yleiskunnon heikentymistä, ne lopetetaan suositusten mukaisesti.

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteet saavutettiin pääosin. Osahankkeen 1 tulokset on julkaistu vuonna 2022. Osahankkeesta 2 yksi käsikirjoitus on lähetetty tieteellisiin lehtiin ja se on alustavasti hyväksytty julkaistavaksi.

Osahanke 1. Neuropaattisen kivun kuvantaminen:

Tavoite oli evaluoida PET-kuvantamisen kykyä todentaa neuropaattisesta kivusta aiheutunutta tulehduspesäkettä iskiashermon alueella. PET-merkkiaine kerääntyi odotetusti tulehdusalueelle (todennettu *ex vivo* menetelmä), mutta eläin-PET-kamera (*in vivo* menetelmä) ei kyennyt, kameran teknisistä syistä johtuen, havaitsemaan pesäkettä. Koska *in vivo* kuvantaminen ei onnistunut, osatyö 1:een sisällytetty virikkeellistämisen osuus jäi toteutumatta. Sen tarkoitus oli tuolla kuvantamisella seurata virikkeellistämisen vaikutusta neuropaattisen kivun aiheuttaman tulehduksen lievittämiseen ajan saatossa.

Osahanke 2. Hypoksis-enkefalopatian kuvantaminen:

Tavoite oli määrittää PET-kuvantamismenetelmän kykyä kuvata HIE-vaurion kehitysvaiheita ja vakavuutta. Yksi tavoite oli myös eri hoitomuotojen teho, sekä virikkeellistämisen vaikutus vaurion kehittymiseen. Nämä jäivät tekemättä rajoitettujen kuvantamisresurssien vuoksi.

Todelliset haittavaikutukset:

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Rotat (<i>Rattus Norvegicus</i>)	0	42	209	28

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Hankelupa on myönnetty 900 rotalle, mutta käytettyjen eläinten kokonaismäärä oli vain 281 kpl. Luvassa arvioitiin, että noin 10 % operoiduista eläimistä menetetään ennen PET-kuvauksia. Ko-
keessa käytetyistä rotista vain 2 (0.71 %) löydettiin kuolleen toimenpiteen jälkeen. Tämä on huo-
mattavasti vähemmän kuin olimme luvassa arvioineet.

Osahankkeessa 1 käytettiin 96 kpl rottaa, joista 28 (27 %:lla) havaittiin vakavampaa haittaa. Tämä
ilmeni takaraajojen halvaantumisena (osittain tai kokonaan). Eläimet pystyivät silti juomaan ja syö-
mään normaalisti.

Osahankkeessa 2 käytettiin 185 kpl rottaa, eikä näissä eläimissä havaittu vakavia haittoja.
Yhteensä osahankkeissa käytettiin 42 kpl rottaa kontrollieläiminä, eikä niille aiheutettu vaurioita.

**Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toi-
mien toteuttamista:****Korvaaminen**

Eläimen fysiologisia toimintoja ei ole mahdollista kuvantaa *in vitro* tai *in silico*. Neuropaattisen ki-
vun kuvantamisen osalta saimme tästä hankkeesta tärkeitä lisäinformaatiota eläinPET-kameran
puutteesta sen teknisessä suorituskyvyssä, jota voidaan huomioida uusien hankkeiden suunnitte-
lussa. Hankkeita, joissa tämä suorituskyky on merkitsevässä roolissa ei kannata toistaiseksi suunni-
tella toteutettavaksi eläinPET-kameralla.

Vähentäminen

Menetettyjen eläinten lukumäärä oli huomattavasti pienempi kuin arvioitu (10 % vs 0.71 %). Näin
ollen eläinten määrä per ryhmä voi olla pienempi tätä eläinmallia hyödyntävissä hankkeissa tule-
vaisuudessa.

Parantaminen

Aiheutettu iskiashermon vaurio aiheutti vakavaa haittaa noin 26 % eläimille. Tätä lukua emme
osanneet tarkkaan arvioida etukäteen. PET-kuvantamismenetelmän toimivuuden osalta oli tärkeää
käyttää eläimiä, joilla oli eriasteinen vaurio. Näin voitiin varmistua siitä, että puuttuva PET-kamera
signaali ei johtunut vaurion puutteesta tai merkkianekertymän epäspesifisyydestä. Vaurion tiede-
tään ilmentävän tulehdusreaktiota vasta 7 vrk kuluttua, joten sitä aiemmin ei ole järkevää yrittää
kuvantaa tulehdusreaktiota tässä mallissa.

Alle 1 % eläimistä menehtyi operaation (osahanke 1) jälkeen, luku oli huomattavasti pienempi kuin
arvioitu (10 %). Operoitujen eläinten hyvinvointia pyrittiin parantamaan lisäämällä ruokaa häkin
pohjalle sekä pesä- ja virikemateriaalia häkkeihin. Lisäksi eläinten hyvinvointia seurattiin päivittäin.
Vakavia haittoja omaavien eläinten hengitys, paino ja nestetasapaino olivat normaalit. Ope-
roiduilla eläimillä esiintyi aluksi tarve pureskella leikkauskohdan ompeleita. Ongelma ratkesi muut-
tamalla ompeleita ihon sisäpuolelle ja pitämällä leikattuja rottia omassa erillisessä häkissä 2 vrk
ajan. Tämä suositellaan mahdollisissa jatkotutkimuksissa otettavaksi käytäntöön kaikilla eläimillä.

Muuta

Hankkeen tulokset on julkaistu open access -tieteellisessä julkaisusarjassa.

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Verisuonivuodon mekanismit ja esto tulehdussairauksissa ja syövässä	
Hankeluvan kesto	Kolme vuotta	
Avainsanat	Sepsis, syöpä, verisuonivuoto	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Tutkimuksessa pyritään selvittämään verisuonten roolia sai- rauksissa, joihin liittyy verisuonten vuotoa, kuten vakavissa tu- lehduksissa ja syövässä. Hankkeen tavoitteena on tuottaa uutta tieteellistä tietoa mekanismeista, jotka säätelevät kudosturvo- tukseen ja elintoiminnan häiriöihin sekä syövän etenemiseen johtavaa patologista verisuonivuotoa. Ymmärtämällä verisuoni- vuodon mekanismeja, tavoitteena on löytää keinoja, joilla veri- suonivuotoa ja sen haitallisia vaikutuksia voitaisiin mahdollisesti estää sairauksissa.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Syöpä ja vakavat tulehdukset, kuten sepsis ovat merkittäviä kuolemaan johtavia tekijöitä länsimaissa. Tutkimuksen odote- taan tuottavan näistä sairauksista uutta tieteellistä tietoa, jonka perusteella voidaan suunnitella soveltavaa tutkimusta ja näin edetä uusien hoitomuotojen kehittämisessä edellä mainittuihin sairauksiin. Lisäksi tutkimuksen tuottamaa tieteellistä tietoa ve- risuonten roolista tulehduksissa ja syövässä voidaan mahdolli- sesti hyödyntää myös muiden verisuoniin liittyvien sairauksien ymmärtämisessä ja tulevaisuuden hoidoissa.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri, 4500 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu hankkeessa haittaa tulehduksen (sepsis) in- dusoinnista, kasvainsolujen annosta ja kasvainten kasvusta, tut- kittavien aineiden annosteluista, kirurgisista toimenpiteistä ja kuvantamisista. Eläimet lopetetaan kunkin osakokeen jälkeen. Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Systeeminen tulehdus ja syöpä ovat sairauksia, joiden tutki- mukseen tarvitaan mahdollisimman hyvin elävää elimistöä muistuttava tutkimusmalli. Verisuonten toiminta on vahvasti si- doksissa ympäröiviin kudoksiin ja toisiin soluihin, mm. immuu- nijärjestelmään ja syöpäsoluihin. Solumalleilla ei pystytäkään riittä- vän hyvin jäljittelemään moniulotteista fysiologista kokonai- suutta, vaan solumalleja täydentämään tarvitaan koe-eläinmal- leja.	

2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Alustavat tutkimukset tullaan tekemään solumalleilla. Pilottitutkimukset eläimillä ovat avainasemassa, ja niiden perusteella suunnitellaan koeasetelma. Yksi osakoe suunnitellaan niin, että yhteen ryhmään tulee 3–12 hiirtä ja kyseinen koe toistetaan maksimissaan kolme kertaa. Hankkeen edetessä tehdään jatkuvaa arviointia, jotta turhia osakokeita ei tehdä.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Hiirellä on nopea lisääntymissykli ja sen genomisekvenssi tunnetaan hyvin. Geenimuunneltujen kantojen saatavuus on hyvä, minkä ansiosta perusteellinen ja tieteellisesti merkittävä tutkimus on mahdollista. Hiiren biologiassa on samankaltaisuksia ihmisen biologiaan, mikä mahdollistaa prekliinisten sovellusten kehittämisen pidemmälle kuin solumalleilla olisi mahdollista. b) Geenimuunneltujen kantojen saatavuus on kattava. Hiirten proteiineja vastaan on saatavilla lukuisia kaupallisia vasta-aineita, jotka edesauttavat tieteellisten tavoitteiden toteutumista c) Eläimille tehtävät toimenpiteet suorittaa aina henkilö, jolla on asianmukainen koulutus ja kokemus tehtävään. Kirurgiset toimenpiteet tehdään nukutuksessa ja kivunpoistosta huolehditaan. Kasvainkokeissa kasvaimen koon ei anneta kasvaa määrättyä kokoa suuremmaksi.

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Sydän- ja verisuonitautien geneettiset tekijät ja molekulaariset mekanismit

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena on ollut tutkia verisuonivuotoa tulehduksessa ja syövässä ja miten verisuonivuotoa voitaisiin estää ko. sairauksissa.

Osahanke 1: Osahankkeessa 1 tutkittiin verisuonivuodon mekanismia aiheuttamalla eläimille systeeminen tulehdus. Verisuonivuotoa pyrittiin estämään erilaisilla vasta-aineilla/lääkeaineilla tai poistogeenisillä hiirimalleilla. Tutkimuksemme osoittivat uuden mekanismin, joka säätelee tulehduksen aiheuttamaa verisuonivuotoa. Osoitimme, että Sharpin-geenin deleetio hiirillä johtaa lisääntyneeseen tulehduksen aiheuttamaan verisuonivuotoon, mutta ei vaikuta suonten läpäisevyyteen terveessä kudoksessa. Käyttäen korvaavia solubiologisia malleja, selvitimme mekanismin havaintomme taustalla. Koska Sharpin estää beta1-integriinin aktivaatiota, tuloksemme tukevat alkupeleistä hypoteesiamme, että beta1-integriinin esto vähentää verisuonivuotoa tulehduksissa. Ymmärtääksemme paremmin beta1-integriinin toimintaa, olemme tutkineet poistogeenisiä beta1-integriini -hiiriä, joissa beta1-integriini-geeni on poistettu aikuisissa hiirissä ilman tulehduksen aiheuttamista. Osoitimme, että beta1-integriinin poistaminen verisuonistosta aikuisella hiirellä aiheuttaa verisuonien surkastumista tietyissä kudoksissa. Verisuonten seinämien soluja kuolee monissa tulehdussairauksissa heikentäen niiden toimintaa ja tämän takia on tärkeä tunnistaa kudosspesifisiä mekanismeja, jotka ylläpitävät verisuonten seinämän soluja. Tuloksemme osoittavat ensimmäistä kertaa beta1-integriinin tärkeän roolin verisuonten vakauden säilyttämisessä terveessä kudoksessa.

Osahanke 2: Osahankkeessa 2 tutkimme kasvainkokeiden avulla verisuoniston roolia syöpäsolujen metastaasissa. Tutkimuksessa käytimme keuhkoihin etäpesäkkeitä muodostavia syöpäsoluja.

Vähentäminen

Osahanke 1: Olemme käyttäneet tulehduskokeissa erilaisia aikapisteitä ja eri määriä tulehduksen-aiheuttajia. Pystymme jatkossa näiden tietojen perusteella vähentämään käytettävien hiirten määrää käyttämällä vain tiettyä (optimaalista) aikapistettä ja aineen pitoisuutta. Kokonaisuudessaan käytettyjen eläinten määrä oli pienempi kuin alun perin hankkeessa arvioitiin. Syitä tähän ovat esimerkiksi se, että yhden hiirilinjamme tausta ei ollut puhdas ja pilottikokeet osoittivat, että tämä vaikutti saamiimme tuloksiin. Puhdistimme hiirilinjan taustan useilla parituskierroksilla, minkä takia varsinaisten kokeiden aloitus on viivästynyt ja merkittävä osa tulehduskokeista jäi tekemättä tämän hankeluvan aikana. Lisäksi emme tehneet osahankkeen 3 kokeita lainkaan.

Osahanke 2: Vastaavasti hankkeen alussa teimme kattavan analyysin metastaasin etenemisestä tutkimusmalleissamme, jonka jälkeen käytimme vain muutamaa aikapistettä. Kokemuksemme tässä hankkeessa antaa jatkossa mahdollisuuden käyttää kokeissa heti sopivia aikapisteitä, jolloin hiiriä tarvitaan vähemmän. Kokonaisuudessaan käytettyjen eläinten määrä oli pienempi kuin alun perin hankkeessa arvioitiin. Tämä selittyy sillä, että keskityimme tutkimuksissamme tässä vaiheessa yhteen kandidaattigeeniin, jonka mekanismia tutkimme ja käytimme siten paljon korvaavia *in vitro* -menetelmiä.

Parantaminen

Osahanke 1: Hankkeen korkein arvioitu vakavuusluokka oli vakava (SV4), mutta suurimman osan hiiristä todellinen vakavuusluokka oli lievä tai kohtalainen. Iso osa hiiristä kuului kontroleihin tai niille ei aiheutettu tulehdusta kokeen luonteen takia, jolloin ne kokivat vain tamoksifeenin annostelun oraalisesti tai yhden i.p. pistoksen, jolloin todellinen haitta jäi lieväksi. Hiirten, joille aiheutettiin tulehdus, todellinen haitta oli kohtalainen, sillä hiiret liikkuivat edelleen häkissä ja ne lopetettiin ennen kuin niille aiheutui vakavaa haittaa. Lisäksi hiirille annettiin häkin pohjalle veteen sekoitettua ruokaa, joka helpottaa niiden ravinnonsaantia tulehduksen aikana. beta1-integriini ja beta1/beta3-integriini poistogeenisille hiirille alkaa tamoksifeenin annostelun jälkeen kertyä nestettä, mutta hiiret lopetettiin suurimmassa osassa kokeita ennen kuin haitta oli kohtalaista. Punnitsimme hiiret kaksi kertaa viikossa kokeen ajan ja seurasimme niitä kokeen lopulla päivittäin, tarkkaillen niiden kuntoa. Mikäli haittoja ilmeni, koe lopetettiin aiemmin. Käyttämämme hiirimallit ovat antaneet tärkeää tietoa verisuonten homeostaasista ja verisuonivuodosta, joten mallit ovat hyviä ja edelleen tarpeellisia jatkotutkimuksissamme.

Osahanke 2: Hankkeen arvioitu vakavuusluokka oli kohtalainen (SV3). Vain osa hiiristä kuului kokeen päättyessä tähän luokkaan, käsittäen metastaasi- ja kasvainkokeet, joiden kesto oli muutamasta päivästä pariin viikkoon. Useissa kokeissa koe lopetettiin kuitenkin aiemmin, koska halusimme tutkia metastaasin varhaisia vaiheita (esim. 6–12 h), ja nämä eläimet kuuluivat vakavuusluokkaan lievä. Käyttämämme mallit toimivat tarkoituksenmukaisesti ja ovat siten käytössä jatkosakin. Erityisesti opimme, että lyhytaikaisilla kokeilla voidaan tutkia metastaasin alkuvaiheita, mikä vähentää kasvaimen koosta johtuvaa haittaa. Jatkossa pidempiä aikapisteitä on tarkoituksenmukaista käyttää, kun halutaan tutkia esim. lääkaineiden pidempiaikaisia vaikutuksia.

Muuta

Kokeiden yksityiskohdat ja havainnot on kirjattu ylös, ja ne ovat kaikkien tutkimusryhmämme jäsenten saatavilla, jolloin kokeita ei tarvitse turhaan toistaa. Lisäksi tulokset julkaistaan siten, että kaikilla on pääsy julkaisuihin ja julkaisuissa kerrotaan yksityiskohtaisesti, miten kokeet on suoritettu, joka edelleen vähentää tarvetta tehdä samankaltaisia kokeita.

Hankkeen nimi	Lääkeaineiden tehon testaaminen amyotrofisen lateraaliskle-roosin (ALS) prekliinisissä tautimalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	ALS, tautimalli,	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope-tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie-teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	ALS:n hoitoon ei ole tällä hetkellä käytössä tehokkaita, sivuvai-kutuksettomia hoitomuotoja. Prekliinisten eläinkokeiden tar-koituksena on edesauttaa mahdollisen ihmiskäyttöön soveltu- van lääkeaineen löytymistä ja sitä kautta helpottaa yksilön hy- vinvointia ja tuoda yhteiskunnallista hyötyä. Hankkeessa testa- taan uusien lääkekandidaattien tehoa (vaikutusta oireiden ke- hittymiseen) vakioidussa eläinmallissa.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi-vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Eläinkokeet ovat välttämättömiä uusien lääkeaineiden kehitys-työssä. Mahdolliset positiiviset tulokset edesauttavat tutkitta- van lääkeaineen etenemistä lääkekehitystyössä mahdollisesti kliinisiin kokeisiin ja myöhemmin valmiiksi lääkkeeksi. Tutki- mukset tuovat merkityksellistä tietoa lääkeaineiden tehosta ALS-taudin monimuotoisen oireiston hoidossa.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin-määrät	Hiiri, 2400 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi-oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu haittaa tautilan indusoinnissa tehtävistä kä-sittelyistä, ml kirurgiset operaatiot. Tautitila kehittyy eläimissä taudin geneettisen taustan seurauksena. Eläimille kehittyy ikäntyessä progressiivisesti etenevä neurologinen tila, joka muistuttaa ihmisellä havaittavaa ALS:a eli oireet ja patologia voimistuvat iän mukana. Haittaa aiheutuu seuranta-aikana myös käyttäytymistesteistä, lääkinnästä ja kuvantamisesta. Eläi- met lopetetaan tutkimusten loputtua. Vakavuusluokat: vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	In vitro -mallit ovat hyvin rajalliset johtuen koko eliön elimistön fysiologisten ja anatomisten ulottuvuuksien puuttumisesta mal-linnettaessa kutakin sairautta in vitro-olosuhteissa. Uusien lääk-keiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä ko-keita, tällä hetkellä mikään in vitro tai in silico lähestymistapa ei pysty ennustamaan lääkeaineen tehoa ja/tai turvallisuutta. In vitro ja in silico mallit tukevat ja voivat auttaa koe-eläin tutki-musten suunnittelussa ja ennustamisessa.	
2. Vähentäminen - Reduction	Koeasetelmat ovat standardoituja ja niiden käytön pohjana on perusteellinen mallien validointityö. Kunkin geneettisen mallin	

Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	taustalla on ihmissairautta oleellisin osin mallintava eläinmallin ilmiasu, jonka tulee olla sekä perinnöllisesti relevantti että oireistoltaan / patologialtaan ihmissairautta kuvaava. Näin varmistetaan, että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ja antaa oikeanlaisen taudinkuvan. Koeasetelmissa ryhmän sisäinen variaatio minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määrittelee tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi) ja joka määrittää koe-eläinten käytön määrän kussakin koeasetelmassa. Validaatiotyön ja tilastollisen voima-analyysin perusteella voidaan luotettavasti ennustaa soveltuvat ryhmäkoot, jotka minimoivat eläinten käytön alimpaan mahdolliseen ilman että koeasetelman tilastollinen voima vaarantuu.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Suuri osa keskushermostollisten kehityssairauksien eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille lääkkeille (jos on) ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Alemmilla selkärankaisilla tai in vitro -menetelmin ei voida saada samanlaista tietoa uusien lääkeaineiden tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole riittävästi tutkittuja, eivätkä yleisesti hyväksyttyjä ja käytettyjä. Tämän lisäksi näistä menetelmistä ei ole saatavissa tietoa tällä hetkellä käytettyjen lääkeaineiden vasteista, joita voitaisiin käyttää verrattaessa uusista lääkeaineista saatavia tuloksia. Eläimille suoritetaan vain tutkimuksen kannalta välttämättömät toimenpiteet. Kirurgiset toimenpiteiden yhteydessä eläimille annostellaan kipulääkkeitä. Eläimille on tarjolla pehmenneitä ruokaa ja niitä nesteytetään tarvittaessa. Eläimet lopetetaan heti lopetuskriteerien täytyessä.

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Lääkeaineiden tehon testaaminen amyotrofisen lateraskleroosin (ALS) prekliinisissä tautimalleissa

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli testata uusien lääkeaineiden tehoa amyotrofisen lateraskleroosin (ALS) kokeellisissa hiirimalleissa. Tarkoituksena oli edesauttaa mahdollisen ihmiskäyttöön soveltuvan lääkeaineen löytymistä.

Käytetyt eläinmallit toimivat odotetusti ja antoivat luotettavia tuloksia lääkeaineiden tehokkuudesta. Tulokset raportoitiin tutkimusten tilaajille loppuraportin muodossa. Tuloksia on esitetty kansainvälisissä kokouksissa. Tilajaat ovat saaneet luotettavaa tietoa kehittämiensä lääkeaineiden tehosta tässä mallissa ja voivat niiden perusteella jatkaa lääkeaineiden kehitystyötä.

Todelliset haittavaikutukset: Eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (Mus musculus)	13	198	672	733

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Tutkimuksessa käytettiin 1616 hiirtä (ennakoitu määrä 2400). Käytetyt eläimet jakaantuivat seuraavasti: 1 % luokassa ei toipumista, 12 % luokassa lievä, 42 % luokassa kohtalainen ja 45 % luokassa vakava.

Käytettyjen eläinten määrä oli n. 67 % suunnitellusta käytöstä, koska tarvetta ennakoiduille kokeille ei ollut. Vakavuusluokkien osalta noin 45 % käytetyistä eläimistä kuului vakavuusluokkaan vakava.

Miten hyvin hengissä pidettyjen eläinten kohtalo tutkimuksen päättyessä vastaa ennakoitua kohtaloa?

Eläimet lopetettiin tutkimuksen päätteeksi suunnitelman mukaan kudoksenäytteiden keräämiseksi.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

Hankkeessa käytetyille malleille ei ole olemassa korvaavia vaihtoehtoja, koska lääkeaineiden tehoa, toimivuutta tai turvallisuutta ei keskushermostollisissa sairauksissa voida luotettavasti todentaa soluviljelmissä. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta ja turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä kokeita, sillä tällä hetkellä mikään in vitro- tai in silico-lähestymistapa ei pysty ennustamaan lääkeaineen tehoa ja/tai turvallisuutta. Testaukseen soveltuvia in vitro malleja ei ole olemassa.

Vähentäminen

Käytetyt eläinmallit ja menetelmät ovat koeasetelmasta riippuvia. Tilastollisilla menetelmillä on selvitetty pienimmät tarvittavat ryhmäkoot erojen havaitsemiseksi. Hankkeen tutkimukset on suoritettu mahdollisimman pienellä eläinmäärällä.

Parantaminen

Lautakunta edellytti takautuvassa arviossa mietittävän 3R-mahdollisuuksien tehokasta hyödyntämistä, varsinkin refinement-mahdollisuuksien osalta ja näiden toteuttamista eläinten kärsimyksen minimoimiseksi.

Tutkimuksissa lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 399 hiirtä ja 12 hiirtä löydettiin kuolleena. Hankkeessa käytettiin transgeenisia hiirilinjoja, joilla havaitaan progressiivisesti eteneviä halvausoireita ja painon putoamista. Eläinten kuntoa tarkkaillaan aluksi viikoittain ja eläinten ikääntyessä ja taudinkuvan edetessä tarkastuskertoja tihennetään. Hiirille on tarjolla veteen sekoitettua jauherehua ja vettä pitkäniippaisista pulloista, minkä lisäksi niille tarjotaan vettä geelin muodossa häkin pohjalle.

Hankeluvan aikana laitoksella on otettu käyttöön hyvinvoinnin pisteytystaulukko avustamaan lopetuskriteereiden määrittämistä. Tämän lisäksi hankeluvan aikana käyttöön on otettu tunneli- tai kupipikäsittely kaikissa hiirikokeissa, jolloin eläinten käsittelystä aiheutuvaa stressiä on saatu vähennettyä. Henkilöstön koulutusta on yhtenäistetty siten, että eläinten kanssa työskentelevillä henkilöillä on keskenään samanlainen tapa tulkita lopetuskriteereitä. Tällöin vältetään tarpeettomalta kärsimykseltä, kun varmistetaan lopetuskriteereiden lähestyminen toteaminen hyvissä ajoin, jolloin eläimet lopetetaan heti kriteerien täytyttyä. Luvan voimassaolon aikana tehdyt tutkimukset olivat valtaosaltaan lyhyempiä kuin lupa olisi sallinut. Hankeluvan aikana pilotoitiin mahdollisuutta asuttaa uroshiiriä ryhmähäkeissä häkkivirikkeitä lisäämällä ja alustavat tulokset olivat positiivisia.

Muuta

Toiminnanharjoittaja osallistuu aktiivisesti eläintenhyvinvointitoiminnan kehittämiseen niin laitoksen sisäisessä toiminnassa kuin osana kansainvälistä yritystä ja esittää hyvinvointityöhön liittyviä tuloksia eri tilaisuuksissa.

Toiminnanharjoittaja selvittää ilmiänsuultaan lievempioireisen C9Orf72-hiirikannan soveltuvuutta ALS:n hoitokeinojen tutkimiseen.

5. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Lääkeaineiden tehon testaaminen multippeliskleroosin (MS) prekliinisissä tautimalleissa.	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	MS-tauti, hiiri, hoito	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	MS:n hoitoon ei ole tällä hetkellä käytössä tehokkaita, sivuvaik- kutuksettomia hoitomuotoja. Prekliinisten eläinkokeiden tar- koituksena on edesauttaa mahdollisen ihmiskäyttöön soveltu- van lääkeaineen löytymistä ja sitä kautta helpottaa yksilön hy- vinvointia ja tuoda yhteiskunnallista hyötyä.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Eläinkokeet ovat välttämättömiä uusien lääkeaineiden kehitys- työssä. Mahdolliset positiiviset tulokset edesauttavat tutkitta- van lääkeaineen etenemistä lääkekehitystyössä mahdollisesti kliinisiin kokeisiin ja myöhemmin valmiiksi lääkkeeksi. Tutki- mukset tuovat merkityksellistä tietoa lääkeaineiden tehosta MS-taudin monimuotoisen oireiston hoidossa.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri 4950, rotta 2925 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu haittaa tautitilan indusoinnissa tehtävistä kä- sittelyistä, ml. kirurgiset operaatiot ja toksiinivälitteinen tautiti- lan induktio. Tautitila kehittyy eläimissä ihonalaisesti, systeemi- sesti tai kirurgisesti aivoihin annosteltujen inokulanttien seu- rauksena. Inokulaatiot, systeemiset annot ja kirurgiset toimen- piteet aiheuttavat eläimelle kohtalaista tai huomattavaa hait- taa. Käyttäytymistesteistä, lääkinnästä ja kuvantamisesta aiheu- tuu eläimille lievää tai kohtalaista haittaa. Pienelle määrälle ko- keita voidaan käyttää kirurgiaa vaativia lääkeannostelumuu- toja. Eläimet lopetetaan tutkimusten loputtua. Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		

1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	In vitro -mallien käyttömahdollisuudet ovat hyvin rajalliset joutuessa koko organismin fysiologisten ja anatomisten ulottuvuuksien puuttumisesta mallinnettaessa kutakin sairautta in vitro -olosuhteissa. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaankin tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen klinisiä kokeita. Tällä hetkellä mikään in vitro tai in silico -lähestymistapa ei voi ennustaa lääkeaineen tehoa ja/tai turvallisuutta. In vitro ja in silico -mallit tukevat ja voivat auttaa koe-eläintutkimusten suunnittelussa ja ennustamisessa.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Koeasetelmat ovat standardoituja ja niiden käytön pohjana on perusteellinen mallien validointityö. Kunkin geneettisen mallin taustalla on ihmissairautta oleellisin osin mallintava eläinmallin ilmiä, jonka tulee olla sekä perinnöllisesti relevantti että oireistoltaan/patologialtaan ihmissairautta kuvaava. Näin varmistetaan, että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ja antaa oikeanlaisen taudinkuvan. Koeasetelmissa ryhmän sisäinen variaatio minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määrittelee tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi) ja joka määrittää koe-eläinten käytön määrän kussakin koeasetelmassa. Validaatiotyön ja tilastollisen voima-analyysin perusteella voidaan luotettavasti ennustaa soveltuvat ryhmäkoot, jotka minimoivat eläinten käytön alimpaan mahdolliseen ilman että koeasetelman tilastollinen voima vaarantuu.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Suuri osa keskushermoston sairauksien eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille lääkkeille (jos on) ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Alemmilla selkärankaisilla tai <i>in vitro</i> -menetelmin ei voida saada samanlaista tietoa uusien lääkeaineiden tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole riittävästi tutkittuja, eivätkä yleisesti hyväksytyjä ja käytettyjä. Tämän lisäksi näistä menetelmistä ei ole saatavissa tietoa tällä hetkellä käytettyjen lääkeaineiden vasteista, joita voitaisiin käyttää verrattaessa uusista lääkeaineista saatavia tuloksia. Eläimille suoritetaan vain tutkimuksen kannalta välttämättömät toimenpiteet. Tarvittaessa eläimiä hoidetaan tukitoimin, kuten antamalla pehmennettyä rehua ja/tai nesteyttämällä ja/tai kipulääkkein, silloin kun koeasetelma sen sallii. Kirurgisten toimenpiteiden yhteydessä eläimille annostellaan kipulääkkeitä. Eläimille on tarjolla pehmennettyä ruokaa ja niitä nesteytetään tarvittaessa. Eläimet lopetetaan heti lopetuskriteerien täytyttyä.

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Lääkeaineiden tehon testaaminen multippleiskleroosin (MS) prekliinisissä tautimalleissa.

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli testata uusien lääkeaineiden tehoa MS-taudin hoidossa prekliinissä (kliinisiä kokeita edeltävissä) hiirimalleissa. Tutkimusmalleilla pyrittiin myös lisäämään MS-taudin mekanismien ja vaikutusten ymmärrystä uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämiseksi. Käytetyt eläinmallit toimivat odotetusti ja antoivat luotettavia tuloksia lääkeaineiden tehokkuudesta. Osasta testatuista lääkeaineista saatiin positiivisia tuloksia. Osa lääkeaineista on edennyt kliinisiin kokeisiin.

Todelliset haittavaikutukset: Eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (<i>Mus musculus</i>) [A1]	47	440	594	524
Rotat (<i>Rattus norvegicus</i>) [A2]	9	130	606	17

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Tutkimuksissa käytettiin 1617 hiirtä (ennakoitu määrä 4950) ja 762 rottaa (ennakoitu määrä 2925). Käytetyt eläimet jakaantuivat seuraavasti: 4 % hiiristä ja 1 % rotista luokassa ei toipumista, 27 % hiiristä ja 17 % rotista luokassa lievä, 37 % hiiristä ja 80 % rotista luokassa kohtalainen ja 33 % hiiristä ja 2 % rotista luokassa vakava.

Käytettyjen eläinten määrä oli n. 30 % suunnitellusta käytöstä, koska tarvetta ennakoiduille kokeille ei ollut. Vakavuusluokkien osalta noin 23 % käytetyistä eläimistä kuului vakavuusluokkaan vakava. Osahankkeittain vakavaa haittaa aiheutui seuraavasti: Osahanke 1 (MBP/MOG/PLP-indusoitu MS): 387/973 (40 %), Osahanke 2 (LPC-malli): 1/699 (0,1 %), Osahanke 3 (Cuprizone-malli): 155/647 (24 %). Osahankkeessa 4 (Kehityksellinen demyelinaatio-malli) käytettiin 60 rottaa, jotka kaikki kuuluivat luokkaan lievä.

Miten hyvin hengissä pidettyjen eläinten kohtalo tutkimuksen päättyessä vastaa ennakoitua kohtaloa?

Eläimet lopetettiin tutkimuksen päätteeksi suunnitelman mukaan.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

Hankkeessa käytetyille malleille ei ole olemassa korvaavia vaihtoehtoja. In vitro -mallien käyttömahdollisuudet ovat hyvin rajalliset johtuen koko organismin fysiologisten ja anatomisten ulottuvuuksien puuttumisesta, kun kutakin sairautta mallinnetaan in vitro -olosuhteissa. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä kokeita. Tällä hetkellä mikään in vitro tai in silico -lähestymistapa ei voi enustaa lääkeaineen tehoa ja/tai turvallisuutta.

Vähentäminen

Käytetyt eläinmallit ja menetelmät ovat koeasetelmasta riippuvia. Tilastollisilla menetelmillä on selvitetty pienimmät tarvittavat ryhmäkoot erojen havaitsemiseksi. Hankkeen tutkimukset on suoritettu mahdollisimman pienellä eläinmäärällä. Osahankkeen 2 (LPC-malli) kohdalla tarvittavaa eläinmäärä voisi olla mahdollista edelleen pienentää kehittämällä mallin indusoimiseen käytettyä kirurgista antotekniikkaa.

Parantaminen

Lautakunta edellytti takautuvassa arvioinnissa annetavan selvitys siitä, kuinka moni eläin koki vakavaa haittaa, kuinka moni lopetettiin lopetuskriteerien perusteella ja mitä refinementtia hyödynnettiin tutkimuksen kuluessa.

Osahankkeessa 1 lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 67 hiirtä ja 10 rottaa, kuolleena löydettiin 1 hiiri. Osahankkeessa 2 lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 2 rottaa. Osahankkeessa 3 lopetettiin 35 hiirtä ja kuolleena löydettiin 12 hiirtä. Osahankkeessa 4 kaikki rotat lukeutuivat luokkaan lievä, eikä kuolleena löydetty tai lopetusta vaatinut yksikään eläin.

Hankeluvan aikana laitoksella on otettu käyttöön hyvinvoinninpisteytystaulukko avustamaan lopetuskriteereitä määritettäessä. Henkilöstön koulutusta on yhtenäistetty siten, että eläinten kanssa työskentelevillä henkilöillä on yhtenäisempi tulkinta lopetuskriteereistä. Tämän lisäksi hankeluvan aikana käyttöön on otettu tunneli- tai kuppikäsittely kaikissa hiirikokeissa, jolloin eläinten käsitte-lystä aiheutuvaa stressiä on saatu vähennettyä.

Eläinten kuntoa tarkkaillaan vähintään kahdesti päivässä. Eläimille on tarvittaessa tarjolla pehmen- nettyä rehua ja vettä pitkänippaisista pulloista. Eläinten painoa verrataan kokeen aikaiseen maksi- mipainoon. Osahankkeissa 1-3, kun paino tippuu >20 % maksimipainosta, eläintä seurataan 24 tunnin ajan ja mikäli paino ei ole tänä aikana noussut, eläin lopetetaan. Osahankkeessa 4 pentujen kasvun pysähtyminen tai painon lasku 48 tunnin tarkastelujakson aikana johtavat pennun lopetta- miseen. Muita lopetuskriteerejä olivat: eläin ei pysty kääntymään 5 sekunnin aikana, kun sen laite- taan kyljelleen. Osahankkeessa 1 lopetuskriteerinä ovat myös pitkälle edenneet halvaantumisoi- reet (taso 4), tasapainohäiriöt ja ihovauriot, jotka eivät parane hoidosta huolimatta. Lopetuskritee- rejä on hankala kiristää entisestään vaarantamatta tulosten luotettavuutta.

Osahankkeessa 1 mallin indusointiin käytettävien reagenssien pitoisuutta vähennettiin, jolloin va- kavien iho-oireiden määrä saatiin laskemaan. Lisäksi osahankkeessa 1 hiirten avustettua virtsaa- mista tihennettiin 2 kertaa päivässä, aiemman 1 pissatuskerran sijaan. Osahankkeessa 3 lisättiin eläinten kunnon tarkkailua ja tukihoitoa kehitettiin tehokkaammaksi. Lisäksi mallin indusoinnin akuutissa vaiheessa osalle hiiristä jätettiin annostelematta 1–2 annosta cupritsonea, jolloin paino alkoi nousta ja lopetuskriteerit täyttävää painonpudotusprosenttia ei saavutettu.

Muuta

Toiminnanharjoittaja osallistuu aktiivisesti eläintenhyvinvointitoiminnan kehittämiseen niin laitok- sen sisäisessä toiminnassa kuin osana kansainvälistä yritystä ja esittää hyvinvointityöhön liittyviä tuloksia eri tilaisuuksissa.

6. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Keskushermoston suojaus sydän- ja aorttakirurgiassa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Sydän, keskushermosto, sydänkirurgia, suojaus, sydänkeuhko- kone	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei

	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Vaikeiden synnynnäisten sydänvikojen, aortan kaaren sekä las- kevan aortan korjauksissa joudutaan joskus pysäyttämään tai heikentämään aivojen tai selkäytimen verenkiertoa. Tähän liit- tyy huomattavien neurologisten komplikaatioiden vaara. Laske- malla keskushermoston lämpötilaa voidaan aineenvaihduntaa ja hapenkulutusta voidaan vähentää. Usein monimutkaiset aor- tan kaaren korjausleikkaukset vaativat kuitenkin pidemmän ajan mihin pelkkä lämpötilan lasku antaisi suojan, joten tutki- muksillamme pyrimme löytämään keinoja pidentää hypotermi- sen verenkierron pysäytyksen turvallista aikaa. Olemme laajen- taneet tutkimuksiamme niin, että pyrimme tutkimaan ja löytä- mään keinoja myös selkäytimen ja sydämen suojaukseen. Las- kevan rinta-aortan ja vatsa-aortan korjausleikkauksien pelätyin komplikaatio on alaraajojen halvaantuminen. Tutkimustemme tavoitteena on kehittää aivojen, selkäytimen ja sydämen suojaamiseen käytettäviä uusia menetelmiä, joilla voi- daan vähentää vaativaan sydänkirurgiaan liittyviä komplikaati- oita. Lisäksi tutkimme iskemia-reperfuusioaurion mekanismeja ja pyrimme lieventämään siitä aiheutuvia haittoja. Iskemia-re- perfuusioauriolla tarkoitetaan niitä haitallisia solutason tapah- tumia, jotka syntyvät verenkierron palautuksen jälkeen ja pa- hentavat jo verenkierron- tai hapenpuutteen jo aiheuttamaa so- luvauriota. Iskemia-reperfuusioaurio aiheuttaa merkittäviä ku- dos- ja soluvaurioita verenkierron palautumisen jälkeen.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tutkimustuloksemme ovat siirrettävissä helposti ihmistutki- muksiin ja sitä kautta käytäntöön potilaiden hoidossa. Paremmat keskushermoston suojausmenetelmät vähentävät operaatioihin joutuvien potilaiden neurologisia komplikaatioita, inhimillistä kärsimystä ja hoitokustannuksia.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Sika, 315 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu haittaa sydämeen kohdistuvasta kirurgisesta toimenpiteestä ja siitä seuraavista motorisista häiriöistä. Por- saat lopetetaan toimenpiteen ja/tai seurannan jälkeen. Vakavuusluokat: vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Tutkimuksessa ei voida hyödyntää eläinkokeettomia menetelmiä, johtuen tutkimusmallin monimutkaisuudesta. Porsasmalli on sekä verenkiertoelimistön fysiologialta että anatomialta hyvin samankaltainen ihmisen kanssa. Tämä mahdollistaa tutkimustulosten siirrettävyyden kliinisiin tutki- muksiin ja käytäntöön.	

2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Aikaisempien tutkimustemme perusteella olemme laskeneet (power analysis) tarvittavien koe-eläinten määrät kussakin koesarjassa tilastotieteen menetelmin. Suunnittelemme ja toteutamme sarjat vähäisimmällä määrällä eläimiä, millä on vielä mahdollista saada tilastollista merkitsevyyttä ja voimaa tuloksiin.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Porsaan verenkiertoelimistön anatomia ja fysiologia ovat hyvin lähellä ihmisen vastaavia. Eläinmalli on paras, koska tulokset ovat helposti sovellettavissa käytännön potilashoitoon. Käyttämässämme koe-eläinmallissa pyrimme huomioimaan kaikin mahdollisin tavoin eläimen hyvinvoinnin. Esilääke annetaan jatkoletkun ja neulan avulla porsaan niskaan eläimen ollessa vapaana karsinassa. Pitkä jatkoletku mahdollistaa sen, että porsas saa liikkuu vapaasti injektion aikana. Tällöin injektio voidaan myös antaa hitaammin, mikä vähentää yksittäisen lihakseen annosteltavan injektion kivuliaisuutta. Yleisanestesiassa eläimiä hoidetaan kuten ihmispotilaita ja leikkauksen jälkeinen kipulääkitys on riittävää ja runsasta hyvien hoitokäytäntöjen mukaisesti. Eläimen heräämisen jälkeen toipumista heräämössä seuraa läpi yön aina tutkija. Porsas siirretään omaan karsinaan vasta kun se on kunnolla herännyt. Tarvittaessa käytetään ylimääräistä lämpölähdettä. Porsaiden alla pidetään pehmustetta makuuvammojen välttämiseksi. Tutkijat tarkastavat eläimen tilanteen joka päivä koe-eläinkeskuksen eläintenhoitajien ohella ja mahdollisiin ongelmiin puututaan välittömästi. Kipulääkityksestä huolehditaan koko seurantaajan ajan. Sioille tehdään joka päivä myös postoperatiivisen tilan arviointi ja pisteytys. Koe-eläinlaitoksen eläinlääkäri seuraa eläinten hyvinvointia ja on käytettävissä aina tarvittaessa.

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Keskushermoston suojaus sydän- ja aorttakirurgisissa toimenpiteissä

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteet saavutettiin lopulta varsin hyvin, vaikka alkuperäisessä hankeluvassa olleita osahankkeita 1 ja 2 ei lopulta käytettykään vaan näiden tilalle kehitettiin osahankkeet 4 ja 5, joista on tehty erilliset muutospäätökset. Osahankkeen 3 tavoitteena oli selvittää pitkän hypotermisen selektiivisen aivoperfuusion vaikutuksia selkäytimen suojaukseen sikamallilla. Tutkimuksen avulla saime demonstroitua turvarajoja tälle toimenpiteelle, joita voidaan hyödyntää myös ihmisillä. Osahanke 4 aloitettiin kokeellisella sikamallilla, mutta sikojen kasvuvauhti seurannassa osoitti sydänläppäoperaation jälkiseurannan mahdottomaksi, joten reagoimme asiaan nopeasti ja vaihdoinme muutospäätöksellä lajin lampaaksi. Tällä muutoksella osahankkeen tavoitteisiin päästiin huomattavasti paremmin ja totesimme sydänläppäoperaation ja uuden menetelmän alustavasti toimivaksi. Osahankkeessa 5 tutkittiin aortan väliaikaista sulkua traumaattisessa verenvuototilanteessa sikamallilla. Saavutimme hankkeen tavoitteet saamalla tärkeää tietoa verenkierröllisistä muutoksista eri elimissä. Kaikki hankkeen tutkimukset on joko julkaistu tai julkaisuvaiheessa.

Todelliset haittavaikutukset: Eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Siat (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	30	0	28	44
Lampaat (<i>Ovis aries</i>)	7	0	48	0

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Käytettyjen eläinten kokonaismäärä 157 jäi lopulta huomattavasti alhaisemmaksi kuin mitä luvalla eläimiä oli. Tämä johtui tutkimuksen osahankkeiden muutoksista sekä tutkimusryhmän kokoonpanon sekä käytettävissä olevien leikkausmäärien ja resurssien muutoksista. Osin muutos johtuu myös siitä, että toimintaa on saatu parannettua ja epäonnistuneita kokeita oli vähemmän ja lopulta myös tutkimuksen tavoitteisiin pääseminen ei vaatinut niin montaa eläintä, kun alun perin ajateltiin. Haittojen todellinen vakavuus piti varsin hyvin paikkaansa. Osahankkeessa 5 eläimiä ei herätetty lainkaan operaation jälkeen vaan lopetus tapahtui nukutuksen aikana, joten haittaluokka jäi suunniteltua (vakava) vähäisemmäksi. Osahankkeessa 4 kohtalainen haitta piti paikkansa ja samoin osahankkeessa 3 vakava haittaluokka koski käytännössä kaikkia eläimiä.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:**Korvaaminen**

Tästä hankkeesta saatavien tietojen perusteella ei olla pystytty kehittämään uusia toimintatapoja, joilla voidaan korvata eläinten käyttö. Varsinkin sydänlappäätutkimus on vahvistanut näkemystä siitä, että suurten koe-eläinten käyttäminen tällaisissa tutkimuksissa on ensiarvoisen tärkeää ennen siirtymistä ihmistutkimuksiin.

Vähentäminen

Hankkeessa käytettiin tilastollisia keinoja merkitsevän tuloksen saamiseen tarvittavista eläinmääristä. Tätä on käytetty myös aiemmin.

Parantaminen

Hankkeessa parantaminen toteutui sillä, että vaihdoimme koe-eläinlajin siasta lampaaksi huomattavamme sian huonon soveltuvuuden pitkäaikaisseurantaan. Huomasimme myös, että kipulääkkeen imeytyminen vaihteli huomattavasti eläinten välillä ja annos oli välillä liikaa ja välillä liian vähän, joten vaihdoimme kipulääkityksen pistettävään muotoon, jolloin kipulääkityksen vaikutus parani ja haittavaikutukset vähenivät.

Muuta

Pyrimme tuomaan asiat julkaisuissamme esille sekä kertomaan löydöksistä muille vastaaville tutkimusryhmille.

7. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ

Hankkeen nimi	Sydäninfarktin ja sydämen vajaatoiminnan molekyylilikuvantaminen
Hankeluvan kesto	3 vuotta
Avainsanat (enintään 5)	Sydäninfarkti, sydämen vajaatoiminta, molekyylilikuvantaminen,

	lääkekehitys		
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä	Ei
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Kyllä	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Kyllä	Ei
	Lajien säilyttäminen	Kyllä	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-opetus	Kyllä	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Kyllä	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tieteellinen tieto jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Sydäninfarktin jälkeinen infarktiarven puutteellinen paraneminen ja sydänlihaksen uudelleenmuovautuminen ovat yleisimmät syyt sydämen pumppauskyvyn heikkenemiseen ja etenevään sydämen vajaatoimintaan. Nykyisin käytössä olevat menetelmät toteavat sydämen vajaatoiminnan vasta myöhäisessä vaiheessa. PET-kuvantaminen on elävässä elimistössä tehtävää molekyylikuvantamista, joka perustuu radioaktiivisten merkkiaineiden käyttöön ja jonka avulla saadaan hyvin tarkkaa tietoa elimistön toiminnoista ja toiminnan muutoksista. Uusien spesifisten kuvantamismerkkiaineiden avulla voitaisiin olla mahdollista havaita muutoksia sydämen toiminnassa jo varhaisessa vaiheessa. Hankkeen tavoitteena onkin kehittää uusia, kajoamattomia kuvantamismenetelmiä ja merkkiaineita sydänlihasvaurion paranemisen ja sydänlihaksen uudelleenmuovautumisen solutason mekanismien mittaamiseen mm. PET-kuvantamisen avulla. Tutkimuksessa rotille aiheutetaan kirurgisesti sydänlihasvaurio sitomalla vasen sepelvaltimohaara umpeen. Sydäninfarktin paranemisprosessia tutkitaan mm. erilaisten kuvantamismenetelmien avulla.		
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	Molekyylikuvantamisen avulla voi olla mahdollista todeta uhkaava sydämen vajaatoiminta jo varhaisessa vaiheessa ja estää sen kehittyminen kohdentamalla tehokas hoito aiheuttajamekanismiin. PET-kuvantamismenetelmän etuna on se, että uusia merkkiaineita voidaan viipymättä testata ihmisillä, mikäli ne osoittautuvat toimiviksi kokeellisessa mallissa.		
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Rotta 500 eläintä		
Ennakoidut haitat eläimille, arvioitavat vakavuusluokat, eläinten kohdalla toimenpiteen päätyttyä	Rotille aiheutuu haittaa sepelvaltimon haaran sulkemisesta ja sitä seuraavasta sydämen vajaatoiminnasta. Haittaa aiheutuu myös kuvantamisesta ja verinäytteiden otosta sekä mahdollisesta lääkehoidosta. Eläimet lopetetaan viimeistään 12 viikkoa kirurgisen operaation jälkeen. Vakavuusluokat: vakava		
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs			
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Sydäninfarktin paraneminen, vasemman kammion uudelleenmuovautuminen ja sydämen vajaatoiminnan kehittyminen on monimutkainen ja pitkäaikainen prosessi, eikä sitä ole mahdollista mallintaa pelkästään koeputkiolosuhteissa. <i>In vivo</i> – kuvantaminen tapahtuu elävässä elimistössä ja lisäksi uudet		

	PET- merkkiaineet luokitellaan lääkeaineiksi, jotka on ennen potilaskäyttöä testattava eläimillä.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Eläinmäärän arvioinnissa käytämme hyväksi pitkää kokemustamme kuvantamistutkimusten suunnittelusta ja kyseisen eläinmallin käytöstä. <i>In vivo</i> -kuvantamisen etuna on se, että sama eläin voidaan kuvantaa useassa eri aikapisteessä esim. eri paranemisvaiheissa sydäninfarktin jälkeen tai lääkehoidon aikana. Sama eläin voidaan myös kuvantaa usealla eri merkkiaineella. Kuvantamismenetelmien käyttö vähentääkin huomattavasti hankkeeseen tarvittavien eläinten määrää verrattuna tavanomaisiin tutkimusmenetelmiin. Lisäksi kuvantamistutkimuksia ennen ja niiden rinnalla käytetään mm. solukoikeita ja kokeita kudosleikkeillä, mikä myös vähentää tarvittavien eläinten määrää.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Hankkeessa käytettävä rotan infarktimalli on hyvin kuvattu, paljon käytetty ja yleisesti hyväksytty sydäninfarktin paranemisen, vasemman kammion uudelleenmuovautumisen ja sydämen vajaatoiminnan malli, jonka käytöstä ryhmällämme on paljon kokemusta. Rotta soveltuu kokonsa ja nopean metaboliansa puolesta hyvin kuvantamistutkimuksiin ja malli vastaa patofysiologialtaan hyvin ihmisen vastaavaa tilannetta. Leikkausta suoritettaessa eläimet ovat syvässä anestesiassa ja kipulääkittyinä. Leikkauksessa käytetään aseptista ja mahdollisimman vähän traumaa aiheuttavaa tekniikkaa. Toipumisajana eläimiä seurataan tiiviisti ja niille annostellaan vahvaa kipulääkettä. Kuvantaminen tapahtuu kevyessä yleisanestesiassa ja lopulta eläimet lopetetaan terminaalianestesiassa.

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Suunnitelman mukaiset tavoitteet on saavutettu hyvin. Olemme saaneet lupaavia tuloksia sydäninfarktin jälkeisen immuunivasteen PET kuvantamisesta 3 uudella merkkiaineella (makrofagien CD206 reseptoriin, makrofagien folaatti reseptori beetaan ja fibroblastien aktivaatioproteiiniin sitoutuvat merkkiaineet). Näiden tutkimusten tuloksia on julkaistu kokousabstrakteina ja tutkimusraportit tul-laan lähettämään arvioitavaksi kansainvälisiin, vertaisarvioituihin lehtiin lähiaikoina. Tutkimukset ovat myös osa kolmen väitöskirjatutkijan opinnäytetyötä. Folaattireseptoriin sitoutuvan merkkiaineen tutkimus on edennyt siten, että sen GMP-tasoista synteesiä valmistellaan potilastutkimuksiin siirtymistä varten (käyttöaiheena mm. sydämen vajaatoiminnan kuvantaminen).

Todelliset haittavaikutukset:

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Rotat (<i>Rattus norvegicus</i>)	132	41	0	324

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Käytettyjen eläinten määrä ja haittojen vakavuus vastaavat odotettua. Käytettyjen eläinten lukumäärä on kokonaisuudessaan 497, josta 324 luokitellaan vakavaksi sisältäen joko sepelvaltimon sulkuleikkauksen tai sham-leikkauksen (71 kpl), jossa rintakehä avataan sulkematta sepelvaltimoa. Kokonaisuudessaan sepelvaltimon sulkuleikkaukseen liittyvä kuolleisuus on ollut jossain määrin odotettua korkeampi (48%), mutta se vastaa kirjallisuudessa kuvattua (30 - 60%). Sham-leikkaukseen liittyvä kuolleisuus on ollut kokonaisuudessaan 24%.

Odotetun mukaisesti kokeeseen liittyvä kuolleisuus tapahtuu lähes yksinomaan leikkausanestesian aikana (64% kuolleisuudesta) sekä sitä seuraavan vuorokauden aikana (31% kuolleisuudesta), jolloin eläimet ovat kipulääkittyjä ja niiden vointia seurataan tarkasti. Tätä myöhäisempi kuolleisuus on harvinaista (4% kuolleisuudesta) eikä eläinten hyvinvoinnissa ole havaittu myöhäisvaiheessa merkittäviä ongelmia.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

Tutkimuskysymyksestä johtuen (kuvantamistekniikoiden kehittäminen sydämen toiminnan muutosten havaitsemiseksi varhaisessa vaiheessa) korvaavia menetelmiä ei ole mahdollista käyttää.

Vähentäminen

Hankkeessa tutkittiin *in vivo* -kuvantamista, joka sinänsä mahdollistaa eläimen toistuvan seurannan ja täten tarvittavien eläinten määrän vähentämisen. Hankkeen tulosten perusteella kaikilla tutkituilla merkkiaineilla kuvantamisella mitattu merkkiaineen kertymä vastasi hyvin kudoksenäytteessä mitattua, joten mahdolliset tulevat tutkimukset (esimerkiksi hoidon vaikutusten arviointi) voidaan suunnitella tehtäväksi pääasiassa kuvantamisen avulla (ja täten pienemmällä eläinmäärällä kuin olisi mahdollista ilman kuvantamista).

Parantaminen

Hankkeen alkuvaiheessa optimoimme leikkauksessa käytettävää anestesiaa ja kipulääkitystä yhdessä koe-eläinkeskuksen henkilökunnan kanssa (ennen leikkausta buprenorfiinia 0.03-0.05 mg/kg, midazolaamia 1 mg/kg ja leikkausalueelle lidokaiinia 7 mg/kg; nämä kaikki nahan alle. Leikkauksen aikana vatsaonteloon ketamiinia max 45 mg/kg ja medetomidiniä max 0.25 mg/kg. Anestesian kumoamiseen atipamezolia ja tarvittaessa dopramia. Leikkauksen jälkeen buprenorfiinia 0.03-0.05 mg/kg nahan alle kolmasti vrk:ssa 3 vrk:n ajan. Havaintojemme mukaan voimakas anestesia ja kipulääkitys myötävaikutti leikkauskuolleisuuteen (21% kuolleisuudesta tapahtui ennen rintakehän avaamista), mutta toisaalta lääkitystä ei koettu mahdolliseksi vähentää eläimen hyvinvoinnin varmistamiseksi. Hankkeen jälkipuoliskolla kuolleisuus väheni erityisesti sham-leikkauksessa (kuolleisuus sepelvaltimon sulkuleikkaukseen 44% ja sham-leikkaukseen 0%), mihin lienee vaikuttanut lauatunnan suosituksen mukaisesti käyttöön otettu karprofeeni-lääkitys (5 mg/kg nahan alle) ja kokemus toimenpiteen suorittamisessa. Karprofeeni otettiin käyttöön, kun tulosten perusteella voitiin todeta, että se ei olennaisesti vaikuta tutkimuskohteena olevaan sydäninfarktin jälkeiseen immuunivasteeseen.

Yhteenvedona hankkeen aikana optimoitiin leikkauksen aikaista kipu- ja anestesia-lääkitystä ja otettiin käyttöön karprofeeni kivunlievitykseen. Hankkeen aikana vähentynyt kuolleisuus sham-leikkaukseen kertoo toimien onnistumisesta, mutta sepelvaltimon sulkuun sinänsä liittyy edelleen sekä oman kokemuksemme että kirjallisuuden perusteella suuri kuolleisuus. Käytetylle mallille ei ole löydetty vastaavaa, hyvää vaihtoehtoa. Jatkossa selvitämme mahdollisuutta vähentää kuolleisuutta pienentämällä infarktivaurion kokoa sulkemalla sepelvaltimo distaalisemmin.

Muuta

Hankkeen tulokset, mukaan lukien leikkauksessa käytetyt menetelmät, julkaistaan kansainvälisissä julkaisusarjoissa.

8. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Lääkeaineiden tehon prekliininen tutkiminen Dahl-SS-rottakan- nassa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Aivohalvaus, prekliininen lääketutkimus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolli- set tarpeet)	Tässä hankkeessa tavoitteena on testata uusien lääkeaineiden ja hoitomuotojen tehoa luotettavasti vakiintuneissa eläinmalleissa, jotta jatkokehittämiseen pystytään valitsemaan toimivat ja tehok- kaat ehdokkaat. Tutkimus edesauttaa tehokkaimpien ja lupaa- vimpien lääkeaineiden ja hoitojen nopeaa etenemistä kliinisiin kokeisiin ja sitä kautta kyseisistä vaurioista/sairauksista kärsivien ihmisten käyttöön.	
Hankkeesta saatava mahdolli- nen hyöty (kuinka tiede edis- tyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tu- loksista)	Aivohalvaus on maailmanlaajuisesti johtavia kuolinsyitä ja myös suurimpia syitä vaikeasti ja pitkäaikaisesti vammautumisiin erityi- sesti nuorilla ja työikäisillä ihmisillä. Toimivat ja/tai oireita helpot- tavat lääkkeet aivohalvauksen hoitoon hyödyttäisivät ihmisiä mm. kansantaloudellisella, sosiaalisella ja psykologisella tasolla alkaen esim. yksittäisen ihmisen huomattavasta elämänlaadun parantumisesta aina maailmanlaajuisiin sosioekonomisiin hyötyi- hin.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Rotta, 120 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, ar- viodut vakavuusluokat, eläin- ten kohtalo toimenpiteen pää- tyttyä	Eläimille aiheutuu haittaa ikääntymisen aikana kehittyvistä aivo- halvausoireista ja LPS-annostelun aiheuttamista aivohalvausoi- reista. Lievää haittaa aiheutuu myös verinäytteenotoista, käyttäy- tymistesteistä ja kuvantamismittauksista. Eläimet lopetetaan tut- kimuksen lopussa 18 viikon iässä tai lopetuskriteerien täyttyessä. Vakavuusluokat: vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi kor- vaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Testattavan lääkeaihion edulliset vaikutukset on yleensä testattu korvaavin menetelmin ennen prekliinistä vaihetta. Toisaalta en- nen kuin vaikutuksia voidaan testata ihmiselimistössä, lää- keaihion teho sekä mahdollisesti turvallisuus ja spesifisyys on to- dettava selkärangaisessa nisäkäselimistössä. Tutkimuksessa käy- tettävät sairaus-/vauriomallit ovat kudosspesifisiä ja esiintyvät	

	ihmisellä hyvin pitkälle erilaistuneissa soluissa, jotka puolestaan kuuluvat suurempiin solu- ja kudostekonaisuuksiin.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Eläinryhmille määritetään oikeanlaiset koot tilastotieteellisin menetelmin. Riittävän kokoiset ryhmät ja riittävän pitkät seurantaajat vähentävät myös saman koeasetelman toistamista uudelleen. Ennen minkään eläinmallin ottamista tutkimuskäyttöön se validoidaan ja pilotoidaan.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Suurin osa aivojen verenkiertohäiriöiden eläinmalleista on kehitetty hiirissä ja rotissa. Jyrsijöiden fysiologia soveltuu kyseisiin malleihin. Jyrsijöiden käyttö on lisäksi yleisesti hyväksytty sairaus/vauriomalleihin kohdistuvissa prekliinisissä kokeissa. b) Käytettävät prekliiniset tautimallit ovat laajasti hyväksyttyjä ja käytettyjä toistettavuutensa, ennustettavuutensa ja kattavan kertyneen tausta-aineiston vuoksi. Eläinmallit on valittu siten että ne olisivat mahdollisimman informatiivisia ja toistettavia toteutuksen ja tulosten kannalta. c) Tutkimusmallille tyypilliset hyvinvointiin vaikuttavat tekijät on selvitetty ja huomioitu validaatiokokein sekä tutkimusmallikohtaisin lopetuskriteerein. Lopetuskriteereissä on tarkoin määritelty malleille tyypillisten oireiden päätepiste. Eläimille tehtävät tutkimukselliset toimenpiteet, kuten näytteenotto tai käyttäytymistestit suoritetaan mahdollisimman vähän stressiä aiheuttavilla menetelmillä käyttäen. Eläimet esimerkiksi totutetaan uuteen ympäristöön tai laitteistoon ja niitä käsitellään ennen kokeen alkua.

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Lääkeaineiden tehon prekliininen tutkiminen Dahl-SS-rottakannassa

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kliinisiin kokeisiin tähtäävien lääkeaineiden/terapiamuotojen luotettava testaaminen ja tehokkaiden hoitojen seulominen aivojen ja perifeeristen kudosten verenkiertohäiriöiden ja keskushermostoon kohdistuvien (aivot ja selkäydin) traumavaurioiden hoitoon ja parantamiseen käyttäen suolaherkkää Dahl SS (SS, salt sensitive) rottakantaa. Kyseiselle kannalle kehittyy korkea verenpaine ja sydän- ja verisuoniperäisiä sairauksia muutaman viikon kuluttua suolapitoisen dieetin aloittamisen jälkeen. Hankkeessa rotille syötettiin sekä lievästi suolapitoista rehua (suolapitoisuus 0.4 %) että keskisuolaista rehua (suolapitoisuus 4 %). Toisessa osahankkeessa rotille annosteltiin lipopolysakkaridia (LPS) aivohalvauksioireiden aiheuttamiseksi. Seuraavaksi eläimillä tutkittiin testattavien lääkeaineiden tehoa.

Hankkeessa käytetyt eläinmallit toimivat odotetusti ja antoivat luotettavaa tietoa lääkeaineiden tehokkuudesta. Tulosten perusteella tutkitut lääkeaineet eivät osoittaneet riittävää tehokkuutta edetäkseen seuraaviin tutkimusvaiheisiin.

Todelliset haittavaikutukset: Eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Rotat (<i>Rattus norvegicus</i>)	0	83	0	30

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Tutkimuksessa käytettiin 118 rottaa (ennakoitu määrä muutoslupan jälkeen 220). Käytetyt eläimet jakaantuivat seuraavasti: 0 % luokassa ei toipumista, 75 % luokassa lievä, 0 % luokassa kohtalainen ja 25 % luokassa vakava.

Käytettyjen eläinten määrä oli n. 54 % suunnitellusta käytöstä. Osahankkeittain vakavaa haittaa aiheutui seuraavasti: Osahanke 1 (suolarehulla ruokinta) 2/88 (2 %), Osahanke 2 (LPS indusoitu malli) 28/30 (93 %).

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

Hankkeessa käytetyille malleille ei ole olemassa korvaavia vaihtoehtoja. Alkuvaiheen turvallisuustestien jälkeen aivojen verenkiertohäiriöihin liittyvissä lääketutkimuksissa korvaavia malleja ei enää voida juuri käyttää, sillä kyseiset sairaus- ja vauriotilat liittyvät suuremman kokonaisuuden - keskushermoston ja verenkiertoelimistön - toimintaan. Hermosto ja verenkiertoelimistö toimivat vuorovaikutuksessa toisiinsa ja muuhun elimistöön, kokonaisuutena, joka poikkeaa hyvinkin paljon osiensa summasta. Hankkeessa tutkitut sairaus/vauriomallit ovat kudosspesifisiä ja esiintyvät ihmisellä hyvin pitkälle erilaistuneissa soluissa, jotka puolestaan kuuluvat suurempiin solu- ja kudospokonaisuuksiin. Tämän vuoksi uusien lääkeaineiden todellista tehoa ja turvallisuutta voidaan ennen kliinisiä kokeita tutkia tehokkaasti vain koe-eläinmalleissa.

Vähentäminen

Käytetyt eläinmallit ja menetelmät ovat koeasetelmasta riippuvia. Tilastollisilla menetelmillä on selvitetty pienimmät tarvittavat ryhmäkoot erojen havaitsemiseksi. Hankkeen tutkimukset on suoritettu mahdollisimman pienellä eläinmäärällä.

Parantaminen

Lautakunta edellytti takautuvassa arvioinnissa kerrottavan, kuinka moni eläin lopetettiin lopetuskriteerien perusteella, sekä millaisia eläinten hyvinvointia parantavia keinoja (esim. tukihoito) hankkeen aikana löydettiin.

Osahankkeessa 1(lääkeaineiden tehon tutkiminen Dahl-SS-rotissa) lopetettiin lopetuskriteerien perusteella 2 rottaa. Osahankkeessa 2 (lääkeaineiden tehon tutkiminen LPS-käsitellyissä Dahl-SS-rotissa) lopetettiin lopetuskriteerien perusteella 1 rotta ja kuolleena löydettiin 8 rottaa.

Hankeluvan aikana laitoksella on otettu käyttöön hyvinvoinninpisteytystaulukko avustamaan lopetuskriteereitä määritettäessä. Henkilöstön koulutusta on yhtenäistetty siten, että eläinten kanssa työskentelevillä henkilöillä on yhtenäisempi tulkinta lopetuskriteereistä. Eläinten annetaan tottua laitoksen tiloihin vähintään viikon verran ennen rehuruokinnan aloittamista, jolloin aloitetaan myös eläinten käsittely matalan stressitason saavuttamiseksi. Eläinten kuntoa tarkkaillaan kaksi kertaa päivässä mahdollisten halvausoireiden havaitsemiseksi. Tarvittaessa niille tarjotaan häkin pohjalle pehmennettyä rehua ja juomapulloihin vaihdetaan pitkät juomanipat. Viime vuonna tehtyyn kokeeseen haettiin muutoslupa, joka salli eläinten tarkkailun kerran päivässä halvausoireiden toteamiseen saakka, mikä osoittautui riittäväksi tiheydeksi oireiden havaitsemiseen. Kyseisessä kokeessa halvausoireita havaittiin yhdellä eläimellä (1/50).

Muuta

Toiminnanharjoittaja osallistuu aktiivisesti eläinten hyvinvoinnin kehittämistoimintaan niin laitoksen sisäisessä toiminnassa kuin osana kansainvälistä yritystä ja esittää hyvinvointityöhön liittyviä tuloksia eri tilaisuuksissa.

9. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ			
Hankkeen nimi	Veri- ja imusuonten rooli MS-taudissa		
Hankeluvan kesto	3 vuotta		
Avainsanat (enintään 5)	EAE-malli, MS-tauti, verisuonisto, imusuonisto		
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä	Ei
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Kyllä	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Kyllä	Ei
	Lajien säilyttäminen	Kyllä	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-opetus	Kyllä	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Kyllä	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tieteellinen tieto jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Imusuoniston on havaittu viimeaikaisissa tutkimuksissa ulottuvan aivokalvoille saakka. Näiden suonien merkitys MS-taudin kehittymisessä on mielenkiintoinen aihepiiri, huomioon ottaen imusuoniston elintärkeän roolin immuunisolujen kuljettajana. Veri- ja imusuoniston määrä kasvaa myös tulehduksen aikana. Hankkeessa selvitetään veri- ja imusuoniston roolia tässä patologisessa tilanteessa.		
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	MS-taudin laajempi ymmärtäminen lisää kliinisesti relevantteja hoitomahdollisuuksia potilaiden hoidossa.		
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 2500 kpl		
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Hiirille aiheutuu haittaa tutkittavien aineiden annosteluista, joista osa tapahtuu aivo-selkäydintilaan. EAE-mallissa hiiret menettävät osittain liikuntakykynsä takaraajojen osalta. Vakavuusluokat: vakava		
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs			
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Patologisissa tutkimusmalleissa on tärkeitä saavuttaa mahdollisimman hyvin ihmisen tautia vastaavat olosuhteet eläintä käyttämällä. Solumalleilla ei pystytä samalla tavalla jäljentämään esimerkiksi monimutkaista tulehdustilaa, joka esiintyy MS-taudin yhteydessä.		
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Koe-asetelmat suunnitellaan huolellisesti mahdollisimman pientä, mutta tilastojen kannalta merkitsevää eläinmäärää käyttäen ja koe toistetaan maksimissaan kolme kertaa. Hankkeen puitteissa tehdään jatkuvaa suunnittelua, jotta eläinmäärää pystytään muokkaamaan hankkeen edetessä pienemmäksi. Aiempien kokeiden perusteella pystytään arvioimaan		

	pienin mahdollinen eläinmäärä luotettavien tulosten saamiseksi.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a – Hiirellä on nopea lisääntymissykli ja sen genomisekvenssi tunnetaan hyvin. Hiiren biologiassa on yhtymäkohtia ihmisen biologiaan, mikä mahdollistaa ihmistä hyödyttävien hoidollisten sovellusten kehittämisen. b - Geenimuunnelluilla kannoilla voidaan selvittää mm. kuinka yksittäiset kasvutekijäperheen jäsenet vaikuttavat tutkittavaan tilanteeseen. c - Kirurgiset toimenpiteet tehdään nukutuksessa ja kivunpoistosta huolehditaan asianmukaisesti. Jokaisessa koemallissa on humanit päätepisteet ja kirurgisten operaatioiden mahdollisesti epäonnistuessa hiiret lopetetaan välittömästi.

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Tässä hankkeessa selvitettiin aivokalvojen imusuoniston merkitystä multippeliskleroosin (MS-taudin) kehitymisessä. Eläinmallina käytettiin kokeellista autoimmuunienkefaliitti EAE -hiirimallia, joka toimi odotetusti. Hankkeen tavoitteet saavutettiin ja julkaistiin vertaisarvioidussa lehdessä. Osoitimme, että aivokalvojen imusuoniston toiminnan estämisellä ei ole vaikutusta MS-taudin kehittymiseen. Tämä on merkittävä tieto, joka osoitti, että aiemmat tulokset, joissa käytettiin laservaloa inaktivoimaan imutiet ovat olleet harhaanjohtavia.

Todelliset haittavaikutukset:

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (Mus musculus) [A1]	0	180	65	398

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Käytetyt eläinmäärät jäivät pienemmiksi kuin alun perin ennakoitiin. Kun kokeet osoittivat, että aivokalvojen imusuonisto ei vaikuta MS-taudin syntyyn, joitain suunniteltuja jatkokokeita ei ollut tarpeen toteuttaa. Kokeita tehtiin vain sen verran, että saavutettiin varmuus tuloksien paikkaansa pitävyydestä. Käytetty EAE-malli on hyvin kuvattu ja paljon käytetty, minkä vuoksi eläimille koituvat haitat olivat hyvin ennakoitavissa. Haittojen todellinen vakavuus vastasi ennakoituja haittoja.

Miten hyvin hengissä pidettyjen eläinten kohtalo tutkimuksen päättyessä vastaa ennakoitua kohtaloa?

Kaikki eläimet lopetettiin kudosten keruuta varten tutkimuksen päättyttyä, kuten oli suunniteltu.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

EAE-hiirimalli on vakiintunut, vankka ja yleisesti käytetty malli ihmisen MS-taudille. Korvaavaa keinoja imusuonien roolin tutkimiseen MS-taudin patogeneesissä elävässä eläimessä ei ole.

Vähentäminen

Taudin kliinisen kaltaisen arvioinnin vuoksi EAE-mallin käyttö oli välttämätöntä. Käytämme kokeisiin aina vain sen verran eläimiä, että saamme tilastollisesti merkittäviä tuloksia. Käytettyjen eläinten määrät olivat huomattavasti suunniteltua pienempiä, koska jatkotutkimuksen olivat tarpeettomia.

Parantaminen

Oireiden vakavuusaste vaihteli eri eläimillä. Eläinten tilan kehittymistä seurattiin huolella ja eläin lopetettiin heti, kun lopetuskriteerit täyttyivät. EAE-taudin aikana hiirille kehittyi sarja kliinisiä oireita johtuen motorisesta vajaatoiminnasta, ja niillä voi olla vaikeuksia saada vettä ja ruokaa. Näille eläimille annettiin kostutettua rehua häkin pohjalle turvaamaan ravinnon ja veden saantia. Tarvittaessa eläimiä nesteytettiin kuivumisen välttämiseksi. Eläimet lopetettiin, kun takajalat olivat halvaantuneet, mutta eläinten kunto oli muutoin hyvä.

Muuta

Kokemuksista ja parannuksista keskustellaan usein tieteellisissä kokouksissa. Tätä aineistoa on esitelty useissa kansainvälisissä kokouksissa.

10. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ			
Hankkeen nimi	Prekliininen kuvantaminen kuvantamisyksikössä: Koe-eläinmallit		
Hankeluvan kesto	3 vuotta		
Avainsanat (enintään 5)	kuvantaminen, pre-kliininen, MRI, PET, CT		
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	<u>Kyllä</u>	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	<u>Kyllä</u>	Ei
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Kyllä	<u>Ei</u>
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Kyllä	<u>Ei</u>
	Lajien säilyttäminen	Kyllä	<u>Ei</u>
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Kyllä	<u>Ei</u>
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Kyllä	<u>Ei</u>
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä	<u>Ei</u>
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Kuvantamisyksikön tutkimuksen keskeisenä tarkoituksena on hyödyntää magneettikuvaus-, positroniemissiotomografia-, yksi-fotoniemissiotomografia-, tietokonetomografia- sekä optisia kuvantamistekniikoita eri tautitilojen tutkimisessa. Eri kuvantamismenetelmillä voidaan tutkia kehoon kajoamattomasti eri tautitiloja, hermoston toimintaa sekä molekyylien kinetiikkaa, dynamiikkaa, kertymistä ja erittymistä nisäkkään elimistössä.		
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Hankkeen aikana saadaan arvokasta tietoa mm. eri tautien etenemisestä ja hoitovasteista/hoitojen tehosta/hoidon jälkeisestä toipumisesta. Lisäksi kehitetään uusia tautien kuvantamismenetelmiä. Kuvantamistutkimus on translationaalista, joten tuloksia voidaan hyödyntää tulevaisuudessa myös ihmisille.		
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Rotta: 670 Hiiri: 230		

Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu tutkimuksessa haittaa kirurgisista toimenpiteistä ja tautimallien indusoinnista, toistuvista anestesia- ja kuvantamisten yhteydessä ja verinäytteenotoista.		
	Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava		
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs			
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Tutkimusta ei voida toteuttaa simuloinnilla tai pelkillä kudokset näytteillä, koska esim. kuvantamisessa käytettävien merkkiaineiden käyttäytyminen koko elimistössä täytyy huomioida tulosten luotettavuuden parantamiseksi. Kompleksit aivosairaudet vaativat eri tekijöiden yhteisvaikutuksen tutkimisen.		
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Kuvauksissa voidaan tarvittaessa käyttää samaa eläintä useaan kertaan, joten samojen yksilöiden pitkäaikaisseuranta pienentää tarvittavaa eläinmäärää verrattuna tutkimusmetodeihin, joissa yksittäisissä tutkimuksissa joka aikapisteessä kohortti lopetettaisiin kudokset näytteitä varten. Määrät perustuvat aiempiin tutkimuksiin sekä kirjallisuuteen sekä Power-analyysiin.		
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) / b) Eläinten (hiiri ja rotta) anatomia ja fysiologia tunnetaan hyvin ja ne ovat lähellä ihmisen fysiologiaa. Näin ollen niiden avulla voidaan tutkia esimerkiksi uusia kuvantamistekniikoita, lääkeaineiden jakautumista elimistössä, eri hoitojen tehokkuutta, ym. Hiirten ja rottien käytössä olevat tautimallit (esim. epilepsia, aivohalvaus) on kattavasti karakterisoitu tieteellisessä kirjallisuudessa. c) Anestesiaa ja kipulääkitystä käytetään operaatioiden aikana ja kipulääkitystä niiden jälkeen. Lisäksi eläinten hyvinvointia seurataan kuvauksien välillä.		
ELLA täyttää: Tehdäänkö hankkeesta takautuva arviointi?	KYLLÄ	EI	
	X		

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

COVIDista johtuen tutkimus viivästyi ja vain osa tavoitteista saavutettiin. Useissa osahankkeissa tutkimus jatkuu uuden luvan alla.

Aivovaurio- ja epilepsiamallien osahankkeiden tarkoituksena on etsiä kuvantamisbiomarkkereita aivotrauman ja epilepsian kehittymisen aikana käyttäen erilaisia kajoamattomia kuvantamistekniikoita ja vertaamalla tuloksia käyttäytymis-, EEG- ja kudostutkimustuloksiin. Käytännössä hankkeessa ei tehty ns. vakavaa traumaa, vaan vakavuudeltaan lievä-kohtalainen, painottuen lievään. Luokka on suoraan verrannollinen kudokseen kohdistetun paineen voimakkuuteen. Hankkeessa testattiin ja kehitettiin useita tekniikoita, tavoitteena havaita paremmin jo lievä hermostyvien vaurio. Hankkeessa käytettiin ns. multidimensionaalista tekniikkaa ja loppuvaiheessa sitä testattiin kohtalaisella vauriomallilla, jotta saataisiin selville tekniikan herkkyys ja tarkkuus tulehduksen ja hermovaurion havaitsemiseen. Lopputuloksena saatiin käyttöön kehittyneitä MRI-tekniikoita, kuten HARDI-

tyyppinen diffuusio MRI-tekniikka, jotka ovat aiempia herkempiä kudoksen mikrorakenteen muutoksille. Tästä on tulossa kaksi artikkelia.

Iskemiaprojektissa tavoitteena oli kvantitatiivisen MRI-protokollan jatkokehittäminen ja tarkentaminen. Tämä osahanke ei edennyt luvan aikana muutamaa testiä lukuun ottamatta.

BBB-vauriomallihankkeen tavoitteena oli kehittää menetelmiä veriaivoesteen läpäisevyyden tarkempaan kuvantamiseen. Malli tuotti toimiessaan odotetun kaltaisen veriaivoesteen aukeamisen, mutta vaihtelu eläinten välillä oli suurempaa kuin ennakoitu, joka esti sen käytön suunnitellussa tutkimuksessa. COVIDista johtuvien viiveiden ja tutkijan vaihtumisen vuoksi malli päätettiin jättää tässä vaiheessa sivuun sen jatko-optimointia varten, eikä tuloksia ole julkaistu.

Inflammaatiomarkkeriosahankkeessa ajatus oli testata PET-markkereiden toimivuus ja herkkyys esim. kuvantamalla epileptogeneesia aivokuorivammassa. Hankkeen aikana testattiin kolmea PET-kuvausmerkkiainetta, joita tullaan jatkossa käyttämään niille soveltuviissa tutkimuksissa.

Selkäydistimulaatiokokeet tehtiin terminaalianestesiassa (lopetus samassa nukutuksessa) ja osoitettiin, että käyttämämme kuvausmenetelmä soveltuu selkäytimen toiminnalliseen magneettikuvantamiseen jopa stimulaation aikana ja että selkäytimen aktivaatio riippuu stimulaation taajuudesta. Selkäydinvauriomalli saatiin pystytettyä onnistuneesti. Työ jatkuu uuden luvan alla ja tulokset on määrä julkaista kevään/alkukesän aikana.

Todelliset haittavaikutukset:

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (<i>Mus musculus</i>)	4	21	3	7
Rotat (<i>Rattus Norvegicus</i>)	51	62	28	59

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Eläimiä käytettiin yhteensä huomattavasti vähemmän (hiiret 35/230, rotat 200/670) kuin suunniteltiin, koska COVID-tilanne rajoitti voimakkaasti mittaushetkiä vuosina 2020-22. Samasta syystä pitkäaikaisseurantoja ei voitu järjestää, joten kaikkia suunniteltuja aikapisteitä ei voitu mitata. Joidenkin kokeiden kokonaispituus lyheni ja osalla vakavuustaso laski.

Erityisesti traumamallissa käytetyt tekniikat olivat pitkältä ajalta tuttuja. Traumamallista muokattiin tutkimuksen edetessä versio, joka kuvaa paremmin lievää aivovammaa, kun alkuperäinen malli on suunniteltu kuvaamaan vakavaa pään vammaa. Tämä tehtiin säätämällä trauman voimakkuutta pienemmäksi ja tutkimus tehtiin lopulta lievällä traumamallilla, josta eläimet palautuivat nopeasti ja kuolleisuus sekä eläinten kokemat haitat saatiin huomattavasti vähenemään. Hankkeen aikana yhtään eläintä ei kuollut traumaan, paino trauman jälkeen laski korkeintaan 5%, eikä käytöksestä välttämättä huomannut eroa kontrollieläimen verrattuna. Kipulääkitys, nesteytys sekä tukiruokinta on käytössä aina trauman jälkeen.

Selkäydinvaurio-osahankkeessa stimulaatioelektrodeja ei asennettu kroonisesti, vaan kokeet tehtiin terminaalianestesiassa. Samoin selkäytimen toiminnallinen magneettikuvaus ja yhdenaikainen sähköisten signaalien keräys toteutettiin terminaalianestesiassa, jolloin vakavuusluokka laski

"kohtalaisesta" luokkaan "ei toipumista". Kokeet, joissa eläinten toipumista seurattiin selkäydinvaurion aiheuttamisen jälkeen pääsivät alkamaan vasta kesällä 2023. Haittojen vakavuus vastasi ennakoitua vakavuusluokkaa ja eläimet toipuivat pääosin hyvin. Tässäkin eläimiä käytettiin arvioitua vähemmän ja työ jatkuu uuden luvan alla.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

Hankkeissa kehitettiin kajoamattomia kuvantamismenetelmiä, joilla sairauksiin liittyviä muutoksi esim. aineenvaihdunnassa ja elintoiminnoissa voidaan seurata. Tämän vuoksi elävien eläinten käyttö hankkeessa on välttämätöntä. Kuvantamisen osalta kehitys- ja testikuvaukset tehdään käyttäen esimerkiksi vesiputkea, eli eläintä ei tähän vaiheeseen tarvita.

Vähentäminen

Tutkimuksen aikana TBI-mallia muokattiin säätämällä trauman voimakkuutta pienemmäksi siten, että se toimi mallina lievälle päävammalle. Tutkimus tehtiin lopulta lievällä traumamallilla, jolloin traumakuolleisuus saatiin nollaan. Yhtenä tavoitteena edelleen on parantaa MRI-kuvantamistekniikoiden herkkyyttä ja tarkkuutta, jonka vaikutus näkyy tulevaisuudessa pienempinä ryhmäkokoina.

Veriaivoesteen vauriomalli vaatii kehittämistä, koska suuren vaihtelun vuoksi eläimiä täytyisi käyttää enemmän kuin suunniteltu.

Selkäydinvaurion tutkimuksen kohdalla vähentäminen on vaikeaa, sillä vaurion indusoinnin jälkeen vaurio muuttuu koko ajan, joten mittauksen toistaminen antaa informaatiota vaurion kehityksestä, mutta samaa eläintä ei voi mitata uudestaan, jotta saataisiin toistoja ja sitä kautta tilastollista merkitsevyyttä.

Parantaminen

Tutkimusta edeltävillä mittausten simuloinneilla voidaan optimoida käytetyt MRI tekniikat, kuvausprotokollat ja laitteisto ns. fantomimittauksina käyttäen esimerkiksi vedellä täytettyä putkea tai fiksattua kudospäätettä, joihin eläimiä ei tarvitse käyttää. Tämä on jatkuvaa kehitystyötä. Lisäksi eläinten käsittelyn suhteen on tehty kehitystyötä mm. kirurgisten tekniikoiden ja injektioiden kanssa. Viime aikoina on kiinnitetty huomiota erityisesti aseptisiin ja mahdollisimman vähän vauriota aiheuttaviin tekniikoihin, sekä kirurgisia toimenpiteitä edeltäviin ja sitä seuraaviin toimenpiteisiin (esim. kivunlievitys). Ongelmakohtia ennakoivalla suunnittelulla eläinten hyvinvointia pyrittiin parantamaan operaatioiden jälkeen (esim. eläimet totutetaan tarvittaessa enakkoon uusiin, operaation jälkeen annettaviin ruokiin, käytetään lämpökaappia tai -alustaa pitkän anestesian jälkeen estämään hypotermiaa) ja seurannan aikana (eläimillä on oma tuttu hoitaja) ja samalla parannettiin tulosten laatua. TBI-mallissa trauman voimakkuutta pienennettiin, joka johti sekä kuolleisuuden että trauman voimakkuuden pieneneeseen ja täten pienempään kokonaiseläinmäärään.

Muuta

Käytännössä informaatio siirtyy paikallisesti päivittäisen toiminnan aikana ja palaverikeskusteluissa sekä tutkijoiden että koe-eläinkeskuksen henkilökunnan välillä. Laajemmin, julkaisuissa ja kokouksissa, joissa esitellään saatuja tuloksia, tuodaan myös esille enemmän eläinten hyvinvointiin liittyviä asioita laadun parantamisena.

11. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Lääkeaineiden tehon testaaminen lysosomaalisten kertymäsairauksien prekliinisissä eläinmalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	prekliininen lääkeainetutkimus, lysosomaalinen kertymäsairaus, Batten	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-opetus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä
Hankkeen tavoitteet (esim. tieteellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Lysosomaalisia kertymäsairauksia tunnetaan ainakin 51 eri-laista ja kaikkien sairauksien hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lääkkeitä. Lysosomaaliset kertymäsairaudet aiheuttavat potilaille ja heidän omaisilleen huomattavaa kärsimystä. Kertymäsairauksia on useita eri muotoja, joita havaitaan niin lapsuudessa kuin nuorissa ja aikuisissa. Jokainen eri lysosomaalinen kertymäsairaus johtuu geenimutaatiosta jossakin lysosomaalisen aineenvaihduntareitin entsyymiä tai siihen liittyvää proteiinia koodittavassa geenissä. Sairaudet ovat vakavimmillaan kuolemaan johtavia. Tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä klinisiin kokeisiin.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja lysosomaalisten sairauksien hoitoon. Tutkimusmallien käyttö edistää myös lysosomaalisten sairauksien mekanismien tutkimista, mikä edesauttaa uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 3950 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Tutkimusmallista riippuen geenimuunnelluilla hiirillä esiintyy eriasteisia neurologisia oireita johtaen heikentyneeseen motoriikkaan ja koordinaatioon sekä halvaantumisoireisiin. Haittaa aiheutuu myös tutkittavien aineiden toistuvista annosteluista, verinäytteenotosta, motoriikkaa mittaavista testeistä ja kuvantamisista. Tutkimuksen päätteeksi eläimet lopetetaan. Vakavuusluokat: vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	In vitro -mallit lysosomaalisten kertymäsairauksien tutkimiseksi ovat hyvin rajalliset. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen klinisiä kokeita.	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Koeasetelmat on standardoituja ja niiden käytön pohjana on perusteellinen mallien validointityö. Validointityöllä varmistetaan, että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ja antaa oikeanlaisen tautivasteen. Koeasetelmissa ryhmän	

	sisäinen variaatio minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määrittelee tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi). Hankkeessa käytettävät lysosomaalisten sairauksien mallit ovat kirjallisuudessa hyvin kuvattuja ja siksi hyvin ennustettavia.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Suurin osa lysosomaalisten sairauksien eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä. Käytettävät eläinmallit ovat eri geenien poistotai muuntogeenisiä hiirikantoja. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille hyvin rajallisille lääkkeille ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Haittaa pyritään minimoimaan eläinten huolellisessa seurannalla ja mahdollisimman aikaisilla lopetuskriteereillä.

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Lääkeaineen tehon testaaminen lysosomaalisten kertymäsairauksien prekliinisissä eläinmalleissa

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää uusia hoitomuotoja Battenin tautiin, Gaucherin tautiin, Niemann-Pickin oireyhtymään ja Hunterin tautiin ihmisillä. Lysosomaalisten kertymäsairauksien piirteitä ihmisellä ovat elimistöön kertyvät erilaiset lipidit ja glykoproteiinit. Oireisiin liittyy usein luuston epämuodostumia, sisäelinten normaalia suurempi koko sekä keskus- ja ääreishermoston oireita. Aivo-vauriot ovat usein vallitsevia ja niitä on noin 2/3-osassa lysosomaalisista kertymäsairauksista. Oireet ovat usein eteneviä ja johtavat lopulta vaikeaan sairauteen ja ennenaikaiseen kuolemaan.

Lääkekokeiden avulla pyritään selvittämään tutkittavien yhdisteiden vaikutusta taudin patologiaan ja oireiden kehittymiseen. Hankkeen tavoitteet saavutettiin hyvin. Käytetyt tutkimusmallit toimivat suunnitellulla tavalla ja tutkimuksista saatiin hyödyllistä tietoa lääkeaineiden jatkokehittelyyn.

Todelliset haittavaikutukset: Eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (<i>Mus musculus</i>)	28	166	52	0

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Tutkimuksessa käytettiin 246 hiirtä (ennakoitu määrä 3950). Käytetyt eläimet jakaantuivat seuraavasti: 11 % luokassa ei toipumista, 67 % luokassa lievä, 21 % luokassa kohtalainen ja 0 % luokassa vakava.

Käytettyjen eläinten määrä oli n. 6 % suunnitellusta käytöstä, koska tarvetta ennakoiduille kokeille ei ollut. Kaikki eläimet käytettiin osahankkeessa 1 (Battenin tauti).

Luokka lievä: Hankeluvan voimassaoloaikana käytettiin pääasiassa Cln3-hiirikantaa, jonka fenotyyppi osoittautui ennakoitua lievemmäksi, valtaosassa kokeita eroa villityypin hiiriin ei havaittu käytetyissä koeasetelmissä. Pidemmässä seurannassa eri genotyyppien välillä havaittiin eroja lähinnä hienomotoriikassa. Sen sijaan GAA-KO-hiirikannassa genotyyppien välillä nähtiin suurempia eroja, kun tutkittiin ikääntyneitä hiiriä.

Luokka kohtalainen: Koeasetelmassa käytetty testi ja käytettyjen testien suuri määrä yhdessä nostavat vakavuusluokan kohtalaiseen.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

In vitro-mallit lysosomaalisten kertymäsairauksien tutkimiseksi ovat hyvin rajalliset. Uusien lääkeaineiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan luotettavasti tutkia vain koe-eläinmalleissa ennen klinisiä kokeita.

Vähentäminen

Käytetyt eläinmallit ja menetelmät ovat koeasetelmasta riippuvia. Tilastollisilla menetelmillä on selvitetty pienimmät tarvittavat ryhmäkoot erojen havaitsemiseksi. Hankkeen tutkimukset on suoritettu mahdollisimman pienellä eläinmäärällä.

Parantaminen

Lautakunta edellytti takautuvassa arvioinnissa pohdittavan aiempien lopetuspisteiden mahdollisuutta halvausmallissa. Lisäksi pyydettiin kertomaan, kuinka moni eläin jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella.

Hankeluvan aikana käytetyissä hiirimalleissa ei havaittu halvaantumisoireita. Lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 12 hiirtä ja kuolleena löydettiin 3 hiirtä. Lopetussyyt eivät olleet tautimalliin liittyviä, vaan yleisiä ikääntymismuutoksia eläinten kunnossa.

Hiiret saavat normaalirehun lisäksi pehmennettyä rehua (veteen sekoitettua jauhetta) tarpeen mukaan. Juomapulloissa on pitkät nipat. Hiirillä on normaalin häkkivarustuksen lisäksi lisävirikkeenä Nestlet-pesämateriaalia. Hankeluvan aikana laitoksella on otettu käyttöön hyvinvoinnin pisteytystaulukko avustamaan lopetuskriteereiden määrittämistä. Tällöin vältetään tarpeettomalta kärsimykseltä, kun lopetuskriteereiden lähestyminen todetaan ajoissa ja eläimet on lopetettu heti kriteerien täytyessä. Tämän lisäksi hankeluvan aikana on otettu käyttöön tunneli- tai kuppikäsittely kaikissa hiirikokeissa, jolloin eläinten käsittelystä aiheutuvaa stressiä on saatu vähennettyä.

Muuta

Toiminnanharjoittaja osallistuu aktiivisesti eläinten hyvinvoinnin kehittämistoimintaan niin laitoksen sisäisessä toiminnassa kuin osana kansainvälistä yritystä ja esittää hyvinvointityöhön liittyviä tuloksia eri tilaisuuksissa.

12. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Aivojen rytmisen toiminnan merkitys tiedonkäsittelyssä	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	sähköfysiologia, oskillaatiot, dynamiikka, konnektiivisuus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-opetus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei

	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tieteellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Aivoissa tiedonkäsittely on hajautettu usealle eri aivoalueelle. Niistä mekanismeista, jotka sitovat hajautetun tiedonkäsittelyn yhtenäisiksi havainto ja kognitiivisiksi kokonaisuuksi tiedetään vähän. Tämän projektin tavoitteena on tutkia aivojen tiedonkäsittelyn mekanismeja sähköfysiologiamittauksin käyttäen hiirimallia. Päämääränä on ymmärtää aivojen rytmisen toiminnan –oskillaatioiden –sekä aivoaluiden välisen toiminnallisen konnektiivisuuden merkitystä tiedonkäsittelyssä ja sen koordinoimisessa. Hiirimallit ovat yleisesti käytössä neurotieteissä ja niitä käytetään useiden aivosairausmallien perustana. Rekisteröimme hiirten aivoista hermosolujen toimintaa elektrodiverkoilla sekä syväelektrodilla hiirten suorittaessa käyttäytymistehtävää. Tutkimus antaa yhtäaikaista tietoa laaja-alaisten hermosolujoukkojen toimintasta sekä yksittäisten hermosolujen toiminasta yksittäisillä aivoalueilla. Mittausdatasta arvioimme aivojen rytmisen toiminnan ja vuorovaikutukset laskennallisilla menetelmillä sekä niiden merkityksen aistitiedon käsittelyyn.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	Aivojen rytmisen toiminnan ja niiden välinen toiminnallinen konnektiivisuuden ajatellaan olevan yksi kognition keskeisimpiä mekanismeja ja niiden häiriöt liitetään useisiin aivosairauksiin. Tämä projekti tulee antamaan merkittävää tietoa oskillaatioiden ja hermosolujen toiminnan välisten vuorovaikutusten merkityksestä tiedon käsittelyssä ja muistissa sekä näiden ilmiöiden solutason mekanismeista. Tutkimuksen tuloksia verrataan vastaavaan tietoon, jotka on saatu ihmisen ei-invasiivisilla sähköfysiologisilla mittauksilla elektro- ja magnetoenkefalografiaa käyttäen. Tutkimuksella on siten merkittävä mahdollisuus lisätä tietoa ihmisen neurotieteelliseen tutkimukseen. Tämä tutkimus tulee lisäämään tietoa tiedonkäsittelyn hermostollisista mekanismeista mikä voi auttaa löytämään parempia aivosairauksien diagnosointi- tai hoitomenetelmiä aivosairauksiin.	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri, 300 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Hiirille aiheutuu haittaa elektrodien kirurgisesta asennuksesta, mittausten aikaisesta liikkumisrajoituksesta sekä käyttäytymistestien tekemisestä. Eläimet lopetetaan kokeen loputtua. Vakavuusluokat: kohtalainen	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Eläimiä tarvitaan <i>in vivo</i> sähköfysiologisiin mittauksiin ja vasteiden havainnointiin käyttäytymisen aikana. Tutkimusta ja sähköfysiologia mittausta ei siksi voida suorittaa solu- tai kudosisjelmillä <i>in vitro</i> kokein, jotka tehdään eristetyillä solulinjoilla, koska hermosolujen toiminta on riippuvaista eläimen käyttäytymisestä ja hermosolujen välisistä kytkennöistä.	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Yksilömäärät on arvioitu aikaisemman kokemuksen perusteella niin, että ne tuottavat tilastollisesti todennettavia vasteita. Tiheidän elektrodiverkkojen käyttö sähköfysiologiamittauksissa vähentää merkittävästi eläinmäärän tarvetta, koska yksittäiseltä eläimeltä voidaan kerätä mittausdataa usealta aivoalueelta kerrallaan.	

3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	A) Hiirimallit ovat muodostuneet eniten käytetyksi aivotutkimusmalliksi sähköfysiologiatutkimuksissa. Lajista saatavaa taustatietoa voidaan käyttää tutkimuksen suunnitteluun ja tutkimuksen tuloksista on hyötyä suurelle tiedeyhteisölle. B) Hiirimallit ovat yleisimmin käytettyjä eläinmalleja neurotieteessä ja hiirten aivojen toiminnasta on olemassa paljon taustatietoa, joka auttaa tutkimuksen suunnittelussa. C) Eläimille käytetään yleisesti hyväksyttyjä nukutus- ja kivunlievitysmenetelmiä. Kokeiden kesto on rajoitettu mahdollisimman lyhyeksi ja eläimet lopetetaan kokeiden päätyttyä.
--	---

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Muu peruste: Hankkeen vakavuusluokka on kohtalainen, mutta jaosto haluaa varmistuksen sille, että enintään 2 % sitruunahapon lisäys juomaveteen ei aiheuta tarpeettoman suurta juomisen rajoittumista. Takautuvassa arvioinnissa tulee antaa selvitys siitä, miten paljon hiirten juominen väheni ja seurasiko juomisen rajoituksesta vaikutuksia hyvinvointiin, esim. painon laskua tai kuivumista.

Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteet saavutettiin hankkeeseen myönnetyn toimiajan sisällä osakokeiden 1 ja 2 puolesta. Osakoe 3 jäi toteuttamatta hankkeen antamassa aikarajassa. Hanke on mahdollistanut urauurtavan sähköfysiologian mittauslaitteiston testaamisen ja validoinnin sekä uusien laajamittaisen tutkimusprojektien suunnittelun tulevaisuuden *in vivo* sähköfysiologian tutkimusta varten. Hankkeen avulla uusi mittauslaitteisto on saatu osaksi yksikön repertuaaria millä kykenemme tutkimaan aivojen dynaamista aktivaatiota hereillä olevilla hiirillä. Validoinnin myötä myös erilaiset tulevaisuuden sovellutukset ovat nyt mahdollisia. Osakoe 1 keskittyi osaltaan mittauslaitteiston validointiin ja lepotilamittausten keräämiseen. Osakoe 2 jatkoi tutkimuksen kulkua laajentaen farmakologisten lääkeaineiden modulaaristen vasteiden tutkimiseen lepoasetelmassa. Aineisto on saatu kerättyä hankeluvalle myönnetyssä ajassa osakokeisiin 1 ja 2, mutta analyysi jatkuu edelleen molempien osalta. Analyysiosio todennäköisimmin kestää vielä ainakin vuoden kompleksisen konfiguraation ja datan suuren määrän vuoksi. Hankkeessa ei ehditty toteuttaa käyttäytymistutkimukseen liittyvää sitruunahapon lisäämistä juomaveteen.

Todelliset haittavaikutukset:

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (<i>Mus musculus</i>)	72		1	

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Hankeluvan alla käytettyjen eläinten määrä oli huomattavasti vähäisempi kuin luvassa määritelty enimmäismäärä. Tutkimuksen aikana pyrimme optimoimaan aina hiirien määrän ja suoriutumaan datan keruusta mahdollisimman pienellä määrällä, noudattaen vähentämisen periaatetta. Tutkimusluvalle myönnetystä 300 eläimestä, käytimme tutkimuksemme aikana 73 eläintä. Toimenpiteiden vakavuusluokka oli arvioitu kohtalaiseksi ja kaikki toimenpiteet, jotka hiirille suoritettiin, olivat kohtalaisen luokan määritelmän mukaisia.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

Kyseisen hankeluvan alla tehdyn tutkimuksen tarkoituksiin ei ole mahdollista korvata kyseisiä eläinmalleja, sillä mittausten kriittinen osuus on hereillä olevan eläimen aivot toiminnan dynaaminen seuranta ja tutkiminen. Koska kyseinen tutkimus on perustettu translatiiviseen viitekehykseen, on olennaista, että tutkimus on tehty elävillä eläimillä.

Vähentäminen

Tutkimusryhmä harjaantui kirurgian kanssa mahdollisimman hyvin ja tehokkaasti, ja täten pyrkien pienentämään mahdollisia riskejä komplikaatioiden puolesta. Mittauslaitteistoa pyrittiin testaamaan ja varmistamaan sen toimintakyky, jotta hiiriä ei valmisteltaisi turhaan, mikäli laitteisto ei operoisi oikein. Ylimääräisiä hiiriä ei mitattu vaan pyrkimys oli mitata vähimmäismäärä tarvittavaan analyysiin, ja tarvittaessa mitata lisää, mikäli osa mittauksista osoittautuisi heikkolaatuiseksi.

Parantaminen

Tutkimuksen aikana tutkimusryhmä pyrki minimoimaan kaiken ylimääräisen stressin ja epämukavuuden koe-eläimiltä. Tutkijat käsittelivät eläimiä useasti ennen tutkimuksen alkua, jotta eläimet tottuivat tutkijoihin ja käsittelyyn. Hiiriä pidettiin yhteisissä häkeissä niin pitkään kun kirurgian puolesta oli mahdollista, jotta hiiret eivät joutuisi olemaan yksin. Hiiret totutettiin mittausasetelmaan mahdollisimman hyvin asteittain pidennetyn totuttamisen kautta ja niiden käyttäytymistä monitoroitiin ja arvioitiin jokaisella kerralla. Mikäli hiirellä oli hankaluuksia tottua laitteistoon, pidennettiin totuttamisjaksoa hieman, jotta hiiri tottuisi siihen paremmin. Kirurgioiden puolesta noudatettiin luvassa hyväksyttyä toipumis- ja kipulääkitysprotokollaa ja kirurgioissa priorisoitiin tarkkuutta ja nopeutta, jotta hiiri ei joudu olemaan nukutuslääkkeen alaisena pidennettyjä aikoja. Itse mittaustilanteissa hiiren aika mittauslaitteella pyrittiin aina minimoimaan parhaan mukaan etukäteisvalmistelujen puolesta. Jatkoa ajatellen totuttamisjaksoa voisi pidentää kestämään viikon 3 päivä sijasta ja lääkeprotokollaan voisi lisätä buprenorfiinin sellaisia tapauksia varten, jos kirurgiassa ilmenisi haasteita tai komplikaatioita, mutta eläin kykenisi kuitenkin selviämään.

Muuta

Tutkimusryhmä on priorisoinut parhaansa mukaan eläinten hyvinvoinnin ja pyrkinyt erityisesti ottamaan huomioon parantamisen periaatteen, jotta toimintamallit olisivat optimaaliset hiirien hyvinvoinnin kannalta. Itse mittauksia on tehty eläimillä vain tarpeeseen, kaikki muut testit mittauslaitteistolla on aina tehty suolaliuoksessa.

13. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ

Hankkeen nimi	Vastasyntyneen hypoksis-iskeemisen aivovaurion mallintaminen, kuvantaminen ja hoidon kehittäminen	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	vastasyntynyt, aivovaurio, hapenpuute, viilennyshoito, kantasolu	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei

	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Raskauden- tai syntymänaikainen hapenpuute voi pitkittyes- sään vahingoittaa useita elimiä. Vastasyntyneen hapenpuut- teen pelätyin komplikaatio on aivojen vaurioituminen eli vasta- syntyneen hypoksis-iskeeminen aivovaurio. Se on samalla ylei- sin vastasyntyneen kuolemaan tai vammautumiseen johtava syy. Syntymää edeltävä tai synnytyksenaikainen hapenpuute koskettaa noin 3–5 vastasyntyntä tuhannesta täysiaikaisena syntyneestä, ja on vielä selvästi yleisempi ennenaikaisesti syn- tyneillä. Tällä hetkellä vastasyntyneen hypoksis-iskeemisen aivovaurion ainoa hoito on vastasyntyneen lapsen viilennys. Vaikka alkuvai- heen viilennyshoito on osa nykyaikaista hypoksis-iskeemisen ai- vovaurion hoitoa, viilennyshoidon teho on varsin rajallinen. Eloon jäävillä vastasyntyneillä tavallisia komplikaatioita ovat esimerkiksi epilepsia, oppimisvaikeudet ja kehitysvamma. Tämän tutkimuksen tarkoitus on oppia ymmärtämään hypok- sis-iskeemisen aivovaurion mekanismeja aiempaa paremmin, kehittää aiempaa parempia malleja sekä kehittää ja testata uu- sia hoitoja vastasyntyneen aivovaurion hoitoon.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on oppia paremmin ymmärtämään vastasyntyneen hapenpuutteeseen liittyvää aivovauriota. Vauriomekanismien ymmärtäminen on edellytys uusien hoitojen kehittämiseksi. Hankkeen perimmäinen tavoite on olla kehittämässä uusia hoi- toja vastasyntyneen hypoksis-iskeemisen aivovaurion hoitoon ja näin ollen lisätä elämisen laatua ja terveyttä hapenpuut- teesta kärsivien vastasyntyneiden myöhempiin elinvuosiin. Yh- teiskunnan tasolla tämä voi myös merkitä huomattavia kustan- nussäästöjä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Rotta 1806 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Rotille aiheutuu haittaa aivovaurion iskeemisestä ja hapen- puutteesta johtuvasta indusoinnista, tutkittavien aineiden an- nostelusta, kuvantamisista, käyttäytymistesteistä ja verinäyttei- den otosta. Kokeen lopuksi eläimet lopetetaan. Vakavuusluokat: vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen – Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Kun tutkitaan uusia hoitoja, eläimen käyttäminen aivovaurion mallintamisessa on välttämätöntä, koska on nähtävä kokonai- sen elimistön (tulehdussolut ym.) reaktio annetulle hoidolle. Eläinmalleissa on myös mahdollista seurata sekä vaurion että hoidon vaikutuksia eläimen myöhempään käyttäytymiseen, motoriikkaan jne.	
2. Vähentäminen – Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?	Osa mekanismeja tutkivista kokeista pyritään tekemään soluvil- jelmiä käyttäen. Kokeet suunnitellaan huolellisesti. Ryhmäko- ko tarkistetaan joka kokeen alussa, ja varmistetaan, että käytetään pienintä mahdollista eläinmäärää.	

3. Parantaminen – Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Tutkimuksessa käytetään rottia, koska hermostollisia sairauksia on aikaisemmin tutkittu runsaasti rottamalleissa. Rotan kehityksen vaiheet tunnetaan hyvin. Hiiren pieni koko vaikeuttaisi PET-kuvien tulkintaa ja aivo-selkäydinnesteenäytteiden ottoa. Isompien nisäkkäiden käyttö voisi tulla kyseeseen vasta myöhemmin, kun tutkittavan uuden hoidon teho on ensin osoitettu jyrksijöillä tehdyissä kokeissa. b) Aivovaurioon liittyy myös immuunijärjestelmän aktivoituminen ja mahdolliset eläimen toiminnan tai kehityksen poikkeavuudet, joita on tärkeä päästä tutkimaan kokonaisessa elimistössä. Kuvatut mallit eivät ole liian monimutkaisia toteuttaa, ja näin ollen uusien hoitojen tutkiminen malleissa on realistista. c) Eläinten taitavaan käsittelyyn kiinnitetään huomiota. Jos eläimillä havaitaan vakavaa yleiskunnon heikentymistä, ne lopetetaan suositusten mukaisesti.
--	--

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Vastasyntyneen hypoksis-iskeemisen aivovaurion mallintaminen, kuvantaminen ja hoidon kehittäminen

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Tutkimuksen tavoitteet on saavutettu suunnitellusti. Olemme oppineet ymmärtämään paremmin vastasyntyneen hapenpuutteeseen liittyvän aivovaurion taustalla vaikuttavia tekijöitä, esimerkiksi valkosolujen ja tulehdusreaktion (inflammaation) roolia vaurion synnyssä. Näitä löydöksiä on tarkoitus edelleen käyttää hyödyksi, kun pyrimme kehittämään uusia hoitoja vastasyntyneen aivovaurion hoitamiseksi. Olemme käyttäneet tutkimuksissa myös uudenlaista tekniikkaa, jonka avulla olemme voineet tutkia aivovaurion vaiheittaista syntymistä.

Nämä tutkimustulokset tullaan julkaisemaan kansainvälisissä korkeatasoisissa julkaisusarjoissa. Ensimmäinen käsikirjoitus on jo valmis, ja toinen on parhaillaan työn alla. Julkaisuja jo tehtyihin töihin liittyen on odotettavissa vuosien 2024–2025 aikana useampia. Työtä on tarkoitus jatkaa pitkäjänteisesti niin, että nyt tehdyistä löydöksistä on tulevaisuudessa hyötyä myös kliinisessä potilastyössä.

Todelliset haittavaikutukset: Eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Rotat (<i>Rattus norvegicus</i>)	0	47	456	22
Hiiret (<i>Mus musculus</i>)	0	0	271	49

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Eläimiä on käytetty ennakoitua vähemmän, yhteensä 845. Lupa oli myönnetty 1806 eläimelle. Osa suunnitelluista kokeista on jätetty tekemättä. Alkuperäisessä hakemuksessa meillä oli suunnitelmassa kolme erilaista mahdollista mallia, ja yhtä näistä ei koskaan otettu käyttöön, koska pidimme lopulta kahta muuta parempina. Osa suunnitelluista kokeista siirtyi myös ajallisesti eteenpäin. Haimme muutosluvalla lupaa myös hiirten käyttöön, koska hiirille on kattavammin tiettyjä vastaaineita ja niitä on saatavana poistogeenisinä.

Myös ennakoitu vakavuusluokka on lievempi kuin lupaa myönnettäessä on ajateltu. Kokeissa mukana olleista eläimistä 71 (8,4 %) on tilastoitu luokan vakava mukaan, ja suurin osa on luokiteltu vakavuusluokan kohtalainen mukaan. Todellisuudessa tämäkin arviointi on tehty yläkanttiin, koska olemme raportoineet esim. anestesiatoimenpiteen aikana menehtyneitä eläimiä luokkaan vakava, vaikka tosiasiallisesti näin ei olisi tarvinnut/tullut tehdä. Eläintöitä on tehty tarkkaan harkiten, ja osittain siksi todelliset määrät ovat arvioituja pienemmät. Olemme myös oppineet lisää tehtävistä toimenpiteistä ja niiden vaikutuksesta eläimiin, ja sitä kautta uudessa hankeluvassa kokeen vakavuusluokitus on myös voitu lieventää.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

Näissä töissä tutkitaan vaurion ja mahdollisen hoidon vaikutusta koko elimistön tasolla. Näin ollen korvaavien *in vitro* -tekniikoiden käyttöönotto ei vielä ole ollut realistista. Seuraamme aktiivisesti näiden tekniikoiden kehittymistä ja pohdimme vaihtoehtoisia malleja.

Vähentäminen

Olemme pyrkineet tarkastamaan käytetyt ryhmäkoot eri kokeissa niin, että eläimiä ei käytetä turhaan. Olemme kokeiden kautta oppineet realistisemmin arvioimaan tarvittavien ryhmäkokojen suuruutta. Pyrimme myös valitsemaan tarkasti, missä tutkimuskysymyksissä eläinten käyttäminen on tarpeellista. Osa tutkimuksista (esim. biologisiin merkkiaineisiin liittyen) voidaan tehdä käyttämällä potilailta kerättyjä näytteitä. Sen sijaan esim. uusien hoitojen testaaminen on alkuvaiheessa välttämätöntä tehdä eläinmalleja käyttäen. Pyrimme kuitenkin kehittämään aikaisempaa realistisempaa eläinmallia, joka pitkällä aikavälillä voisi vähentää myös käytettävien eläinten tarvetta.

Parantaminen

Haittojen todellinen vakavuus oli ennakoitua pienempää, joka johtunee osittain siitä, että koeolosuhteita (esim. hypoksia) on pyritty optimoimaan. Samoin on kiinnitetty erityistä huomiota eläinten hyvinvointiin esim., kun kokeessa mukana olleet poikaset palautetaan emolle. Käytännön toimilla, varovaisella käsittelyillä, poikasten käärimisellä pesämateriaaliin jne. on pyritty lieventämään eläinten stressiä. Hankkeessa mukana olevat tutkijat ovat taitavia tehtävissä toimenpiteissä ja ovat aktiivisesti kehittäneet osaamistaan. Teemme aktiivisesti myös kehitystyötä, jonka tavoitteena on uuden, entistä paremman mallin luominen. Uudessa mallissa kirurgista toimenpidettä ei tarvittaisi lainkaan, ja vaurio olisi todennäköisesti enemmän kliinistä tilannetta vastaava.

Muuta

Paikallisella tasolla keskustelemme tehtävistä toimista ja parannusehdotuksista aktiivisesti. Mikäli yllä mainittu kehittelyvaiheessa oleva uusi eläinmalli saadaan valmiiksi, tulemme tiedottamaan siitä aktiivisesti ja julkaisemaan tarkemman kuvauksen kansainvälisessä julkaisusarjassa.

14. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Iskemia- tai EAE- mallin aiheuttama näönmenetys	
Hankeluvan kesto	Kolme vuotta	
Avainsanat	Iskemia, MS-tauti, sokeus, näkövamma, silmälääke	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei

	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Malleilla haetaan hoitokeinoja verkkokalvon keskusvaltimotu- koksen (esim. veritulpan aiheuttama iskemia) ja näköhermon rappeuman (MS-taudista aiheutuva) aiheuttamiin näönmene- tyksiin. Keskusvaltimon tukos johtaa usein silmän sokeutumi- seen, mutta näkökyky voi myös joskus palautua hoidolla. MS- taudin ensioireina havaittuihin näköhermon tulehdustiloihin ja - rappeumaan etsitään hoitokeinoja, jolloin tautia sairastavien näkökyky säilyisi tai jopa palautuisi.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Hoitokeinoja kehittämällä estetään sokeutuminen ja säilytetään näkökyky tai jopa palautetaan jo menetetty näkökyky.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri 2000 kpl, rotta 1000 kpl	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Mallit aiheuttavat eriasteisia silmäsairauksia lievästä näkövam- masta täydelliseen sokeutumiseen. Iskemia-mallin kirurgia ja MS-mallin halvausoireet aiheuttavat vakavaa haittaa eläimille. Haittaa aiheutuu myös nukutuksista silmätutkimuksissa, tutkit- tavien aineiden annosteluista ja verinäytteen otosta. Eläimet lopetetaan tutkimuksen päätyttyä. Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Korvaavia soluilla tehtäviä silmäsairausmalleja ei ole saatavilla. Tutkittavat lääkeaineet testataan ensin solukokeilla aina, kun käytettävissä on testaukseen soveltuva solulinja tai tietoa ei ole ennestään riittävästi saatavilla käytettävistä aineista.	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?	Koe-eläintyöt suunnitellaan siten, että tarvetta koesarjojen tois- tamiselle ei olisi. Lisäksi joissain tutkimuksissa käytetään koe- eläimen toista silmää kontrollina, joka vähentää tilastollisesti analysoitaessa käytettävien koe-eläinten määrää. Toistettavat kuvantamismenetelmät mahdollistavat taudin etenemisen seu- raamisen ilman, että eläimiä tarvitsee lopettaa eri aikapisteissä.	
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on pa- ras tieteellisten tavoitteiden kan- nalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Kokeissa pitää käyttää eläimiä, joiden silmän rakenne ja toi- minta vastaavat mahdollisimman hyvin ihmisen silmää. Pienistä nisäkkäistä hiiren ja rotan silmät soveltuvat parhaiten silmätut- kimukseen. b) Kyseiset kokeelliset mallit tutkitusti mallittavat hyvin ihmi- sissä esiintyviä vakavia silmäsairauksia. c) Kipua aiheuttavat toimenpiteet tehdään eläimen ollessa nu- kutuksessa. Kivunlievityksestä huolehditaan sekä toimenpiteen aikana että sen jälkeen. Kokeiden kestoa on malleja kehittä- mällä pystytty lyhentämään. Tukihoitoilla voidaan lieventää eläimen kokemaa haittaa (lisälämpö, tukiruoka, nesteytys,	

	lisähappi) eikä eläimiä tarvitse lopettaa HEP saavuttamisen vuoksi. Eläimet totutetaan käsittelyihin: hiirillä käytetään kup-pimenetelmää stressin vähentämiseksi ja rottia käsitellään nos-tamalla koko kehosta.
--	---

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Iskemian- tai EAE-mallin aiheuttama näönmenetys

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeessa oli kolme osahanketta: 1. Verkkokalvon keskusvaltimon tukos (iskemiamalli, rotta), 2. Verkkokalvon iskemian ja uudelleen perfuusiomalli (hiiri, rotta) ja 3. Autoimmuunienkefalomyeliitin (EAE) ja siihen liittyvän näköhermon neuropatian tutkiminen (kokeellinen malli multipeliskleroo-siin, MS-tauti, hiiri).

Hankkeen tavoitteena oli tehdä palvelututkimuksia, joissa tutkitaan kyseisten silmäsairauksien synty- ja etenemismekanismeja sekä etsitään tai kehitetään niihin hoitomuotoja. Palvelututkimuk-set ovat onnistuneet odotusten mukaisesti. Hankkeen luonteeseen kuuluu, että tutkimustulokset luovutetaan asiakkaalle/palvelun ostajalle, joka jatkaa kehitystyötä eteenpäin. Käytetyt eläinmallit ovat sopivia hankkeen tarkoituksiin.

Luvan voimassaoloaikana ei tehty yhtään Osahanke 1 (Iskemian) tai 2 (Iskemian ja uudelleenperfuusio) mukaista projektia. Luvan voimassaoloaikana tehtiin 2 kpl Osahanke 3 (EAE) mukaista projek-tia.

Todelliset haittavaikutukset:

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (Mus musculus) [A1]	0	19	16	58

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Haittojen vakavuus vastasi odotuksia.

Ensimmäisessä osahanke 3:n tutkimuksessa pilotoitiin hiirillä autoimmuuniuveiittia eli silmän-sisäistä immuuniperäistä tulehdusta mallintavaa tutkimusmallia luvalla kuvatus indusointiproto-kollan kaltaisesti, vaihtamalla enkefalomyeliittiä aiheuttava MOG-peptidi silmäoireita aiheuttavaan IRBP-peptidiin. Eläimillä havaittiin lieviä silmänsisäisen tulehduksen oireita. 16 hiirtä koki kohta-laista, ja 14 hiirtä lievää haittaa. Tämän tutkimuksen eläimille ei kehittynyt luvalla mainittuja odo-tettavissa olevia halvausoireita johtuen mukautetusta tautimallista. Yhtään eläintä ei lopetettu HEP-kriteereiden (inhimillinen päätepiste, lopetuskriteeri) vuoksi.

Toisessa tutkimuksessa haitta oli EAE-mallissa taudin eteneminen ja eläinten halvaantuminen eriasteisesti. EAE-mallissa käytettiin 63 hiirtä, joista 58 (92 %) koki vakavaa haittaa. 3 hiirtä (5 %) saavutti HEP-ajan ja lopetettiin ennen kokeen päättymistä. 1 hiiri (1,5 %) löytyi kuolleen viisi päi-vää taudin aiheuttamisen jälkeen, saatuaan fingolimodia (MS tautilääke, kontrolli) vatsalaukuun annosteltuna.

HEP-ajan saavuttaneiden eläinten määrä oli odotettua alhaisempi. Kaikki HEP-ajan saavuttaneet hiiret lopetettiin pitkälle edenneiden halvausoireiden (oikaisurefleksin puuttuminen) seurauksena. Yksikään eläin ei saavuttanut 25 % painon pudotuksen HEP-rajaa. Eläimiä tukiruokittiin päivittäin, sekä lämpöhoidettiin päivittäin halvausoireiden edettyä tasolle 2,5. Kuolleena löytyneen eläimen ruumiinavaus paljasti verenvuotoa rintaontelossa ja ruhjeen ruokatorvessa, mikä viittaa komplikaatioon annostelussa.

Taudin aiheuttamisessa käytettävä MOG-peptidi on sekoitettu Freudin täydelliseen adjuvanttiin, mikä voi aiheuttaa iho-oireita. Yhteensä 26 hiirellä muodostui jonkinasteinen haavauma MOG-injektiokohtaan, ja suurimmalla osalla haavauma jäi pieneksi (halkaisijaltaan n. 0.5 cm). Kuudella hiirellä haavauma johti ihotulehdukseen (ulcerative dermatitis). Haavaumia hoidettiin topikaalisesti Vetericyn Hydrogel- haavanhoitogeelillä, ja ne lähtivät paranemaan muutamassa päivässä.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

Korvaavia menetelmiä ei ole voitu kehittää tässä hankkeessa. Autoimmuunisairauksia tutkittaessa vaaditaan koko kehon eri osien ja useiden eri kudoksen ja solutyypin yhteisvaikutusta, eikä sitä voida nykyisillä menetelmillä mallintaa vaihtoehtoisin menetelmin. Yritys tarjoaa myös *in vitro* -toksisuuskokeita erinäisillä silmän solutyypeillä.

Vähentäminen

Tutkimukseen sisältyi *in vivo* -kuvantamista (elektroretinografia). Aikapisteet määritettiin siten, että kuvattiin lähtötilanne (baseline) ennen taudin indusointia, ja toinen mittaus tehtiin lopetuspäivänä, jotta eläimille ei koituisi lisähaittaa nukutuksista tautimallin seuranta-aikana. Tällä tavoin saatiin vähennettyä nukutuksesta johtuvaa eläinten kunnon heikkenemistä ja siten HEP (humaani päätepiste) -ajan saavuttaneiden eläinten määrää, joten tutkimuksessa käytettävien eläinten määrää voidaan vähentää.

Parantaminen

EAE-mallissa käytössämme on aikaisemmat lopetuskriteerit kuin Hooke Laboratories käyttämässä mallissa [Mouse EAE Scoring](#)

Häkkien pohjalla on käytetty liukuestemattoa, joka helpottaa halvausoireista kärsivien hiirten liikumista. Joidenkin eläinyksilöiden on havaittu nakertavan liukuestemattoa, joten yhdessä häkissä oli testissä mittatilauksena hankittu metallinen reikälevy. Se tuntui toimivan hyvin, ja jatkossa siirymme metallisten levyjen/verkkopohjan käyttöön. Liukuestematon nakertamisesta huolimatta tutkimuksessa ei havaittu maton syömisestä koituvia hyvinvointiongelmia. Pesämateriaalina käytettiin paperisilppua haapamateriaalin sijaan, koska haapamateriaali saattaa vaikeuttaa halvausoireista kärsivien eläinten liikumista.

EAE-mallin stressiherkkyyden vuoksi eläimet pidettiin omassa huoneessa erillään muista tutkimuseläimistä, ja vain samat muutamat henkilöt käsittelivät niitä, ja tekivät toimenpiteitä. Huoneeseen oli rajattu pääsy ylimääräisten äänien ja muiden ärsykkeiden minimoimiseksi. Eläimet totutettiin käsittelyyn kuppimenetelmällä ennen tutkimuksen aloittamista. Eläinten saavuttua yksikköön niille annettiin alusta alkaen hanavedellä kostutettua pellettirehua petrimaljoista häkin pohjalla sekä kaupallista tukiruokaa, jotta eläimet tottuivat tukiruokaan ja olivat mahdollisimman hyvässä kunnossa tautia aiheutettaessa. Rehu kostutettiin yön yli jääkaapissa ja tarvittaessa siihen lisättiin vettä vielä annostelupäivänä, jotta se olisi mahdollisimman nestepitoista. Eläimille annettiin myös pellettirehua häkkien pohjalle.

Lisäksi, kun eläimen paino alkoi laskea tai se saavutti tietyn kliinisen oireen tason, eläin nostettiin 1–2 tunniksi lämpöalustan päälle, jossa oli tarjolla kostutettua rehua ja tukiruokaa. Lämpö edistää ruumiinlämmön ylläpitämistä ja edistää näin myös syömistä. Tämän on aiempien lupakausien aikana havaittu lisäävän eläinten syömishalukkuutta ja ehkäisevän painonpudotusta ja kuivumista. Tämän lupakauden aikana yksikään EAE-mallin eläimestä ei saavuttanut luvalla määritettyä -25 % painonpudotukseen liittyvää HEP-rajaa, vaan eläimen lopettamisen syynä oli oikaisurefleksin puuttuminen (joka myös oli HEP-rajana).

Muuta

Halvausoireista kärsivän eläimen tukihoitaminen lämpöalustan päällä vedellä kostutetulla rehulla ja tukiruokalla edistää eläimen syömishalukkuutta. Tämä puolestaan ehkäisee painonpudotusta ja dehydraatiota. Tämän lupakauden aikana yksikään EAE-mallin eläimestä ei saavuttanut luvalla määritettyä -25 % painonpudotukseen liittyvää humaanin päätepisteen rajaa, mikä lisää tutkimuksilla kerättyä dataa merkittävästi ja toimii parantamisen periaatteen lisäksi myös vähentämisen periaatteen edistämisessä, koska vähemmän eläimiä tarvitsee lopettaa HEP-rajan saavuttamisen vuoksi. Kaikki HEP-rajan saavuttaneet hiiret (3 kpl) lopetettiin pitkälle edenneiden halvausoireiden (oikaisurefleksin puuttuminen) seurauksena, ei painonpudotuksen vuoksi.

15. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Aivojen rakenteelliset ja toiminnalliset muutokset epilepsiassa.	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	epilepsia; aivovamma; biomarkkeri; rotta	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Maailmassa on 60 miljoonaa ja Suomessa 47 000 epilepsiapotila- lasta. Noin 60 %:lla epilepsia aiheutuu aivoja vaurioittavan teki- jän seurauksena, joista yleisimpiä on aivovamma. Epilepsia ke- hittyy kolmessa vaiheessa: aivoja vaurioittava tapahtuma → epilepsian kehittyminen eli epileptogeneesi → toistuvat koh- taukset eli epilepsia ja epilepsian progressio. Kliinisessä käy- tössä ei ole ainoatakaan lääkettä tai muuta hoitoa, jolla epilep- togeneesiä tai epilepsian progressiota voitaisiin estää tai edes lievittää. Tämän hankkeen tarkoituksena on (a) identifioida yk- sittäisen vaikean aivovamman tai toistuvan lievän aivovamman aiheuttaman epileptogeenin molekulaari-, solu- ja hermo- verkkotason mekanismeja, (b) identifioida aivovammasta ai- heutuvan epileptogeenin biomarkkereita ja (e) löytää ja tes- tata uusia hoitoja aivovammasta aiheutuvan epileptogeenin estoon.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi,	Tutkimuksemme identifioi mekanismeja, joiden pohjalta (a) ke- hitämme uusia hoitoja, jotka estävät epilepsian synnyn riskiryh- missä ja epilepsian etenemisen diagnoosin jälkeen sekä (b)	

kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	identifioimme biomarkkereita, joilla voimme ennustaa epilepsian kehittymisen aivovamman jälkeen ja ennustaa/seurata kehittämiemme hoitojen tehoa. Käyttämämme koe-eläinmallin molekyyli- ja solutason muutokset sekä epilepsian fenotyyppi vastaavat verraten hyvin ihmisen post-traumaattista epilepsiaa, mikä vahvistaa tutkimustulosten translationaalista merkitystä.
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Rotta, 1 800
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Ennakoidut haitat: Eläimille aiheutuu haittaa kirurgiasta, aivovamman indusoinnista, annosteluista, kudoksenäytteiden ottamisesta, kuvantamisista ja käyttäytymiskokeista. Seurannan jälkeen eläimet lopetetaan. Vakavuusluokat: Lievä, vakava
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen – Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Olemme käyttäneet primaarisoluviljelmiä sekä leikeviljelmiä, mutta niiden ennustearvo esim. lääkeaineiden hermosoluja suojaavan vaikutuksen suhteen <i>in vivo</i> on rajallinen – vaikkakin soluviljelmät ovat hyvä työkalu molekyylimekanismien tutkimukseen. Epilepsian kehittymistä hermosolutasolla ei voida tutkia ihmisellä, koska hyvää ja edustavaa aivokudosta ei ole saatavissa (esim. aivovamman jälkeen kehittyvää epilepsiaa voidaan seurata vain kliinisin kriteerein). Rotta on sopiva koe-eläin epilepsiatutkimukseen aikaisempien havaintojen pohjalta, jotka osoittavat tautifenotyypin (esim. epilepsia, käyttäytymismuutokset), patologian ja lääkeaineiden tehon samankaltaisuuden rotalla ja ihmisellä.
2. Vähentäminen – Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Pyrimme tutkimaan jokaisen koe-eläimen mahdollisimman tarkkaan (patologia, molekulaarinen analyysi, sähköfysiologia, käyttäytyminen, kuvantaminen) aiheuttamatta yksittäiselle eläimelle liikaa stressiä, mikä merkittävästi vähentää tarvittavien koe-eläinten määrää. Tarvittava koe-eläinmäärä arvioidaan etukäteen Power-analyysillä.
3. Parantaminen – Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a-b) Rotta on sopiva koe-eläin aivovamma- ja epilepsiatutkimukseen aikaisempien havaintojen pohjalta, jotka osoittavat tautifenotyypin, patologian ja lääkeaineiden tehon samankaltaisuuden rotalla ja ihmisellä. Rotan plasmavolyymi on riittävä biomarkeritutkimukseen. Rotan aivojen koko on riittävä translationaaliseen tautipatologian kuvantamiseen. c) Seuraamme koe-eläimiä akuutin vaiheen aikana päivittäin, jotta poikeamiin voidaan puuttua mahdollisimman nopeasti. Huolehdimme kivunpoistosta sekä post-operatiivisesta nesteytyksestä ja ruokavaliosta. Teemme huolellisen painon ja yleistilan seurannan. Totutamme eläimen koeolosuhteisiin koeasetelmasta riippuen, jotta sen kokema stressi varsinaisessa testaus-tilanteessa olisi mahdollisimman alhainen. Tallennamme tulokset digitaaliseen eläinkohtaiseen RedCap databaseen, josta ne ovat nopeasti analysoitavissa. Kokemuksemme mukaan digitaalinen seuranta nopeuttaa eläimelle aiheutuvien haittojen seurantaa, niiden minimointia ja edesauttaa pitkäaikaisseurattutkimusten onnistumista.

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Tavoitteenamme on tunnistaa uusia (a) biomarkkereita (merkkiaineita) ja (b) lääkeaineiden vaikutuksia, joita voidaan hyödyntää aivovammasta aiheutuvan epileptogeneesin (epilepsian kehittymisen) diagnosoinnissa ja hoidossa.

Olemme tunnistaneet ja testanneet useita plasman microRNA- ja proteiini-biomarkkereita. Monet niistä ovat herkkiä tunnistamaan jopa lievän aivovamman (esim. NF-L). Toistaiseksi niistä mikään ei kuitenkaan ole ollut herkkä diagnosoimaan epileptogeneesiä. Olemme myös tutkineet useita MRI-biomarkkeriehdokkaita. Niistä aivoissa thalamuksen muutokset ovat osoittautuneet kohtalaiseksi epileptogeneesin biomarkkereiksi. Aivosähkökäyrästä olemme tunnistaneet N3-REM transitoon liittyvien spindelien lyhentymisen herkäksi biomarkkeriksi post-traumaattiselle epilepsialle. Tehtyjen koe-eläintulosten perusteella on mahdollista testata samoja biomarkkereita potilailla, koska valitut biomarkkerit ilmestyvät myös ihmisellä.

Uusien lääkeainekohteiden etsintä pohjautui aivokudos-transkriptomiikkaan ja bioinformatiikkaan. Olemme testanneet kahta molekyyliä. Ensimmäinen molekyyli ei osoittautunut tehokkaaksi. Toisen molekyylin testaus on analyysivaiheessa. Lääkeainetutkimuksissa käytetyt lääkeaineet ovat ihmisellä toisissa tarkoituksissa käytettyjä pienmolekyyliä, joten myös niistä saatavat tulokset voidaan potentiaalisesti varmistaa potilastutkimuksissa. Kaikki tulokset on julkaistu (tullaan julkaisemaan) open-access tieteellisissä julkaisuissa, myös negatiiviset tulokset.

Todelliset haittavaikutukset:

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Rotat (<i>Rattus norvegicus</i>)	0	19	43	389

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Käytettyjen eläinten määrä oli huomattavasti pienempi kuin ennakolta voimalaskelmien perusteella oli arvioitu. Tämä johtui kahdesta syystä. (1) Korona-pandemian aikana koe-eläinten käyttö jatkui ainoastaan jo meneillään olevien koesarjojen osalta. Siksi osa suunnitelluista koesarjoista ei toteutunut. (2) Eläinten käyttömääriä on myös saatu vähennettyä ottamalla käyttöön ns. Somnosuite anestesia-aita, jonka avulla anestesian tasoa on helppo kontrolloida. Lisäksi olemme vuosien kuluessa systemaattisesti kehittäneet post-operatiivista hoitoa (hapetus, kivunhoito, kehon lämpötila, nesteytys, ruuan saanti). Toimenpiteiden ansiosta esimerkiksi aivovammaan liittyvä akuutti, kirurgian aikana tapahtunut kuolleisuus on pudonnut 25–30%; sta n. 10-15%:iin ja seuranta-ajan kuolleisuus (eläimet lopetettu kriteerien perusteella) 25%:sta alle 10 %:iin.

Vakavuusluokat vastaavat arvioita. Vakavin haitta on nestepulssimallilla aiheutettu vakava aivovamma, johon kliinisen määritelmän mukaan liittyy pitempikkestoinen tajuttomuus ja siksi tarve viitaalitoimintojen ylläpidolle. Kuten ihmisen vastaavassa aivovammassa, eläinmallissa havaitaan myös aivoverenvuotoa ja mahdollinen aivopaineen nousu. Aivovammaan liittyvä kuolleisuus tapahtuu tyypillisesti n. 15 minuutin sisällä aivovamman indusoinnista, siksi akuutti post-operatiivinen hoito (erityisesti hapetus) on kriittinen toimenpide selviytymisen kannalta. Lisäksi kipulääkitys annetaan välittömästi aivovamman indusoinnin jälkeen. Pidennetyn anestesian ja lisäoperaatioiden ei ole havaittu lisäävän kuolleisuutta. Vakavuusasteeseen vaikuttaa myös eläinten pitkäaikainen monitorointi yksittäishäkeissä. Yksittäishäkkien käyttö on välttämätöntä, jotta vapaasti liikkuvan eläimen EEG-monitoroinnin vaatimat kaapelit eivät sotkeudu ja niiden kallokiinnitys irtoa.

Tekemiemme laaja-alaisten käyttäytymistutkimusten perusteella, eläimillä ei ole havaittu merkittäviä muutoksia ahdistuneisuus- tai masennustesteissä tai motoriikassa.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

Aivokudoksen molekulaarista analyysiä ja bioinformatiikkaa hyödyntämällä voidaan monien lääkeaineiden hoitavaa ja/tai haitallista vaikutusta ennakoida in silico (tietokonemalleilla), jolloin niiden testaamisen tarve rottamallissa vähenee.

Vähentäminen

Tutkimme jokaisen koe-eläimen mahdollisimman tarkkaan (patologia, molekulaarinen analyysi, sähköfysiologia, käyttäytyminen, kuvantaminen) aiheuttamatta yksittäiselle eläimelle liikaa stressiä, mikä merkittävästi vähentää tarvittavien koe-eläinten määrää. Vuosien varrella omaksumamme post-operatiivinen hoito on vähentänyt merkittävästi kuolleisuutta.

Tallennamme kokeiden tiedot, eläinten seuranta mukaan lukien, digitaaliseen eläinkohtaiseen elektroniseen tietokantaan, josta ne ovat nopeasti analysoitavissa. Kokemuksemme mukaan digitaalinen seuranta nopeuttaa eläimelle aiheutuvien haittojen seurantaa, niiden minimointia ja edesauttaa pitkäaikaisseurantatutkimusten onnistumista.

Parantaminen

Aivovamman indusoinnin aikainen operatiivinen toiminta: (a) Aivovamman indusoi sama kokenut henkilö, jolloin toimenpiteen kesto minimoituu. (b) Anestesiassa käytetään Somnosuite -laitetta, jolloin anestesian taso on helposti kontrolloitavissa. Aivovamman indusoinnin jälkeinen akuutti toiminta: (a) Hapetus ilmateiden avaamisella (kielen vetäminen suupieleen, lisähappi). (b) Kipulääkitys välittömästi aivovamman indusoinnin jälkeen. (c) Kehon lämpötilan ylläpito lämpömatolla, nahkan alainen nesteytys tyypillisesti 3 pv ajan, pehmeän erityisruuan esille laitto. Post-operatiivinen toiminta: Aivovammaa saattaa seurata painonlasku, mutta eläimet toipuvat 3–4 leikkauksen jälkeisestä päivästä alkaen ja ovat jokseenkin verrokkien tasolla kahden viikon kuluessa. Olemme tehneet systemaattisia analyyskejä painonkehityksestä yhdessä kansainvälisten yhteistyökumppanimme kanssa. Painonpudotus on harvoin lopettamisindikaatio nykyisellä postoperatiivisella hoidolla. Tutkimuksen lopussa eläinten yleiskunto on hyvä, koska poistamme huonokuntoiset eläimet mahdollisimman nopeasti: paitsi humaanisyydestä, myös siksi, etteivät ne aiheuta poikkeamia tutkimuksessa.

Malliin liittyy vakavia haittoja, mutta uudistuneiden käytäntöjen ansiosta niiden aiheuttama eläinten poistuma koesarjoista on vähäisempää kuin ennakoitiin ja siksi koe-eläinten määrää on voitu pienentää. Koe-eläinmalli on edelleenkin välttämätön apuväline tässä tutkimuksessa, koska aivovammasta aiheutuva epilepsia on ns. hermoverkkosairaus, eikä sitä voi luotettavasti mallintaa muulla tavoin. Tulevaisuudessa entistä monipuolisempi eri parametrien digitaalinen kirjanpito ja sen mahdollistama eläimen pitkäaikaiselvytytymistä ennustavien laskennallisten indeksien käyttöönotto voisivat olla yksi työkalu seurattavan eläinkohortin optimointiin paitsi yhden laboratorion sisällä, myös laboratorioden välillä.

Muuta

Toimimme aktiivisesti kansainvälisissä työryhmissä, jotka kehittävät prekliinistä metodologiaa biomarkeri- ja lääkeainetutkimukseen. Raportit julkaistaan kansainvälisissä julkaisuissa ja ovat kaikkien saatavilla.

16. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Lääkeaineiden tehon testaaminen ASAurian ja sitrullinemian prekliinisissä prekliinisissä eläinmalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	prekliininen lääkeainetutkimus, arginiinimeripihkahappovirtsaisuus, sitrullinemia	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	ASAuria (arginiinimeripihkahappovirtsaisuus) ja sitrullinemia ovat harvinaisia ureasyklin entsyymipuutoksia. Näissä sairauksissa maksassa typen ja ammoniakkin käsittelyssä on entsyymivajeesta johtuva häiriö, joka johtaa liiallisen proteiinien saannin yhteydessä veren ammoniakkipitoisuuden nousuun. Oireet alkavat varhain oireilevassa muodossa jo vastasyntyneen ollessa muutaman päivän ikäinen. Vastasyntynyt muuttuu veltoksi ja huonokuntoiseksi sekä alkaa oksennella. Usein tarvitaan hengityskonehoitoa. Plasman ammoniakkipitoisuus on tyypillisesti koholla ja pään kuvantamisessa voidaan havaita aivoödeeman eli turvotuksen merkkejä. ASAuria ja sitrullinemia tunnistetaan vastasyntyneiden seulonnassa veren korkean sitrulliinipitoisuuden perusteella ja taudin diagnoosi varmistetaan määrittämällä laskimoverinäytteestä sitrulliinin ja arginiinimeripihkahapon pitoisuudet. Akuutissa tilanteessa tarvitaan proteiinirajoitusta, ammoniakkipitoisuutta alentavaa natriumbentsoaatti- ja arginiinilääkitystä sekä joskus jopa dialyysihoitoa. Pitkäaikaishoito perustuu ravinnon proteiinirajoitukseen sekä ammoniakia alentavien lääkkeiden käyttöön. Sairauksiin ei ole olemassa tehokasta lääkehoitoa. Jos sairaus todetaan ennen oireiden kehittymistä, ennuste on hyvä, mutta jo vastasyntyneinä oireilevien potilaiden ennuste saattaa hoidosta huolimatta olla huono. Yritys tarjoaa lääkekehitysteollisuudelle <i>in vivo</i> -eläinmalleja lupaavien lääkeaineiden prekliiniseen testaukseen. Tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä klinisiin kokeisiin.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötystä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja ASaurian ja sitrullinemian hoitoon. Tutkimusmallien käyttö edistää myös ASaurian ja sitrullinemian mekanismien tutkimista, mikä edesauttaa uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 2672 eläintä	

Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Geenimuunnelluilla hiirillä esiintyy karvankasvun häiriöitä, aineenvaihdunnan ja neurologisia oireita, pienikasvuisuutta ja ennenaikaista kuolleisuutta sekä motoriikkaan ja koordinaatioon häiriöitä. Haittaa aiheutuu myös tutkittavien aineiden toistuvista annosteluista ja verinäytteenotosta. Tutkimuksen päätteeksi eläimet lopetetaan. Vakavuusluokat: vakava
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	<i>In vitro</i> -mallit ASAurian ja sitrullinemian tutkimiseksi ovat hyvin rajalliset. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä kokeita.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Koeasetelmat ovat standardoituja ja niiden käytön pohjana on perusteellinen mallien validointityö. Validointityöllä varmistetaan, että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ja antaa oikeanlaisen tautivasteen. Koeasetelmissa ryhmän sisäinen variaatio minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määrittelee tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi). Hankkeessa käytettävät ASAurian ja sitrullinemian mallit ovat kirjallisuudessa hyvin kuvattuja ja siksi hyvin ennustettavia.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Suurin osa ASAurian ja sitrullinemian eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä. Käytettävät eläinmallit ovat eri geenien poistotai muuntogeenisiä hiirikantoja. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille hyvin rajallisille lääkkeille ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Haittaa pyritään minimoimaan eläinten huolellisella seurannalla, ravinnon saatavuutta ja syömistä helpottamalla ja mahdollisimman aikaisilla lopetuskriteereillä.

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja ASAurian ja sitrullinemian hoitoon. Tavoitteena oli myös edistää ASAurian ja sitrullinemian mekanismien tutkimista, mikä edesauttaisi uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä. Lääkekokeiden avulla pyrittiin selvittämään tutkittavien lääkeaineiden vaikutusta taudin patologian ja oireiden kehittymiseen eläinmalleissa.

Hankkeessa käytetyt eläinmallit toimivat odotetusti ja antoivat luotettavaa tietoa lääkeaineiden tehokkuudesta. Tätä takautuvaa arviota laadittaessa ei ole tiedossa, että tutkittavia lääkeaineita olisi edennyt lääkekehityksen seuraaviin vaiheisiin.

Todelliset haittavaikutukset:

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (<i>Mus musculus</i>)	50	852	134	25

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Tutkimuksessa käytettiin 1061 hiirtä (ennakoitu määrä 2672 kpl). Käytetyt eläimet jakaantuivat seuraavasti: 5 % luokassa ei toipumista, 80 % luokassa lievä, 13 % luokassa kohtalainen ja 2 % luokassa vakava.

Käytettyjen eläinten määrä oli n. 40 % suunnitellusta käytöstä. Käytön tarve riippuu asiakkaiden tarpeista, eli kuinka monta tilaustutkimusta saadaan tehtäväksi.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

ASAuria ja sitrullinemia ovat harvinaisia ureasyklin entsyymipuutoksia, joissa maksan typen ja ammoniakkin käsittelyssä on entsyymivajeesta johtuva häiriö, joka johtaa liiallisen proteiinin saannin yhteydessä veren ammoniakkipitoisuuden nousuun. Tautimallin kehittyminen vaatii siis useamman eri elinkokonaisuuden yhteisvaikutuksia, jolloin *in vitro*-mallit ASaurian ja sitrullinemian kertymäsairauksien tutkimiseksi ovat hyvin rajalliset. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä kokeita. Alemmilla selkärangaisilla tai *in vitro*-menetelmillä ei saavuteta samanlaista tietoa uusien lääkeaineiden tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole standardoituja, eivätkä yleisesti hyväksytyjä tai käytettyjä.

Vähentäminen

Koeasetelmat ovat standardoituja ja niiden käytön pohjana on perusteellinen mallien validointityö. Validointityön avulla varmistetaan, että koe-eläinmalli käyttäytyy odotettavasti ja antaa oikeanlaisen tautivasteen. Ryhmäkokoja määritettäessä käytetään avuksi voima-analyysiä.

Parantaminen

Lautakunta edellytti takautuvassa arvioinnissa kerrottavan, kuinka moni eläin jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella. Lisäksi edellytettiin tarkasteltavan, olisiko ALS-mallin mukaisia lopetuskriteereitä mahdollista aikaistaa mallin siitä kärsimättä.

Lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 13 hiirtä ja kuolleena löydettiin 25 hiirtä. ALS-mallin mukaisia lopetuskriteereitä ei päädytty soveltamaan lopetuspäätöstä tehtäessä, sillä lopetussyynä ei ollut halvaantuminen, vaan esimerkiksi hiirissä havaitut kehityshäiriöt tai yleiskunnon heikkeneminen ilman vakavia motorisia oireita.

Hankeluvan aikana laitoksella on otettu käyttöön hyvinvoinnin pisteytystaulukko avustamaan lopetuskriteereitä määritettäessä. Henkilöstön koulutusta on yhtenäistetty siten, että eläinten kanssa työskentelevillä henkilöillä on yhtenäisempi tulkinta lopetuskriteereistä. Hiirille tarjottiin lipsumaton kuivike sekä pehmeä ja lyhytkuituinen pesämateriaali. Juomapulloissa käytettiin pitkiä nippoja ja häkin pohjalla oli tarjolla rehua, mössöä ja geeliä. Painon kehitystä seurattiin päivittäin kolmen viikon iästä alkaen, ja tarvittaessa hiiret nesteytettiin. Osassa kokeista käytössä oli aikaisempi päätepiste, ja hiiret lopetettiin ennen kuin vakavia oireita kehittyi.

Muuta

Toiminnanharjoittaja osallistuu aktiivisesti eläinten hyvinvoinnin toiminnan kehittämiseen niin laitoksen sisäisessä toiminnassa kuin osana kansainvälistä yritystä ja esittää hyvinvointityöhön liittyviä tuloksia eri tilaisuuksissa.

17. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ			
Hankkeen nimi	Sydämen solujen toimintaa ja solukuolemaa säätelevät signaalointireitit		
Hankeluvan kesto	3 vuotta		
Avainsanat (enintään 5)	Sydän, liikakasvu, signaointi, sydämen vajaatoiminta, solukuolema		
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä	Ei
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Kyllä	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Kyllä	Ei
	Lajien säilyttäminen	Kyllä	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Kyllä	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Kyllä	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Sydäninfarktin hoito on selvästi nopeutunut viime vuosien aikana, mutta terapioiden teho verenkiertoelinten sairauksille on ollut riittämätön. Sydänlihaksen iskemian seurauksena osa sydänlihaksesta menee kuolioon ja korvautuu ajan myötä sidekudoksella. Terveenä säilyneen sydämen lisääntynyt seinämäkuormitus aiheuttaa sydänlihassolujen liikakasvua ja voi myös johtaa sydämen sidekudoksen (fibroosin) lisääntymiseen ja sydämen vajaatoimintaan. Myös muut sydänkuormitusta aiheuttavat tilat, kuten korkea verenpaine, voivat johtaa sydämen vajaatoimintaan, etenkin metabolisten lisätekijöiden kanssa. Tällä hetkellä sydämen vajaatoimintaan käytössä olevat terapiat vähentävät sydämen kuormitusta riippumatta taudin syistä. Olisi- kin tärkeä pystyä identifioimaan sydämen hypertrofian, fibroosin ja vajaatoiminnan syntymisen kannalta keskeiset signaalin- siirtoreitit, jotta niihin voitaisiin kehittää tehokkaampia lääke- hoitoja.		
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tämän eläinkokeen tarkoitus on identifioida uusia lääkevaikutuksen kohteita, joihin vaikuttamalla voitaisiin lievittää sydänkudoksen vauriota sydäninfarktissa ja muissa sydämen stressitilanteissa sekä estää sydämen fibroosin ja vajaatoiminnan kehittyminen. Hiirille indusoidaan sydämen vasemman kammion toiminnan heikkenemistä ja fibroosia kokeellisen sydäninfarktin, poikittaisen aortan ahtauttamisen, angiotensiini II-infuusion, metabolisen ja hypertensiivisen stressin, alkoholin tai solukuolemaa aiheuttavien syöpälääkkeiden avulla.		
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 3640, rotta 564		
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Hiirille ja rotille voi aiheutua tutkimuksessa haittaa sydänkirurgiasta tai ei-invasiivisesta sydäntautimallin tuotosta, geeninsiir- rosta, tamoksifeenin annosta, tutkittavien aineiden annosta ja ultraäänitutkimuksista. Sydänsairausmallista aiheutuu sydämen toiminnan ohimenevä tai pysyvä heikkeneminen. Eläimet lopetetaan kokeen päättyessä.		

	Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava		
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs			
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää patologisen sydämen vajaatoiminnan kehittymiseen vaikuttavia signaalintimekanismeja ja spesifisten signaalintireittien ja kasvutekijöiden muokauksen vaikutusta niihin. Siksi ongelman tarkasteluun tarvitaan kokonainen, toimiva elimistö. Soluviljelymalleja käytetään täydentävänä menetelmänä soveltuvin osin. Ne kuvastavat kuitenkin tilannetta vain eristetyssä solussa tai sydämessä, eikä vaikutuksia koko verenkiertoelimistön kannalta voida selvittää.		
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Koesarjoihin valitaan optimaalinen määrä eläimiä tutkimuksen luotettavuuden takaamiseksi. Kokeeseen käytettävien eläinten lukumäärä rajataan mahdollisimman pieneksi. Määritämme samoista sydäntautihiiristä myös muita kudoksenäytteitä rinnakkaisiin tutkimuskysymyksiin.		
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Hiiri- ja rottamalleilla suoritettut tutkimukset ovat vertailukelpoisia erilaisilla poisto- tai siirtogeenisillä eläimillä suoritettujen tutkimusten kanssa. b) Hiiri on kokonsa ja elinikänsä puolesta paras vaihtoehto tämän tyyppisiin perustutkimuksen kokeisiin. Rotan etuna hiireen verrattuna on tarkempi sydämen toiminnan ja rakenteen analyysi sydämen kaikukuvantamisen avulla. c) Nukutus- ja kivunpoistomenetelmät on suunniteltu mahdollisimman hyvin toimenpide huomioon ottaen. Eläinten hyvinvointia seurataan tiheästi paitsi koe-eläinhoitajien, myös tutkijoiden toimesta. Yleensä jo ensimmäisen toimenpiteen jälkeisen vuorokauden aikana näkee, miten eläin toipuu toimenpiteestä. Tutkimusryhmällämme on runsaasti kokemusta näistä toimenpiteistä rotilla ja hiirillä.		
ELLA täyttää: Tehdäänkö hankkeesta takautuva arviointi?	KYLLÄ		
	X		

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Tavoitteiden saavuttaminen

Tämän eläinkokeen tavoitteena oli selvittää signaalireittejä, joiden säätelyyn vaikuttamalla voitaisiin lievittää sydänkudoksen vauriota sydämen painekuormituksessa. Hiirille aiheutettiin sydämen vasemman kammion toiminnan heikkenemistä ja fibroosia joko poikittaisen aortan ahtauttamisella tai angiotensiini II-infusiolla. Diastolisen sydämen vajaatoiminnan aiheuttamiseksi hiirille annettiin tietyissä kokeissa myös rasvaruokaa. Olemme kyseisiä malleja sekä soluviljelymenetelmiä hyödyntäen tunnistaneet useita signaalinvälitysreittejä, jotka osallistuvat sydänvaurioiden kehittymiseen eri soluissa. Olemme myös kokeellisesti muokanneet näiden signaalireittien toimintaa sydänkudoksen vaurion vähentämiseksi, esimerkiksi farmakologisilla hoidoilla tai muuntogeenisiä eläimiä hyödyntäen. Käytetyt eläinmallit ovat kirjallisuuden ja kokemamme perusteella sopivin olemassa olevista malleista tutkimaan kyseisiä sydänmuutoksia.

Selvitettäessä patologisen sydämen vajaatoiminnan kehittymiseen vaikuttavia signaalintimekanismeja ja niiden muokkauksen vaikutusta, ongelman tarkasteluun tarvitaan kokonainen, toimiva elimistö. Hiiri- ja rottamalleilla voimme hyödyntää signaalireittien tutkimisessa poisto- tai siirtogeenisiä eläimiä, ja tulokset ovat vertailukelpoisia muiden geenimuunnelluilla hiiri- tai rottamalleilla tehtyjen tutkimusten kanssa. Käytämme osin perinteisiä menetelmiä sekä vähemmän haitallisia malleja. Olemme esimerkiksi tutkineet, voiko painekuormituskokeet korvata farmakologisin menetelmin. Kokeiden tuloksia on menossa tutkimusjulkaisuihin, tällä hetkellä yksi työ on lehdessä arvioitavana (aktiviinit sydämen painekuormituksessa) ja neljä työtä käsikirjoitusvaiheessa (CIP2A, CTGF ja Galnt2 painekuormituksessa, aktiviinit verisuonten säätelijänä).

Todelliset haittavaikutukset:

	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (Mus musculus)	2	101	215	155
Rotat (Rattus Norvegicus)	0	45	0	0

Miten hyvin käytettyjen eläinten määrä ja haittojen todellinen vakavuus vastaavat ennakoituja määriä ja vakavuusluokkia?

Teimme suunniteltua vähemmän kokeita, eikä infarktikoikeita, syöpälääkekokeita tai alkoholialtistusta tehty tässä periodissa lainkaan. Käytetyt eläinmäärät ovat siten huomattavasti suunniteltua pienemmät. Kirurgisella operaatiolla tehty painekuormitus on aiemmin arvioitu aina lähtökohtaisesti vakavaksi (hankkeen vakavimman luokituksen mukaan), mutta koska eläimet yleensä toipuvat operoinnista normaalikuntoisiksi, näille eläimille aiheutuva haitta on kohtalainen. Aiemmasta käytännöstä johtuen vakava-luokkaan on kirjautunut 155 hiirtä, mutta näistä suuri osa kuuluisi kohtalainen-luokkaan.

Sydämen kirurgisista operaatioista (aorttaa kaventava painekuormitusmalli) aiheutuu huomattava sydämen toiminnan heikkeneminen ja ääritapauksissa äkkikuolema. Sydämen ultraäänitutkimuksella voidaan havaita selkeä sydämen pumppaustoiminnan heikentyminen. Operoidut hiiret toipuvat toimenpiteestä nopeasti ja ovat pääsääntöisesti ulkoisesti aktiivisia ja hyvinvoivia (kohtalainen haitta). Osalla kuitenkin ilmenee palautumatonta heikkoutta tai toimenpiteestä johtuvaa kuolleisuutta (vakava haitta, yleensä heikkous tai hengenahdistus ovat myös lopetuskriteereitä).

Muutamia kirurgisesti operoituja hiiristä kuoli joko anestesiassa operaatiosta aiheutuvaan verenvuotoon tai hengityskomplikaatioihin, muutaman päivän kuluttua operaatiosta sydämen rytmihäiriön vuoksi äkillisesti, tai sydämen/keuhkotoiminnan äkilliseen lamaantumiseen. Eri hiirikannoilla ilmenee erilaisia painekuormituksen vasteita ja käytämme eri hiirikantoja mekanismien tutkimiseksi. Haittana on se, että BalbC-kannan hiiret ovat hyvin herkkiä sydänmalleista aiheutuville keuhkokomplikaatioille. Osa kokeissa olevien hiirten ongelmista on äkillisiä ilman ennakkoaroitusta ilmeneviä, mutta osa oireista voidaan tunnistaa, jolloin hiiret voidaan lopettaa oireiden perusteella. Koetoimenpiteiden seurauksena kuolleita eläimiä oli 29 hiirtä, joista 10 BalbC-kantaa (noin 1 vuoden ikäisiä), ja näistä viisi oli vakavuudeltaan lievä-kohtalainen, loput vakava-luokkaa. Koetoimenpiteen aiheuttaman hyvinvointiongelman takia lopetetut eläimet 21 hiirtä, joista 14 BalbC-kantaa (nuoria ja 1-vuoden ikäisiä), ja joista neljä kohtalainen-, loput vakava-luokkaa.

Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskevien toimien toteuttamista:

Korvaaminen

Sydänlihasvaurion ja sydämen vajaatoiminnan kehittymiseen sekä sydämen fysiologiseen kasvuun vaikuttavat solujen fyysinen kuormitus kuten venytys, autonominen hermosto sekä kiertävät

humoraaliset tekijät. Ne aiheuttavat muutoksia sydänlihassolujen, sydämen sidekudossolujen, endoteelisolujen sekä tietyissä tilanteissa tulehdussolujen toimintaan. Joissain tilanteissa solumallit soveltuvat yksinkertaisten kysymysten selvittämiseen, mutta tässä tutkittavien ilmiöiden tutkiminen vaatii kokonaisen elimistön.

Ei-kirurgisiin sydäntautimalleihin liittyy pienempi kuolleisuus, mutta nämä mallintavat erilaista kudospatologiaa, joten ne eivät suoraan voi korvata kirurgista menetelmää. Hyödynnämme myös farmakologista painekuormitusmallia. Olemme käyttäneet myös täydentävää ei-kirurgista sydänsairausmallia (rasvaruoka ja verenpainetta kohottavan aineen anto juomavedessä) etenkin tutkittaessa metabolisen syndrooman osallisuutta sydämen vajaatoiminnassa. C57BL6-hiirillä tämä malli aiheuttaa vähemmän ja lievempiä hyvinvointiongelmia, joskin indusoitu sydänsairauskin on pienempi eikä sovellu kaikkien hoitojen tutkimiseen. Käytämme myös soluviljelykokeita täydentävinä malleina.

Vähentäminen

Koesarjoihin valitaan optimaalinen määrä eläimiä tutkimuksen luotettavuuden takaamiseksi. Kokeeseen käytettävien eläinten lukumäärä rajataan mahdollisimman pieneksi. Vakiintuneissa malleissa voimalaskelmien käyttö tarvittavan eläinmäärän valintaan on mahdollista.

Osa näytteistä saadaan yhteistyöstä toisen laboratorion kanssa, jotka tutkivat muita kudoksia malleissa, jotka aiheuttavat myös mahdollisia sydänmuutoksia. Omissa kokeissa muutosten tutkiminen myös muissa kudoksissa lisää tutkimustulosten hyödynnettävyyttä ja validiutta.

Eläinten totuttaminen käsittelystressin vähentämiseksi todennäköisesti vähentää tarvittavien eläinten määrää ja parantaa tutkimusten luotettavuutta. Hiiret ovat hyvin rauhallisia ja yhteistyökykyisiä muutaman käsittelykerran ja positiivisen palkitsemisen jälkeen.

Osassa kokeita käytetään uros- ja naarashiiriä. Viimeisimmän tiedon mukaan kokeisiin voisi käyttää molempia sukupuolia nostamatta kokeeseen käytettävää eläinmäärää, mutta emme ole vielä validoineet kyseistä menetelmää ja tilastollisen analyysin käytettävyyttä ko. koejärjestelyssä.

Emme toteuttaneet kaikkia suunniteltuja kokeita, josta johtuen käytettyjen eläinten määrät olivat arvioitua pienemmät.

Parantaminen

Tutkimme tiettyjä sydänmuutoksia varhaisessa vaiheessa patogeneesia, jolloin lopetuspiste on aiemmin, mikä vähentää eläimille aiheutuvaa haittaa.

Hiirten totuttaminen käsittelyyn vähentää niiden kokemaa käsittelystressiä. Tämän vaikutusta kuolleisuuteen on vaikea arvioida, sillä emme tehneet infarktikokeita missä käsittelystressin vaikutus todennäköisesti näkyisi selvimmin (akuutti stressi voinee lisätä infarktin ruptuuraa tai äkillisiä rytmihäiriöitä).

Eläinten toimenpiteiden jälkeen tehostettu hoito (lämpöhuone, nesteytys tarvittaessa ja normaali kipulääkitys) parantaa eläinten vointia ja saattaa parantaa myös selviämistä. Kipulääkityksen voi antaa myös juomavedessä tai pähkinävoissa mikä vähentää käsittelyn ja pistosten tarvetta.

Käytetyt eläinmallit ovat edelleen tarkoituksenmukaisimpia. Haasteita tutkimukseen tuo se, että kirjallisuudessa käytetyt mallit eivät ole välttämättä riittävän tarkasti kuvattuja eikä mahdollisia hyvinvointiongelmia ja niiden ratkaisuja esitetä lainkaan. Yleensä ottaen hiirten vointia ei kuvata tutkimuksissa, esim. esiintyykö tiheää hengitystä, takykardiaa, epänormaalia käytöstä tai tarvetta tehostetulle hoidolle, missä vaiheessa ja kuinka kauan. Myös hiirikantojen tai hiiripopulaatioiden välillä on eroja, eikä samanlaisia vasteita välttämättä saada vaikka käytetään samaa kantaa kuin aiemmin julkaistuissa töissä. Hiirten nostotavan voisi mainita tutkimusjulkaisuissa, hännästä nostaminen lisää stressiä ja voi vaikuttaa etenkin sydänmallien vasteisiin. Samoin mahdolliset eläinpopulaatioissa ilmenevät infektiot.

Muuta

Pyrimme mahdollisuuksien mukaan ilmoittamaan julkaisuissa kokeiden menetelmätiedot tarkasti ja mainitsemaan kokeeseen oleellisesti vaikuttavat asiat. Kuvatun menetelmän tulisi olla käyttökel-poinen sellaisenaan ja menetelmällä saatujen vasteiden samanlaisia, ellei hiirikannoista aiheudu eroja.