

## 2021–2022 YLEISTAJUISET TIIVISTELMÄT JA TAKAUTUVAT ARVIOINNIT TUTKIMUSHANKKEISTA, JOISTA LAUTAKUNTA ON MÄÄRÄNNYT ARVIOIN- NIN TEHTÄVÄKSI HANKKEEN PÄÄTYTTYÄ

Hankkeet on hyväksytty vuosina 2017–2018. Takautuva arviointi tehdään hankkeen päätyttyä. Jos hanke on saanut luvallensa jatkoaikaa, arviointi tehdään tämän päätyttyä.

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
<b>Hankkeen nimi</b>	Lääkeaineiden tehon testaaminen Huntingtonin taudin prekliinissä tautimalleissa	
<b>Hankeluvan kesto</b>	3 vuotta	
<b>Avainsanat</b>	Huntingtonin tauti, lääketutkimus, prekliininen	
<b>Hankkeen tarkoitus</b>	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
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	Huntingtonin taudin hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lääke- aineita. Huntingtonin tauti aiheuttaa potilaille ja heidän omaisil- leen kärsimystä ja taudeista koituu yhteiskunnalle huomattavia kustannuksia. Yritys tarjoaa lääkekehitys-teollisuudelle in vivo - eläinmalleja lupaavien lääkeaineiden prekliiniseen testaukseen. Tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden ete- nemistä klinisiin kokeisiin.	
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)</b>	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja Hun- tingtonin tautiin. Tutkimusmallien käyttö edistää myös Hunting- tonin taudin mekanismien tutkimista, mikä edesauttaa uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.	
<b>Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät</b>	Hiiri, 13 620 eläintä	
<b>Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b>	Osa eläimistä, lähinnä R6/2 kantaa olevat hiiret tulevat kärsi- mään geenimutaation aiheuttamista oireista, jotka voivat olla voimakkaita. Haittaa aiheutuu myös tutkittavien aineiden tois- tuvista annosteluista, mahdollisista kirurgista menetelmistä, ve- rinäytteenotosta, käyttäytymistesteistä sekä kuvantamisesta. Tutkimuksen päätteeksi eläimet lopetetaan.  <b>Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava</b>	
<b>3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b>		
<b>1. Korvaaminen - Replacement</b> <b>Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi kor- vaavaa menetelmää ei voi käyt- tää?</b>	<b>1. Replacement</b> In vitro-mallit Huntingtonin taudin tutkimiseksi ovat hyvin rajal- liset johtuen taudin moniuloitteisuudesta, käsittäen sekä peri- feerisen että keskushermostoon liittyvän patologian. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta ja turvallisuutta voidaan	

	tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä ko-keita. Myöskään tietokonepohjaiset simulaatiot Huntingtonin taudin tutkimuksessa eivät ole mahdollisia johtuen taudin me-kanismien monimutkaisuudesta.
<b>2. Vähentäminen - Reduction</b> <b>Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</b>	<b>2. Reduction</b> 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) ja joka määrittää koe-eläinten käytön määrän kussakin koeasetelmassa. Perusteellisen validaatiotyön ja tilastollisen voima-analyysin perusteella voidaan luotettavasti ennustaa soveltuvat ryhmäkoot, jotka minimoivat eläinten käytön alimpaan mahdolliseen ilman että koeasetelman tilastollinen voima vaarantuu.
<b>3. Parantaminen - Refinement</b> <b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b> <b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b> <b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b>	<b>3. Refinement</b> Suurin osa Huntingtonin taudin eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä, etenkin hiirissä. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille lääkkeille ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Alemmilla selkärankaisilla tai in vitro-menetelmien ei voida saada samanlaista tietoa uusien lääkeaineiden tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole standardoituja 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.
<b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b>	KYLLÄ

## TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

### Lääkeaineiden tehon testaaminen Huntingtonin taudin prekliinisissä tautimalleissa

#### Takautuvan arvioinnin perusteet

- X Sisältää vakavia toimenpiteitä
- Käytetään apinoita
- Muu peruste

#### Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli edesauttaa potentiaalisten Huntingtonin taudin lääkeaineiden etene- mistä kliinisiin kokeisiin. Käytetyt eläinmallit toimivat odotetusti ja antoivat luotettavia tuloksia lääkeaineiden tehokkuudesta. Tutkimusmallien käyttö edisti myös omalta osaltaan tietoutta Hun- tingtonin taudin mekanismeista, mikä edesauttaa jatkossa uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuoto- jen kehittämistä.

Lupa oli haettu 4 eri osahankkeelle, joista ainoastaan yhdelle oli tarvetta (Tehotutkimus, farmako- kineettinen ja MTD-tutkimus), jossa tutkittiin lääkeaineiden vaikutusta hiirten käyttäytymiseen, motorisiin toimintoihin, sekä aivojen rakenteisiin ja toimintaan.

**Todelliset haittavaikutukset: eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan**

-	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (Mus musculus) [A1]	79	5947	1640	611
Rotat (Rattus norvegicus) [A2]	0	259	0	33

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

Koska kaikki luvassa ennakoitujen osahankkeet eivät toteutuneet, käytettyjen eläinten määrä oli vähäisempi kuin mitä ennakoitiin.

Geenimuunnoksesta aiheutuva haitta oli mukana kaikissa kokeissa. Tautimallin vakavuusaste riippui käytettävästä transgeenisestä hiirikannasta ja eläimen iästä. R6/2-kannan yli 14 viikon ikään eläneet eläimet on luokiteltu luokkaan 'vakava', johtuen kannan vakavasta fenotyypistä tuon iän jälkeen (painonlasku, liikeaktiivisuuden lasku, lisääntynyt kuolleisuus). Kaikki muut R6/2-kokeet, jotka päättyivät 14 ikäviikkoon mennessä tai olivat maltillisemmin etenevää tautimallia (esim. Q175-kanta, BAC HD-kanta), olivat vakavuusluokaltaan lieviä tai kohtalaisia, lukuun ottamatta tutkimusaineen aiheuttamia odottamattomia haittavaikutuksia joidenkin eläinten kohdalla. Tämä selittää sen, että kokeista suurimman osan haittaluokitus oli korkeintaan kohtalainen eikä vakava kuten alun perin oli arvioitu.

**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**

Ei ole pystytty määrittämään.

**Vähentäminen**

Tutkimusmenetelmiä pyritään kehittämään niin, että menetelmät takaisivat tilastollisen voiman pienemmällä ryhmäkoolla. Joitakin tällaisia uusia menetelmiä onkin saatu kehitettyä. Esim. hienomotoriikkatestin avulla saadaan pienemmällä ryhmäkoolla tilastollisesti merkitsevä mallivaikutus (esim. ero villityypin ja muuntogeenisen hiiren välillä). HD-malleissa, esim. eniten käytetyissä Q175- ja R6/2-hiirissä on kuitenkin yleisesti ottaen melko suuri hajonta hiirien välillä, minkä vuoksi ryhmäkoon pienentäminen useissa lääketutkimusten koasetelmissä on hankalaa, jotta lääkkeen mahdollisten tilastollisesti merkitsevien positiivisten tai negatiivisten vaikutusten esille saaminen on mahdollista.

**Parantaminen**

HD-malleja käyttävissä tutkimuksissa kertyvien tulosten perusteella tilastollisesti riittävän voiman takaavaa eläinryhmän lukumäärää arvioidaan usein.

Lautakunta edellytti takautuvassa arvioinnissa annettavan selvitys siitä, kuinka moni eläin jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella, oliko tutkimuksessa mahdollista aikaistaa tieteellistä lopetuspistettä eläimen kannalta vähemmän haittaa aiheuttavaan ja millaista refinementia tutkimuksen aikana löydettiin:

Lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 237 eläintä. Kuolleena löydettiin 269 eläintä.

Huomiota on kiinnitetty lisälämmön antamiseen operoinnin jälkeen sekä lopetuspisteiden aikaistamiseen.

Hyvinvointi-pisteytys on otettu viime kuukausien aikana mukaan vakavan luokituksen R6/2-hiiritutkimuksiin. Pisteytyksen toivotaan antavan mahdollisuuksia ennakoida hiirien kuolema etukäteen aiemmin, jo ennen kuin lopetuskriteerit täyttyvät.

## Muu: korvaavien menetelmien jakaminen

Näistä informoidaan toiminnanharjoittajan henkilöstöä sekä yhteistyökumppaneita sopivissa tilanteissa.

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
<b>Hankkeen nimi</b>	Unen ja unen puutteen terveysvaikutukset solu- ja molekyyllitasolla.	
<b>Hankeluvan kesto</b>	3 vuotta	
<b>Avainsanat</b>	Uni, unen puute, vuorokausirytmäisyys, aineenvaihdunta, immuunivaste	
<b>Hankkeen tarkoitus</b>	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
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	Hankkeen tarkoituksena on tuottaa tietoa unen säätelyn solu- ja molekyyllitasoisista mekanismeista sekä selvittää mekanismeja, joilla unen puute altistaa monille pitkäaikaisairauksille (mm. valtimokovettumatauti, tyyppin 2 diabetes, depressio, demen- tia).	
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyöttyä hankkeen tuloksista)</b>	Tuloksia voidaan käyttää sairauksien ennaltaehkäisyyn. Sen pohjalta voidaan kehittää myös vähemmän haitallisia työaika- järjestelyjä mm. vuorotyöhön ja kouluun. Molekyyllitason tutki- mus voi myös identifioida molekyyliä, joita voidaan käyttää lääkeainekehittelyn pohjana.	
<b>Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät</b>	Seeprakala, 5600; hiiri, 768; rotta, 593 eläintä	
<b>Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b>	Eläimille aiheutuu tutkimuksessa haittaa unen estosta tai unen ominaisuuksien muuttamisesta, elektrodien asennuksesta aivoi- hin sekä kuvantamisista. Kokeen päättyessä kaikki eläimet lopetetaan.  <b>Vakavuusluokat: vakava</b>	
<b>3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b>		
<b>1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi kor- vaavaa menetelmää ei voi käyt- tää?</b>	Uni on kehittyneille aivoille tyypillinen tila eikä sitä voi määrit- tää yksittäisistä soluista – tarvitaan hermoverkkoja ja käyttäyty- mistä. Näin ollen esim. soluviljelmää ei voida käyttää kokeis- samme muutoin kuin täydentävinä menetelminä.	
<b>2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?</b>	Suoritamme jokaiselle kokeelle tilastollisen voimalaskelman, jonka perusteella päätetään, mikä on tarvittava minimimäärä, jotta tuloksia voidaan pitää tilastollisesti merkittävänä.	

<p><b>3. Parantaminen - Refinement</b>  <b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b>  <b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b>  <b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b></p>	<p>a) valitsemme kehitysasteeltaan mahdollisimman alhaisen lajin kaikkiin kokeisiin: vain jos koetta ei ole mielekäästä tehdä kalan ruskuaispussipoikasilla, teemme sen jyrksijöillä.  b) käytämme selkärankaisia, jotka muistuttavat mahdollisimman paljon ihmistä. Näin varmistetaan, että tulokset ovat sovellettavissa. On myös tärkeää vertailla tuloksia eri lajien välillä, jotta löydetään kaikille yhteiset mekanismit.  c) käytämme mahdollisimman lyhyitä unenestokokeita ja esitämme unta ainoastaan lajityypillisillä ärsykkeillä. Leikkauksissa kiinnitetään erityistä huomiota riittävään toipumisaikaan ja kivun lievitykseen.</p>
<p><b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b></p>	<p>KYLLÄ</p>

## TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

### 1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Tavoitteet: Hankkeessa tutkittiin unen ja unenpuutteen terveysvaikutuksia molekyylitasolla.

Tavoitteiden saavuttaminen: Tutkimuksen tavoitteiden saavuttamisessa onnistuttiin hyvin.

Eläinmallien soveltuvuus: Käytetyt eläinmallit osahankkeessa 1 olivat sopivia tähän tutkimukseen. Osahanketta 2 ei toteutettu.

### 2. Millaista haittaa

Tosiasiallinen haitta ja vakavuusluokka: Luvan yleiseksi vakavuusluokaksi oli lautakunnan toimesta arvioitu SV4=vakava. Kaikista 265 eläimestä SV4 haittaluokan sai yhteensä 16 eläintä, joista 10 oli rottia ja 6 hiirtä. Tosiasiallinen haitta ei näin suurimmalla osalla eläimistä ollut SV4. (tiedot taulukossa 1).

Tiedot vakavasta haitasta: SV4 haittaluokka johtui odottamattomista haitoista. Yksityiskohtaiset kuvaukset alla:

**1)** Rotilla muutosluvan alaisessa kokeessa tutkittiin unta morfiinista vieroittumisen aikana. SV4 vakavuusluokka 10:lle yksilöille arvioitiin, koska näillä eläimillä leikkauksesta parantuminen pitkittyi. Ratkaisu: Ongelmaa selvitettiin kattavasti yhdessä eläinlääkärien kanssa ja aseptisten leikkausolosuhteiden parantaminen sekä pidennetty postoperatiivinen seuranta ratkaisivat ongelman. Lopuilla eläimillä haittaa ei enää esiintynyt.

**2)** Hiirillä SV4 haittaluokkaan arvioitiin eläimet (n=6), joille oli anestesiassa asennettu langaton unenmittaus lähetin ja joiden yhdistäminen takaisin kotihäkin sosiaaliseen ryhmään leikkauksen jälkeen ei enää onnistunut, koska kotihäkin eläimet eivät niitä hyväksyneet ja ne jouduttiin siirtämään yksittäishäkkeihin leikkauksesta toipumisen ja myös varsinaisten kokeiden ajaksi. Ratkaisu: Olimme tästä yhteydessä eläinten toimittajaan (ENVIGO) ja ratkaisuksi päädyttiin tilaamaan ainoastaan varmistettuja pentuesisaruksia. Tämä osoittautui toimivaksi strategiaksi, koska implantoitujen eläinten kotihäkkiin palauttaminen onnistui varmistetuilla pentuesisaruksilla ilman ongelmia.

Hankeluvan kohdassa 6.3 lautakunta pyytää kiinnittämään huomiota unideprivaatiokokeisiin.

-Kesken kokeen ei jouduttu lopettamaan yhtään eläintä. Toimenpiteet onnistuivat eläinten hyvinvoinnin kannalta odotetusti.

-Eläinten hyvinvointia kokeiden aikana seurattiin tutkijoiden läsnäololla (käsittelyt tapahtuivat ainoastaan päiväsaikaan) sekä videokuvantamalla vuorokauden ympäri. Eläinten ulkoinen olemus ja käyttäytyminen eivät merkittävästi eronneet viereisessä häkissä elävistä verrokkeläimistä, joille

käsittelyä ei tehty. Verrokkiryhmät olivat aina samassa tilassa samoissa olosuhteissa, joten vertailu oli mahdollista.

-Tämän lisäksi pyydettyinä objektiivisina mittareina käytettiin:

1) Veren stressihormonimääritystä (kortikosteroni, ELISA menetelmä)

- a) Lyhyen (9h) unideprivaatiokäsittelyn jälkeen veren kortikosteronipitoisuus  $79,0 \pm 4,4$  ng/ml (keskiarvo  $\pm$  keskiarvon keskivirhe) ei tilastollisesti merkitsevästi (t-testi,  $p=0,57$ ) eronnut verrokkieläinten vastaavasta pitoisuudesta ( $79,1 \pm 12,5$  ng/ml).
- b) 14 päivän unifragmentaatiokäsittelyn jälkeen: veren kortikosteronipitoisuus  $49,3 \pm 4,81$  ng/ml ei tilastollisesti merkitsevästi (t-testi,  $p=0,061$ ) eronnut verrokkieläinten vastaavasta pitoisuudesta  $65,5 \pm 5,71$  ng/ml.

2) Eläinten painon kehitystä seurattiin 14 päivän unifragmentaatiokokeen yhteydessä. Verrokkihiirot painoivat keskimäärin  $33,75 \pm 1,03$  g (keskiarvo  $\pm$  keskiarvon keskivirhe) ennen koetta ja keskimäärin  $34,5 \pm 0,87$  g kokeen jälkeen. Koeryhmän hiiret painoivat keskimäärin  $33,25 \pm 0,75$  g ennen koetta ja keskimäärin  $32,25 \pm 1,44$  g kokeen jälkeen Parittaisen t-testin mukaan painon keskimääräinen muutos kokeen aikana ei ollut tilastollisesti merkittävä kummassakaan ryhmässä ( $p=0,624$  ja  $p=0,630$ ).

Luvassa kuvatut "unideprivaatio" menetelmät:

**Lyhyet unideprivaatiot/valvotuskokeet** (engl. "Sleep deprivation by the gentle handling method") perustuvat siihen, että eläimille tarjotaan virikkeitä päivällä valoisaan aikaan, mikä on jyrsijöiden luonnollinen uniaika. Eläimille tarjotaan valvetta aktivoivaa tekemistä mm. kiipeilymahdollisuus, uusia esineitä tutkittavaksi sekä mahdollisuus sosiaaliseen interaktioon. Toisin sanoen eläimet valitsevat valvomisen nukkumisen sijasta. Haluamme myös tässä tuoda esille, että kaikki laboratorioeläinten ilman lupaa suoritettavat rutiinihoitotoimenpiteet sekä valtaosa kaikista luvanvaraisista koekäsittelyistä suoritetaan päivällä (laboratoriojyrsijöiden luonnollisena uniaikana) aiheuttaen tahatonta unideprivaatiota ilman että näiden toimenpiteiden unideprivaatiovaikutuksia koskaan systemaattisesti seurataan. Unitutkimuksessa kaikki toimenpiteet valoisana aikana on tarkkaan kontrolloitu ja mitään toimenpiteitä ei tehdä eläimille ilman huolellista ajankohdan ja valorytmin huomioonottamista.

**Käyttämämme pidempiaikainen unifragmentaatiokäsittely ei aiheuta uniajan lyhentymistä "unideprivaatiota".** Aikaisempi tutkimuskirjallisuus ja sen jälkeen julkaistut tutkimukset ovat selkeästi osoittaneet, että eläimet eivät unifragmentaatiokokeessa kärsi unen lyhenemisestä. Unen fragmentaation aiheuttava laite ei ole päällä yöaikaan (eläinten aktiivivaiheessa) ja tutkimuksista ilmenee, että laitetta käytettäessä eläinten yöaikainen nukkuminen ei lisäännä, mikä merkitsee sitä, että päiväaikainen unen fragmentaatio ei aiheuta eläimille unen puutetta, joka käynnistäisi unen homeostaattisen mekanismin ts. unideprivaatiosta aiheutuvaa palautumisunta. Unimäärä ei myöskään lisäännä kokeen päättymisen jälkeen, mikä osoittaa, että eläimille ei kokeen aikana kerry kasaantuvaa univajetta. Omat alustavat tuloksemme vahvistavat nämä havainnot. Käsittelyn tarkoituksena ei siis ole aiheuttaa uniajan lyhentymistä vaan muuttaa unen ominaisuuksia. Unen ominaisuuksien muutokset aiheuttavat pitkäaikaisia systeemisiä muutoksia, joiden biologisia syntymekanismia ei vielä tunneta. Näiden mekanismien tutkiminen ja niiden mahdollinen ennaltaehkäisy hoidollisesti on tutkimuksemme perimmäinen tarkoitus.

### **3. 3R-mahdollisuudet**

**Vaihtoehtoiset menetelmät:** Unta on mahdotonta tutkia ilman eläimiä: solut tai kudokset eivät nuku ja vaikka unen ja vireystilan säätelyä on olemassa matemaattisia malleja, ne eivät vielä ole niin kehittyneitä, että niiden avulla voisi vastata tutkimuskysymyksiimme.

**Käytetyt 3R keinot ja toteuttamistavat:** 3R menetelmistä käytimme onnistuneesti eläinten määrän vähentämistä. Luvan alaisuudessa käytettiin yhteensä 264 eläintä. Tämä on huomattavasti vähemmän kuin arvioidut eläinmäärät (seeprakala: 5600, hiiri 768, rotta 593). Seeprakaloja ei tämän luvan alaisuudessa käytetty lainkaan. Kaikki rotat ( $n=34$ ) käytettiin muutosluvan mukaisiin kokeisiin.

Eläinmäärän vähentämisessä onnistuttiin, koska osa kokeista toteutettiin pitkittäistutkimuksena, toisin sanoen niin, että sama eläin toimii omana kontrolliryhmänä. Näin toimien erillistä kontrolliryhmää ei tarvittu. Samoista eläimistä kerättiin myös mahdollisimman paljon tietoa (esim. langaton unimittaus, jonka yhteydessä liikeaktiivisuuden seuranta sekä lämpötilaseuranta) ja lopettamisen jälkeen verinäytteet sekä aivokudosnäytteet.

#### **Muuta: Tietoisuuden lisääminen unen ja vuorokausirytmien hyvinvointivaikutuksista**

Tutkimusryhmämme unilaboratorio toimii tällä hetkellä yliopiston tutkimusohjelman osana. Tämä merkitsee sitä, että palvelemme myös muita tutkimusryhmiä opettamalla unirekisteröintejä jyrsoilla. Koulutuksen osana painotamme eläinten oikean hoidon, käsittelyn ja erityisesti unen ja vuorokausirytmien merkitystä laboratorioeläimien hyvinvoinnille. Tällainen koulutus levittää laajemmallekin tutkijajoukolle tietoa stressittömien kokeiden merkityksestä sekä keinoista sellaisten toteuttamiseen. Osa koulutustamme on jo videoitu, ja projekti jatkuu.

Tutkijamme on myös tämän luvan voimassaollessa osallistunut kouluttajana kahteen 3R seminaariin. Tämän lisäksi hän omassa opetuksessaan tiedekunnan ja koe-eläintieteen kursseilla pyrkii lisäämään opiskelijoiden tietoisuutta unesta ja vuorokausirytmistä ja niiden merkityksestä laboratorioeläinten hyvinvointiin. Tavoitteenamme on lisätä yleistä tietoisuutta aiheesta ja vakiinnuttaa toimintatapoja, jotka eivät tarpeettomasti häiritse uni- ja vuorokausirytmijä. Esimerkiksi lääketutkimuksessa uni- ja vuorokausirytmit vielä harvoin otetaan huomioon, vaikka niiden huomioiminen olisi erittäin tärkeää tulosten translationaalisen arvon kannalta.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen						
Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, malista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Osahanke1	Hiiri	+	768/230	SV4/[SV3-SV1]	Satunnainen. Aggressiivinen käytös.	Tilaamalla varmistettuja pentuesisaruksia haitta poistui kokonaan.
-	-	-	-	SV4: n=6	-	-
-	-	-	-	SV3:n=61	-	-
-	-	-	-	SV2:n=56	-	-
-	-	-	-	SV1: n=96	-	-
-	-	-	-	NB: n=11	-	-
muutoslupa	Rotta	+	593 (32) /34	SV4, josta SV4 (10) ja SV3 (24)	Satunnainen. Parantuminen pitkittyi.	Eläinlääkäriin ohjeistuksella aseptisten leikkausolosuhteiden parantaminen. Pidennetty postoperatiivinen seuranta. Haitta poistui.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista				
Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	X	-	-	-
Lyhyempi seuranta-aika	X	X	-	-
Pesämateriaali	X	X	X	-
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	-
Totuttaminen	X	X	-	-

## YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ

<b>Hankkeen nimi</b>	Lääkeaineiden tehon prekliininen tutkiminen kirurgisesti indusoiduissa keskushermoston vauriomalleissa	
<b>Hankeluvan kesto</b>	3 vuotta	
<b>Avainsanat</b>	Aivohalvaus, aivoverenvuoto, aivotrauma, selkäydinvaurio, prekliininen lääketutkimus	
<b>Hankkeen tarkoitus</b>	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
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	Tässä hankkeessa tavoitteena on testata uusien lääkeaineiden ja hoitomuotojen tehoa luotettavasti vakiintuneissa eläinmalleissa, jotta jatkokehittämiseen pystytään valitsemaan toimivat ja tehokkaat ehdokkaat. Tutkimus edesauttaa tehokkaimpien ja lupaavimpien lääkeaineiden ja hoitojen nopeaa etenemistä kliinisiin kokeisiin ja sitä kautta kyseisistä vaurioista/sairauksista kärsivien ihmisten käyttöön.	
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)</b>	Mallinnettavat sairaudet/vauriot ovat tällä hetkellä paitsi maailmanlaajuisesti johtavia kuolinsyitä, myös suurimpia syitä vaikeasti ja pitkäaikaisesti vammautumisiin erityisesti nuorilla ja työikäisillä ihmisillä. Aivotrauman ja selkäydintrauman hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lääkeaineita tai hoitokeinoja. Tehokkaita, edes 50 %:lla potilaista toimivia hoitoja aivojen verenkiertohäiriöihin ollaan niin ikään vasta etsimässä.	
<b>Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät</b>	Rotta: 11400 Hiiri: 4200 eläintä	
<b>Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b>	<p>Tutkimuksessa aiheutetaan eläimille vakioitua menetelmää käyttäen aivohalvaus, aivoverenvuoto, aivotrauma tai selkäydintrauma. Kirurgiset malli-induktiot aiheuttavat eläimissä kipua. Kivun lievitystä käytetään aina, kun se on mahdollista. Eläimillä voi esiintyä eriasteisia halvaantumisoireita aivovaurion seurauksena. Oireisto lievenee kaikissa malleissa ajan kuluessa. Eläimille aiheutuu haittaa myös tutkittavien aineiden annosteluista, telemetrialähtetimen asennuksesta, kuvantamisista, käyttäytymistestien tekemisestä ja verinäytteiden otosta. Tutkimusten päätteeksi eläimet lopetetaan.</p> <p><b>Vakavuusluokat: vakava</b></p>	
<b>3R-menettelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b>		
<b>1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi</b>	Testattavan lääkeaiheen edulliset vaikutukset on yleensä testattu korvaavin menetelmin ennen prekliinistä vaihetta. Toisaalta ennen kuin vaikutuksia voidaan testata ihmiselimestössä,	

<p><b>korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</b></p>	<p>lääkeaihion teho sekä mahdollisesti turvallisuus ja spesifisyys on todettava selkärankaisessa nisäkäselimistöissä. Tutkimuksessa käytettävät sairaus-/vauriomallit ovat kudospesifisiä ja esiintyvät ihmisellä hyvin pitkälle erilaistuneissa soluissa, jotka puolestaan kuuluvat suurempiin solu- ja kudospokonaisuuksiin.</p>
<p><b>2. Vähentäminen - Reduction</b> <b>Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</b></p>	<p>Eläinryhmille määritetään oikeanlaiset koot tilastotieteellisin menetelmin. Riittävän kokoiset ryhmät ja riittävän pitkät seuranta-ajat vähentävät myös saman koeasetelman toistamista uudestaan. Ennen minkään eläinmallin ottamista tutkimuskäyttöön se validoidaan ja pilotoidaan.</p>
<p><b>3. Parantaminen - Refinement</b> <b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b> <b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b> <b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b></p>	<p>a) Suurin osa aivojen verenkiertohäiriöiden, aivotrauman ja selkäydintrauman eläinmalleista on kehitetty hiirissä ja rotissa. Jyrsijöiden fysiologia soveltuu kyseisiin malleihin. Jyrsijöiden käyttö on lisäksi yleisesti hyväksytty sairaus/vauriomalleihin kohdistuvissa prekliinisissä kokeissa.</p> <p>b) Käytettävät prekliiniset tautimallit ovat laajasti hyväksytyjä 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.</p> <p>c) Jokaisen osahankkeen tutkimusmallille tyypilliset hyvinvointiin vaikuttavat tekijät on selvitetty ja huomioitu validaatiokokein sekä tutkimusmallikohtaisin lopetuskriteerein. Lopetuskriteereissä on tarkoin määritelty malleille tyypillisten oireiden päätepiste. Kaikissa operaatioissa pyritään käyttämään mahdollisimman tehokasta ja laajaa kivunlievitystä sekä takaamaan eläinten toipuminen intensiivisellä post-operatiivisella tukihoidolla. Eläimille tehtävät tutkimukselliset toimenpiteet, kuten näytteenotto tai käyttäytymistestit suoritetaan mahdollisimman vähän stressiä aiheuttavia menetelmiä käyttäen. Eläimet esimerkiksi totutetaan uuteen ympäristöön tai laitteistoon ja niitä käsitellään ennen kokeen alkua.</p>
<p><b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b></p>	<p>KYLLÄ</p>

## TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

### Lääkeaineiden tehon prekliininen tutkiminen kirurgisesti indusoiduissa keskushermoston vauriomalleissa

#### Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Käytetään apinoita

Muu peruste

#### Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli testata uusien lääkeaineiden ja hoitomuotojen tehoa eläinmalleissa. Tavoitteissa onnistuttiin hyvin ja käytetyt eläinmallit toimivat suunnitellusti. Osasta testatuista lääkeaineista saatiin positiivisia tuloksia. Tuloksia on julkaistu kansainvälisissä kokouksissa. Osa lääkeaineista on edennyt klinisiin kokeisiin.

## Todelliset haittavaikutukset: eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

-	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (Mus musculus) [A1]	59	424	1008	890
Rotat (Rattus norvegicus) [A2]	134	780	874	2180

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

Tutkimuksessa käytettiin 2381 hiirtä (ennakoitu määrä 4200) ja 3968 rottaa (ennakoitu määrä 11400). Käytetyt eläimet jakaantuivat seuraavasti: ei toipumista 3 %, lievä 19 %, kohtalainen 30 % ja vakava 48 %. Käytettyjen eläinten määrä jäi noin 40 % suunnitellusta käytöstä, koska tarvetta ennakoituille kokeille ei tullut. Vakavuusluokkien osalta 40 % käytetyistä eläimistä kuului vakavuusluokkaan vakava.

Mallikohtaisesti vakavaa haittaa aiheutui/kokonaismäärä:

aivotukosmallit - hiiri: 566/822, rotta: 1235/1876; aivoverenvuotomalli rotta 29/56, aivotrauma hiiri 254/756, rotta 339/473, selkäydinvaurio hiiri 70/803, rotta 577/1563.

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

Kaikki eläimet lopetettiin tutkimusten päätyttyä, kuten oli ennakoitu.

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

#### Korvaaminen

Lupahankkeen aikana ei ole saatu eläinten korvaamiseen liittyvää lisätietoa.

#### Vähentäminen

Eläinten määrää pyritään vähentämään jatkuvalla mallivalidaatiolla ja kehittämällä tutkimusmenetelmiä. Tilastollisilla menetelmillä pyritään selvittämään pienimmät tarvittavat ryhmäkoot erojen havaitsemiseksi.

#### Parantaminen

Lautakunta edellytti takautuvassa arvioinnissa kerrottavan, mitä parannusta kehitettiin malleissa, joissa kivunpoistoa ei voitu käyttää.

Aivohalvausmallit: kipulääkkeen käyttö validoitu rotille. Kipulääkitys on otettu mukaan uuteen hankelupaan. Laitoksella on otettu käyttöön lämpökaapit kirurgian jälkeiseen palautumiseen. Vastaavasti käytössä on myös kaapit, joissa eläimiä voidaan pitää rauhoittumassa ennen kirurgisten operaatioiden aloittamista. Post-operatiivista hoitoa on tehostettu ja se tehdään enemmän yksittäisen eläimen tarpeiden mukaan. Hoito on myös systemaattisempaa ja paremmin kontrolloitua. Käyttöön on otettu myös eläinten hyvinvoinnin seurannan pisteytystaulukko avustamaan post-operatiivisen hoidon tarpeen arvioinnissa ja lopetuspäätöksen tekemisessä.

Muut osahankkeet – kipulääkintä vähintään 30 minuuttia ennen malli-induktiota tai asennuskirurgiaa, jolloin kipulääkkeen teho on parempi kuin juuri ennen anestesia-induktiota annettuna.

**Muu: korvaavien menetelmien jakaminen:** Tietoa jaetaan toiminnanharjoittajan ja yhteistyöryhmien kesken, osa julkaistaan.

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ	
<b>Hankkeen nimi</b>	Vaikean hermolihastaudin Amyotrofisen Lateraaliskleroosin (ALS) ja Huntingtonin taudin eläinmallien tutkiminen
<b>Hankeluvan kesto</b>	3 vuotta
<b>Avainsanat</b>	hermoston rappeumasairaus, ALS, motoneuroni, kasvutekijät, CDFN

<b>Hankkeen tarkoitus</b>	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	Kyllä
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	Ihmisen lihashermoston rappeumatauti ALS on kuolemaan joh- tava sairaus, johon ei ole olemassa parannuskeinoa. Tauti joh- taa loppuvaiheessaan lihasta hermottavien hermosolujen eten- kin selkärangan etusarven lihashermosolujen surkastumiseen. Potilaiden elinikä taudin puhkeamisen jälkeen on yleensä alle 3 vuotta. Vuosittain Suomessa tähän tautiin sairastuu noin sata ihmistä.	
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)</b>	Tutkimuksen tavoitteena on kehittää ihmisen ALS sairauteen uusia hoitomuotoja tutkimalla SOD-ALS hiirimallia ja niitä mah- dollisuuksia millä ensikädessä tautia voitaisiin pysäyttää ja toiseksi mahdollisesti hidastaa taudin kulkua. Hiirimallista saa- tuja tuloksia voidaan myöhemmin soveltaa ihmisen ALS tautiin ja luoda uusia hoitomuotoja, joilla voisi pidentää potilaiden elinikää ja edistää heidän hyvinvointiaan. Tutkimus on perustut- kimuksen lisäksi soveltavaa tutkimusta, josta parhaimmillaan odotetaan uusia kliinisiä lääkesovellutuksia kansantaloudelli- sesti raskaiden ja inhimillisesti erittäin suuria kärsimyksiä ai- heuttavien aivosairauksien hoitoon.	
<b>Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät</b>	Hiiri 6855, Rotta 1050 eläintä	
<b>Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b>	Eläimille aiheutuu tutkimuksessa haittaa hermorappeumasai- rautta aiheuttavasta geenimuunnoksesta, kirurgiasta, aineiden annosteluista ja käyttäytymistestien tekemisestä.  <b>Vakavuusluokat: vakava</b>	
<b>3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b>		
<b>1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</b>	<b>1. Replacement</b> Tutkimuksessa käytetään vaihtoehtoisia menetelmiä, esim solu- viljelmiä, aina kun se on mahdollista ja tarkoituksenmukaista. Tämä ALS hiirimalli on kehitetty kuvaamaan familiarista ihmi- sen ALS tautia, jossa on SOD1 entsyymin mutaatioita. Koe-eläi- met ovat korvaamattomia monimutkaisten moniin eri hermo- verkkoihin liittyvien rappeuttavien aivosairauksien tutkimiseksi, taudin syyn selvittämiseksi ja jotta ymmärrettäisiin kaikkia ALS- tautiin siihen vaikuttavia tekijöitä.	
<b>2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?</b>	<b>2. Reduction</b> Eläimiä käytetään kokeissa mahdollisimman vähän, kuitenkin niin että kokeista saadaan luotettavia ja tilastollisesti	

	merkitseviä tuloksia. Ns tilastollista voima-analyysiä käytetään aina kun se on mahdollista ryhmäkokojen laskemiseksi
<b>3. Parantaminen - Refinement</b> <b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b> <b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b> <b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b>	<b>3. Refinement</b> a) Rotille on kehitetty samanlainen ALS tautimalli mutta näitä eläimiä ei ole saatavilla. b) ALS-taudin johtavien tutkijoiden yleinen mielipide on, että ALS-taudin geneettinen SOD1-hiirimalli on tällä hetkellä paras ALS-taudin in vivo-malli. c) Annostelemme kipulääkkeitä leikkauksen yhteydessä ja sen jälkeen, eläinten kuntoa ja painoa seurataan päivittäin. Jos eläimet eivät itse pysty syömään, niitä syötetään ja juotetaan. Jos havaitaan kuivumiseen jotain viittaavaa, annostellaan hiirille saliinia ip tai sc. Eläimet lopetetaan lopetuskriteerien perusteella d) halvaantuneille eläimille laitetaan häkin pohjalle liukues-tematto + hieman vähemmän puruja sen päälle (verrattuna normaalihäkkiin)
<b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b>	KYLLÄ

### TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

#### Vaikean hermoliyhastaudin Amyotrofisen Lateraaliskleroosin (ALS) ja Huntingtonin taudin eläinmallien tutkiminen

#### Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Käytetään apinoita

Muu peruste

#### Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteet on saavutettu hyvin. Olemme saaneet menestyksekkäästi testattua uusia hermo- ja lihaskasvutekijöitä kuten CDNF ja MANF proteiineja amyotrofisen lateraaliskleroosin eli ALSin SOD1-G93A hiiri- ja TDP-43 rottamallissa. Eläinmallit toimivat kuten kirjallisuudessa on kuvattu.

Suorittamiemme tuloksien perusteella CDNF-proteiinille on myönnetty Orphan drug-status, joka mahdollistaa CDNF-proteiinin viemisen kliinisiin kokeisiin nopeasti (tavoitteenamme on viedä CDNF proteiini ALS-potilaskokeisiin lähivuosien aikana). Kokeiden tuloksista on kirjoitettu myös tutkimuskäsikirjoitus, joka on parhaillaan arvioitavana korkeatasoisessa tieteellisessä julkaisussa.

#### Todelliset haittavaikutukset: eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

-	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (Mus musculus) [A1]	155	126	249	2081
Rotat (Rattus norvegicus) [A2]	10	13	55	545

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

Haittojen todellinen vakavuus on vastannut hyvin ennakoituja vakavuusluokkia. Eläimille on aiheutunut kohtalaista kipua muun muassa aivoleikkausten yhteydessä, mutta kipua on lievitetty kipulääkkeiden avulla sekä kiinnittämällä huomiota leikkauksen jälkeiseen hoitoon. ALS-oireita on seurattu tarkasti päivittäin (pisteyttämällä eläinten kliininen oirestatus) ja eläimille, jotka eivät pysty syömään kiinteää eläinrehua, on annettu eläinpuuroa ja energiageeliä ja tarvittaessa saliinia.

Lisäksi eläinten painon kehitystä on seurattu. Yllättäviä haittoja ei havaittu. Käytetyt eläinmäärät olivat pienemmät kuin mitä alun perin suunnittelimme eläinlupaa haettaessa.

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

Hengissä pidettyjen eläinten kohtalo tutkimuksen päättyessä vastaa ennakoitua kohtaloa hyvin, sillä käyttämämme SOD1 ja TDP-43 mallit ovat hyvin kuvattuja kirjallisuudessa eli osasimme varautua siihen, miten ALS-tauti etenee eläimissä.

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

#### **Korvaaminen**

Tutkimuksessa on käytetty vaihtoehtoisia menetelmiä, kuten soluviljelmiä (ns. jakautuvat solut sekä kantasolut), aina kun se on ollut mahdollista ja tarkoituksen mukaista. Tämä SOD1-G93A ALS hiirimalli on kehitetty kuvaamaan familiaarista ihmisen ALS-tautia, jossa on SOD1 entsyymin mutaatioita. TDP-43 rottamalli kuvaa taas ihmisen ALS tautia, jossa on TDP-43 geenin mutaatio. Koe-eläimet ovat korvaamattomia monimutkaisten, moniin eri hermoverkkoihin liittyvien rappeuttavien aivosairauksien tutkimiseksi, taudin syyn selvittämiseksi ja jotta ymmärrettäisiin kaikkia ALS-tautiin siihen vaikuttavia tekijöitä.

#### **Vähentäminen**

Eläimiä on käytetty kokeissa mahdollisimman vähän, kuitenkin niin että kokeista saadaan luotettavia ja tilastollisesti merkitseviä tuloksia. Ns. tilastollista voima-analyysiä käytetään aina kun se on mahdollista ryhmäkokojen laskemiseksi. ALS-taudin johtavien tutkijoiden yleinen mielipide on, että ALS-taudin geneettinen SOD1-hiirimalli on tällä hetkellä parhaiten kuvattu ja paras ALS-taudin in vivo-malli. TDP-43 geenimutaatio on ALS-potilailla harvinaisempi ALS-taudin syy kuin SOD1 mutaatio ja esimerkiksi TDP-43 hiirimalli ei ole yhtä vakioitu. Näiden syiden takia käytimme ALS:n SOD1-hiirimallia tässä tutkimuksessa.

#### **Parantaminen**

Olemme parantaneet eläinten olosuhteita siten, että kun eläimet ei enää pysty nousemaan takajaloilleen juomaan juomapullosta tai syömään rehukaukalosta, on eläimille annettu häkin pohjalle ruokaa puuron muodossa tai energiageeliä kupissa. On myös käytetty häkin pohjan lattialla selkeä pintamateriaalia, josta eläimet saavat paremmin otteen (ettei tassut liu'u lattialla). Leikkausten yhteydessä on huolehdittu asianmukaisesta kipulääkityksestä.

#### **Muu: korvaavien menetelmien jakaminen**

Hyödynnämme saatuja tietoja ja kokemuksia, jotta voimme jatkossa vähentää entisestään eläinten kokemaa stressiä ja parantaa eläinten elämää.

<b>YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ</b>		
<b>Hankkeen nimi</b>	Ikääntymisen ja ko-morbiditeettien vaikutus aivohalvaukseen	
<b>Hankeluvan kesto</b>	3 vuotta	
<b>Avainsanat</b>	aivohalvaus, Alzheimerin tauti, liitännäissairaus, lääkeliikenne	
<b>Hankkeen tarkoitus</b>	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Ei
	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
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tieteellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	<p>Tämän tutkimuksen tarkoitus on selvittää, miten ikä ja erilaiset liitännäissairaudet vaikuttavat aivohalvauksen lopputulemaan.</p> <p>Vaikka ikääntyminen ja erilaiset liitännäissairaudet ovat tyypillisiä aivohalvauspotilailla, suurin osa koe-eläintöistä tehdään edelleen käyttäen nuoria uroshiiriä. Tämä voi olla yksi syy siihen, miksi uudet aivohalvauksen lääkekohteet eivät ole osoittautuneet toimiviksi klinikassa.</p> <p>Tämän tutkimuksen tavoitteena on selvittää, mitkä tekijät vaikuttavat vanhojen ja liitännäissairauksia omaavien yksilöiden aivohalvauksen lopputulemaan. Näiden tekijöiden selvittäminen johtaa todennäköisesti uusien, tehokkaampien hoitomuotojen kehittämiseen. Tämän tutkimuksen tavoitteena onkin testata uudenlaisia hoitomuotoja aivohalvauksen eläinmalleilla.</p> <p>Tässä tutkimuksessa tutkimme lisäksi tarkemmin, mihin spesifisiin kohteisiin lääkeaineet vaikuttavat ja mitkä eri aivojen solutyypit protektiivista vaikutusta välittävät. Lisäksi tutkimme tulehdusreaktioita välittävien solujen toimintaa in vivo käyttäen multifotoni-laitteistoa.</p>	
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)</b>	<p>Aivoiskemia eli aivohalvaus on toiseksi yleisin kuolinsyy länsimaissa ja väestön ikääntyessä aivohalvausten lukumäärä kasvaa koko ajan.</p> <p>Yleisimmin ihmisillä aivohalvaus johtuu joko aivo- tai kaulavaltimoiden ahtautumisesta tai tukkeutumisesta. Tällä hetkellä ainoa saatavilla oleva hoito aivohalvaukseen on liuotushoito, joka on aloitettava alle 3 h oireiden alkamisesta. Liuotushoidosta saatavat hyödyt ovat tutkimusten mukaan ristiriitaisia, entsyymattinen trombolyyssihoito ei sovellu kaikille ja voi aiheuttaa lisääntyneitä riskejä saada aivoverenvuoto.</p> <p>Uudet hoitokeinot ovatkin tarpeen aivohalvauksen hoidossa. Monet potentit lääkeaineet ovat osoittautuneet kliinisissä kokeissa tehottomiksi, vaikka ne ovat olleet suojaavia hiirillä ja rotilla tehdyissä kokeissa. Tämä voi johtua siitä, että usein aivohalvaukseen sairastuvat ihmiset ovat ikääntyneitä, heillä on erilaisia liitännäissairauksia, kuten dementia, AD, diabetes ja muita tulehdusvästien sisältäviä liitännäissairauksia ja ihmisten ruokavalio sisältää huomattavasti enemmän rasvaa ja sokeria kuin koe-eläinten ruokavalio. Tämän vuoksi on tärkeää kehittää entistä relevantimpia eläinmalleja uusien lääkeaineiden testaamiseen. Erityisesti ikääntymisen ja liitännäissairauksien selvittäminen aivohalvauksen lopputulemaan on erittäin tärkeää. Lisäksi uusia lääkeainehoitoja tulee testata paremmissa aivohalvauksen eläinmalleissa</p>	

<b>Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät</b>	Hiiri 6724, rotta 701 eläintä
<b>Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b>	<p>Eläimille aiheutetaan kirurgisesti ihmisen aivohalvausta vastaava haitta ja patologiset muutokset, joka tarkoittaa aivovauriota sekä siitä johtuvia heikentyneitä motorisia toimintoja. Näihin vaurioihin kuuluu mm. leesiopuolen vastakkaisen eturaajan heikkous/koordinaatiovaikeus.</p> <p>Defektejä käytetään mittareina motorisissa testeissä ja käyttäytymistesteissä mitattaessa iskeemisen vaurion vakavuutta ja lääkeainevastetta. Eläimille aiheutuu aivohalvauksen indusoinnin lisäksi haittaa tutkittavien aineiden annosteluista, kuvantamisista, käyttäytymistestien tekemisestä, yksinpidosta ja verinäytteiden otosta. Eläimet lopetetaan kokeen lopussa.</p> <p><b>Vakavuusluokat: vakava</b></p>
<b>3R-menettelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b>	
<b>1. Korvaaminen - Replacement</b> <b>Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</b>	Meillä on käytössämme useita erilaisia aivohalvauksen soluviljelymalleja, joissa testamme tutkittavia hoitomuotoja ennen niiden viemistä eläinkokeisiin. Soluviljelykokeilla on kuitenkin valitettavasti mahdotonta mallintaa kaikkia aivohalvauksen aiheuttamia patologisia muutoksia. Lisäksi soluviljelymalleilla ei voida mallintaa vamman aiheuttamia motorisia tai muistiin vaikuttavia vaurioita. Kokeessa käytettävällä aivohalvausmallilla saadaan koe-eläimeen ihmisen aivohalvauksen patologiset muutokset. Käyttäytymistestit täydentävät kudoksetilanteesta saatavia tutkimustuloksia.
<b>2. Vähentäminen - Reduction</b> <b>Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</b>	Ryhmällämme on käytössä vaihtoehtoisia in vitro -malleja, kuten kortikaalneuroniviljelmät, mikroglija ja astrosyyttiviljelmät. Soluviljely- ja muulla in vitro -tutkimuksella ei pystytä luomaan kokonaisvaltaista aivohalvauksen patologiaa paranemisprosessineen. Meillä on tiedossa kokeessa käytetyn mallin biologinen hajonta, jota käyttäen olemme laskeneet ryhmäkoot siten, että ne ovat pienimmät mahdolliset, joilla tilastollisesti merkittävät ryhmien väliset erot vielä saadaan näkyviin.
<b>3. Parantaminen - Refinement</b> <b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b> <b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b> <b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b>	a) Hiiri pääasialliseksi koe-eläimeksi on valittu siksi, että käytettävissä olevat, tutkimuskysymysten kannalta sopivat siirtogeeniset eläimet ovat hiiriä. b) Kokeessa käytettävällä aivohalvausmallilla saadaan koe-eläimeen ihmisen aivohalvauksen patologiset muutokset. Mallimme on toimiva, antaa toistettavat tulokset ja mahdollistaa sekä kudospatologian että käyttäytymistestit. Koska mallimme on pystytetty erityisesti hiirelle, se mahdollistaa siirtogeenisten eläinten käyttämisen. c) Eläimille annetaan kipulääkitystä leikkauksen jälkeen aina kun siihen on mahdollisuus. Lisäksi olemme

	optimoineet mallin siten, että sen aiheuttama vamma tuottaa toistettavan vaurion, jolla on mahdollista nähdä lääkehoitojen vaikutus luotettavasti. Eläimiä tarkkaillaan aivohalvauseleikkauksen jälkeen kahdesti päivässä ja niiden hoito on tehostettua. Hiiriä nesteytetään tarvittaessa sekä niille annetaan tarvittaessa jauhettua ruokaa. Eläimet, jotka eivät näytä toipumista, lopetetaan.
<b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b>	KYLLÄ

## TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

### Ikääntymisen ja ko-morbidityettien vaikutus aivohalvaukseen

#### Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Käytetään apinoita

Muu peruste

#### Tavoitteiden saavuttaminen

Hanketta on käytetty useassa aivohalvausta käsittelevässä projektissa. Näiden avulla on löydetty täysin uusia mekanismeja, jotka aktivoituvat aivohalvauksessa sekä myös uusia mahdollisia biomarkkereita, jotka saattavat ennustaa aivohalvauksen lopputulemaa. Lisäksi yhdessä julkaistussa artikkelissa tutkittiin kahden komorbidityetin vaikutusta aivohalvaukseen (infektio ja ikä). Tois- taiseksi hankkeesta on julkaistu kolme artikkelia ja käsikirjoitusvaiheessa on tällä hetkellä ainakin 3 artikkelia lisää. Kaiken kaikkiaan hyödyllinen hanke, jonka tuloksia toivon mukaan päästään jossain vaiheessa hyödyntämään myös kliinisissä tutkimuksissa.

#### Todelliset haittavaikutukset: eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

-	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (Mus musculus) [A1]	81	55	340	300

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

Eläimiä käytettiin vähemmän kuin oli arvioitu (Hiiri: toteutunut 1598 kpl, rotta: toteutunut 0 kpl). Teimme melko paljon soluviljelmäkokeita, joka vähensi käytettyjen eläinten määriä. Kokeita tehtiin myös vähemmän kuin alunperin oli suunniteltu. Suurimmalla osalla toteutunut haitta oli kohtalainen (SV3) mutta joukossa oli myös vakavan haitan (SV4) kokeneita, kun tehtiin aivohalvauksia transientilla iskemiamallilla. Tässä mallissa eläimelle tuotetaan suuri aivohalvaus, joka ulottuu korteksista striatumiin ja eläimet saattavat olla heti aivohalvauksen jälkeen hyvinkin heikossa kunnossa. Käytimme kuitenkin myös toista, lievempää pysyvää aivohalvausmallia, jossa iskeeminen alue on huomattavasti pienempi ja eläimet toipuvat ennalleen alle viikossa. Tässä mallissa haitta on kohtalainen.

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

Eläimiä ei jätetty henkiin tutkimuksen päättyessä vaan ne lopetettiin aina ennalta määritettynä aikana ja kudokset kerättiin talteen. Näin ajateltiin tapahtuvan myös ennakolta, joten tämä vastaa ennakoitua oikein hyvin.

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

### **Korvaaminen**

Uusia menetelmiä eläinten käytön korvaamiseksi ei tämän hankkeen aikana kehitetty. Tietynkaltaisissa kokeissa tarvitaan eläinmallia, jotta pystytään arvioimaan esim. eläinten käytöstä toimenpiteen jälkeen. Olemme kuitenkin siirtymässä yhä enemmän ihmisnäytteiden tutkimisen suuntaan, yhteistyössä yliopistollisen sairaalan ja useiden eurooppalaisten sairaaloiden kanssa, joten tällä hetkellä me emme tarvitse eläinten aivohalvauslupaa ollenkaan.

### **Vähentäminen**

Käytimme melko paljon solumalleja kokeissamme, ja kaikkea suunniteltua ei lopulta toteutettu. Näin ollen eläinten määrä jäi arvioitua pienemmäksi. Eläimiä tarvitaan yhä edelleen esimerkiksi käyttäytymisen ja toipumisen selvittämiseksi. Näitä asioita ei pystytä solukokein tutkimaan. Hankkeesta saatujen tietojen valossa pystytään jatkossa tarkemmin suunnittelemaan tietynlaisten kokeiden ja mallien eläinryhmien kokoja, jolloin liian suuria ryhmiä ei tarvita vaan voidaan tehdä voimalaskelmat ja näin ottaa vain tarvittavat eläimet koetta varten.

### **Parantaminen**

Käytetyt eläinmallit (pysyvä ja transientti aivohalvausmalli) molemmat palvelevat tiettyjä tarkoituksia. Nämä mallit ovat paljon tutkittuja ja niitä käyttämällä omia tutkimuksiamme pystytään vertaamaan myös muiden tekemiin tutkimuksiin. Pysyvä malli aiheuttaa eläimille vähemmän kärsimystä ja on myös nopeampi suorittaa, joten sitä mallia suosimme myös jatkossa. Kuitenkin tällä mallilla tietyille hiirilinjoille aiheutetut vauriot ovat niin pieniä, ettei niitä pysty esim. käyttäytymiskokeissa havaitsemaan. Tällöin olennaista on käyttää mallia, josta aiheutuu riittävä haitta eläimelle, jolloin esim. lääkehoitojen parantavaa vaikutusta pystytään paremmin tutkimaan.

Ennen leikkausta hiirille annettiin aina kipulääkettä, jos se ei vaikuttanut tutkittaviin hoitoihin. Samoin sitä annettiin leikkauksen jälkeen. Pysyvän aivohalvauksen jälkeen eläinten annettiin toipua omassa häkissään. Transientin aivohalvauksen jälkeen eläimille annettiin lisälämpöä laittamalla ne lämpökaappiin. Eläimille myös annettiin fysiologista suolaliuosta transientin leikkauksen jälkeen korvaamaan mahdollisesti leikkauksen aikana menetettyjä nesteitä. Nämä eivät sinänsä olleet uusia keinoja, vaan olemme näin tehneet jo edellisten lupien alla. Mutta ne parantavat eläinten toipumista ja kuntoa selkeästi etenkin rankemman leikkauksen jälkeen.

### **Muu: korvaavien menetelmien jakaminen**

Löydökset julkaistaan/on jo julkaistu tieteellisissä lehdissä, joten samoja kokeita ei muiden tarvitse enää suorittaa. Tässä hankkeessa suoritetuista kokeista olemme saaneet paljon tietoa esimerkiksi ekstrasellulaarisista vesikkeleistä, joiden tutkimista aiomme jatkaa tulevissa hankkeissa ihmisnäytteiden avulla. Hankkeesta saadut tulokset ovat siis johtaneet tutkimuksemme lähemmäksi kliinisiä tutkimuksia ja lääketieteellisiä löydöksiä.

<b>YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ</b>		
<b>Hankkeen nimi</b>	Lääkeaihiot hermostovaurion parantamiseksi	
<b>Hankeluvan kesto</b>	3 vuotta	
<b>Avainsanat</b>	lääkeaiho; selkäydintrauma; soluväliaine; regeneraatio	
<b>Hankkeen tarkoitus</b>	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	Kyllä
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tieteellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	<p>Traumaattinen aivovaurio ja selkäydinvaurio aiheuttavat valtavia inhimillisiä tragedioita ja kustannuksia yhteiskunnille. Yksitään USA:ssa arvioidaan olevan noin 5 000 000 aivovauriosta kärsivää potilasta ja noin 260 000 selkäydinvauriosta kärsivää potilasta.</p> <p>Vauriot syntyvät tyypillisesti erilaisissa tapaturmissa, kuten liikenneonnettomuuksissa. Pelkästään USA:ssa aivovaurioiden arvioidaan aiheuttavan yhteiskunnalle noin 60 miljardin dollarin kustannukset vuodessa, ja selkäydinvaurioiden aiheuttamiksi kustannuksiksi arvioidaan noin 14.5 miljardia dollaria vuodessa. Keskushermostovaurion kokeneet potilaat voivat joutua elämään rullatuolin varassa lopun elämäänsä ja tarvitsevat siten monen tyyppistä hoitoa ja tukea. Hermosoluyhteydet regeneroituvat huonosti aivovaurion ja selkäydinvaurion jälkeen. Yhtään varsinaisesti parantavaa hoitoa ei ole tällä hetkellä käytettävissä; ainoastaan oireita lievittäviä hoitoja, kuten turvotuksen ja kivun hallinta, käytetään lääkkeellisinä hoitoina. Lääketieteellinen tarve uusien hoitostrategioiden kehittämiseen on siten ilmeinen. Terapia, jonka seurauksena yksilö pystyisi liikkumaan ja selviämään omatoimisesti halvauksen aiheuttavan aivovaurion tai selkäydinvaurion jälkeen, olisi todellinen lääketieteellinen läpimurto.</p> <p>Hankkeessa selvitetään kahden lääkeaihion regeneraatiota edistävää vaikutusta selkäydintrauman malleissa. HB-GAM on fysiologisesti keskushermostossa korkeina pitoisuuksina esiintyvä erilaistumistekijä, joka tarttuu soluväliaineeseen. Protamiini taas on ihmisen lääkkeeksi hepariinivaikutuksen pysäyttämiseksi hyväksytty proteiini, joskin sillä ja sen polyetyleeniglykolilla käsitellyllä johdannaisella on alustavien tulostemme mukaan jonkin verran toksisia vaikutuksia, jotka häviävät käytettäessä protamiinin fragmenttia (pienimolekulaarinen protamiini) kokopitkän molekyylin sijaan.</p> <p>Lääkeaihioiden valinta perustuu suorittamiimme tutkimuksiin hermosoluviljelmillä, joissa todetaan regeneraatiota edistävä vaikutus soluissa, jotka viljellään hermoston soluväliainetta muistuttavalla matriksilla.</p>	
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)</b>	<p>Hanke edistää uusien hoitostrategioiden kehittämistä ja parhaassa tapauksessa johtaa keskushermoston plastisuutta ja regeneraatiota edistävän biologisen lääkkeen käyttöön. Parhaassa tapauksessa hankkeesta saadaan valmiiksi ns. "proof-of-principle" soluviljelmiä ja koe-eläimiä käyttäen, minkä jälkeen päästään kokeilemaan biologista lääkettä ihmisellä ns. Faasi 1:n kliinisessä tutkimuksessa, joka on tarkoitus aloittaa ensisijaisesti selkäydinvaurion hoitoon.</p>	
<b>Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät</b>	Hiiri, 1940; rotta, 600 eläintä.	

<p><b>Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b></p>	<p>Hankkeessa eläimille aiheutuu haittaa kirurgisesta selkäydinvaurion indusoinnista, lääkkeiden annostelusta sekä käyttäytymistutkimuksista. Selkäydinvaurion jälkeen hemitrauman kokeilla eläimillä on väliaikainen (1–3 päivää) vasemman tai oikean puolen halvaantuminen. Kirurgian jälkeinen kipu kestää noin 3 päivää, jolloin eläimet liikkuvat vähän ja voivat menettää maksimissaan 25 % painostaan. Ensimmäisen viikon loppuun mennessä selkäydinvaurion läpikäyneet eläimet aktivoituvat ja aloittavat normaalin syömisen ja saavuttavat takaisin menettämänsä painoaan. Ne eläimet, jotka eivät saavuta itsenäistä liikumista ja syömiskäyttäytymistä 4 päivää vaurion aiheuttamisesta jälkeen lopetetaan. Eläimet lopetetaan kokeen päätyttyä.</p> <p><b>Vakavuusluokat: vakava</b></p>
<p><b>3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b></p>	
<p><b>1. Korvaaminen - Replacement</b> <b>Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</b></p>	<p>Soluviljelymallien perusteella tapahtuva lääkeaihioiden seulonta vähentää huomattavasti koe-eläinten käyttöä. Työssä on tähän mennessä selvitetty laajasti lääkeaihioiden regeneraatiota edistävää vaikutusta käyttämällä keskushermoston soluja viljelmässä.</p> <p>Menetelmässä seurataan lääkeaihioiden kykyä edistää hermosoluverkostojen kehittymistä viljelmässä. Kudoksen hermosoluverkostot ovat kuitenkin monimutkaisia rakenteita, eikä niiden kaikkia ominaisuuksia voida todentaa soluviljelmässä. Siksi lupaavimmat lääkeaihiot on tutkittava lisäksi elävässä eläimessä.</p>
<p><b>2. Vähentäminen - Reduction</b> <b>Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</b></p>	<p>Käytettävät menetelmät ovat tieteellisen kirjallisuuden perusteella validoituja, mikä odotettavasti vähentää turhia toistoja ja siten käytettäviä eläinmääriä.</p>
<p><b>3. Parantaminen - Refinement</b> <b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b> <b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b> <b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b></p>	<p><b>a, b)</b> Hiirimallien käytöllä on regeneraatiotutkimuksessa keskeinen asema, ja käytettävät koeasetelmat ovat hyvin testattuja nimenomaan hiirillä. Transgeeniset eläinmallit, joita regeneraatiotutkimus käyttää, ovat nimenomaan saatavissa hiirinä ja mahdollisesti tulevaisuudessa tarvittavat transgeeniset mallit tulevat mitä todennäköisimmin edelleen perustumaan hiiren käyttöön koe-eläimenä.</p> <p><b>c)</b> Kirurgisten toimenpiteiden yhteydessä ilmenevää kipua ja turvotusta lievitetään kipulääkityksellä ja steroidilääkityksellä, tarvittaessa jo ennen kirurgiaan ryhtymistä. Lisäksi eläinten toimimista edistetään käyttämällä pehmeää ja lämmittävää pesämateriaalia, lämmittävää alustaa ja nestemäistä ruokaa.</p>
<p><b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b></p>	<p>KYLLÄ</p>

## TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

### Lääkeaihiot selkäydinaurion parantamiseksi

#### Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Käytetään apinoita

Muu peruste

#### Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli modifioida keskushermoston soluväliainetta siten että se edistäisi hermosoluyhteyksien kasvua trauman jälkeen. Vauriomallina olemme käyttäneet lähinnä selkäytimen hemisektiota ja hemikontuusiota C4-alueella hiirillä ja selvittäneet motoristen funktioiden palautumista käyttäytymiskokeilla. Lääkeaihioina olemme käyttäneet keskushermoston soluväliaineen kondroitiinisulfaattiproteoglykaaneihin voimakkaasti sitoutuvia proteiineja HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule; pleiotrophin) ja LMWP (low-molecular weight protamine). Molemmat lääkeaihiot muuttavat keskushermoston soluväliainetta siten, että estovaikutuksen sijaan nähdään edistävä vaikutus hermosolujen yhteyksien kasvuun keskushermoston soluviljelymallissa. C4-alueen vauriomallissa hiirillä nähdään motoristen funktioiden palautumista erityisesti testeissä, jotka vaativat koordinaatiota, kuten tikkailla kiipeäminen ja vaurioitettun puolen eturaajan käyttö. Yleinen motorinen aktiivisuus taas säilyy olennaisesti samana lääkeaihioilla hoidetuissa hiirissä ja kontrollihiirissä. Mainittujen tulosten perusteella tutkimuksen tavoite on olennaisesti saavutettu, ja erityisesti LMWP on jatkoselvittelyn aiheena mahdollisten kliinisten sovellusten suuntaan. Tutkimussarjasta on laadittu kaksi alustavaa käsikirjoitusta, jotka on tarkoitus saada valmiiksi ja julkaista kansainvälisissä asiantuntija-arviointia käyttävissä tieteellisissä sarjoissa vuoden kuluessa.

#### Todelliset haittavaikutukset: eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

-	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret ( <i>Mus musculus</i> ) [A1]	1	7	200	2

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

Koe-eläinluvan mukainen maksimaalinen vakavuustaso (SV4) koski vain harvoja eläimiä, jotka suljettiin pois kokeista eettisistä tai käytännöllisistä syistä, jotka aiheuttivat hankaluuksia toipumisen seurannassa. Kirurgisen toimenpiteen aiheuttamana komplikaationa muutamalla eläimellä esiintyi vakava motorinen ongelma molemmilla puolilla mikä vaikeutti eläinten itsenäistä liikkumista, syömistä ja rakon hallintaa. Useimmissa tapauksissa eläimillä oli kipua 3–4 päivää, minkä jälkeen niiden paino alkoi nousta. Useimmiten oli mahdollista tehdä yksinkertaisia käyttäytymistestejä (avokenttatesti, sylinteritesti) 1 viikon jälkeen, kun eläimet kykenivät liikkumaan vapaasti. Vaikeammat testit, jotka vaativat eläimiltä enemmän fyysistä ponnistelua, kuten pyörivällä tangolla pysyminen, kiipeämistesti ja tarttumislujuustesti, aloitettiin vasta lihaksen ja ihon haavojen parannuttua 2 viikkoa kirurgian jälkeen. Kaiken kaikkiaan useimmilla eläimillä vakavuustaso oli kohtalainen (SV3) eikä maksimaalinen (SV4).

Yleensä traumatisoitujen eläinten funktiot ovat alentuneet eturaajan tarttumislujuustestissä, vertikaalisessa kiipeämisnopeudessa ja taipumuksessa käyttää vaurioitettua puolta (sylinteritesti), kun taas lokomotorinen aktiviteetti (avokenttätesti) ja motorinen koordinaatio (pyörivällä tangolla pysyminen) ovat vain vähän alentuneet tai intaktit. Useimmissa tapauksissa paino saavuttaa kontrollitason 8 viikon kuluttua. Selkäydintrauman malli sisältää komplisoidun kirurgian, johon sisältyy monia riskitekijöitä minkä vuoksi kokeiden valmistelun tulee olla täsmällistä ja eläinten hoidon tulee olla intensiivistä muutama päivä kirurgian jälkeen. Kuitenkin jo 2 viikkoa kirurgian jälkeen

haavojen parannuttua eläimet ovat aktiivisia eikä niillä näytä olevan mitään selkeästi havaittavia ongelmia. Lisäksi eläimille tehtiin allodyniatesti lisääntyneen neurologisen kivun toteamiseksi ja anhedoniatesti (mieltymys sakkariiniliuokseen) mahdollisten depression oireiden toteamiseksi 8 viikkoa trauman jälkeen. Merkittäviä eroja ei havaittu kontrollieläinten ja vaurioitettujen eläinten välillä. Sen vuoksi uskomme, että käyttäytymiskokeissa käytettyjen eläinten stressitaso ei ole huomattava (SV3, Kohtalainen).

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

Yleensä traumatisoitujen eläinten funktiot olivat alentuneet eturaajan tarttumislujuustestissä, vertikaalisessa kiipeämisenopeudessa ja vaurioitetun puolen käytössä (sylinteritesti), kun taas lokomotorinen aktiviteetti (avokenttätesti) ja motorinen koordinaatio (pyörivällä tangolla pysyminen) olivat vain vähän alentuneet tai intaktit. Jo 2 viikkoa kirurgian jälkeen haavojen parannuttua eläimet olivat aktiivisia eikä niillä näyttänyt olevan mitään selkeästi havaittavia ongelmia. Useimmissa tapauksissa paino saavutti kontrollitason 8 viikon kuluttua. Lisäksi eläimille tehtiin allodyniatesti lisääntyneen neurologisen kivun toteamiseksi ja anhedoniatesti (mieltymys sakkariiniliuokseen) mahdollisten depression oireiden toteamiseksi 8 viikkoa trauman jälkeen. Merkittäviä eroja ei havaittu kontrollieläinten ja vaurioitettujen eläinten välillä. Kaiken kaikkiaan hengissä pidetyt eläimet selvisivät tutkimussarjoista ennakoitua vähemmällä ongelmilla. Kaikki tutkimussarjasta selvinneet eläimet käytettiin kokeiden loputtua elinten keräämiseen histologiaa ja immunohistokemiaa varten, mikä vähentää tarvittavien eläinten määrää ja tarkentaa tutkimussarjasta saatua tietoa.

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

#### **Korvaaminen**

Soluviljelymallien perusteella tapahtuva lääkeaihioiden seulonta vähensi huomattavasti koe-eläinten käyttöä. Työssä on tähän mennessä selvitetty laajasti lääkeaihioiden regeneraatiota edistävää vaikutusta käyttämällä keskushermoston soluja viljelmässä. Menetelmässä seurataan lääkeaihioiden kykyä edistää hermosoluverkostojen kehittymistä primäärisessä neuroniviljelmässä. Kudoksen hermosoluverkostot ovat kuitenkin monimutkaisia rakenteita, eikä niiden kaikkia ominaisuuksia voida todentaa soluviljelmässä. Siksi lupaavimmat lääkeaihiot on tutkittava lisäksi elävässä eläimessä.

#### **Vähentäminen**

- 1) Käytetyt menetelmät ovat tieteellisen kirjallisuuden perusteella validoituja, mikä odotettavasti vähentää turhia toistoja ja siten käytettäviä eläinmääriä.
- 2) Olemme pyrkineet välttämään eläinten käyttöä pelkästään histologisiin analyysiin. Aina kun se on ollut mahdollista, olemme käyttäneet käyttäytymiskokeista tulevia eläimiä histologisiin analyysiin. Olemme käyttäneet vähemmän eläimiä kuin esitimme koesuunnitelmassa, osin yllä mainitusta syistä johtuen, osin taloudellisista syistä. Tulevissa kokeissa käytännön kokemuksemme auttaa varautumaan mahdollisiin komplikaatioihin mikä edistää eläinmäärien vähentämistä.

#### **Parantaminen**

- 1) Kirurgisten toimenpiteiden yhteydessä ilmenevää kipua ja turvotusta lievitettiin kipulääkityksellä ja steroidilääkityksellä, tarvittaessa jo ennen kirurgiaan ryhtymistä. Lisäksi eläinten toipumista edistettiin käyttämällä pehmeää ja lämmittävää pesämateriaalia, lämmittävää alustaa ja nestemäistä ruokaa.
- 2) Olemme kokeilleet eri hiirilinjojen soveltuvuutta kokeisiimme komplikaatioiden vähentämiseksi. Olemme havainneet, että FVB-linja kestää erinomaisesti kirurgiaa mutta siinä esiintyy poikkeavuuksia käyttäytymisessä mikä hankaloittaa käyttäytymistestien arviointia. C57B16-linjassa esiintyy enemmän anestesiakomplikaatioita, herkkyyttä infektioihin ja iho-ongelmiin mutta linja

on soveltuvampi käyttäytymistesteihin. Mainitut tiedot ovat hyödyllisiä tulevien kokeiden suunnittelussa.

3) Kirjallisuuden mukaan eläinten pitäminen ryhmissä ja sosiaalinen vuorovaikutus edistävät paranemista eri taudeissa. Aina kun se on mahdollista, pyrimme käyttämään ryhminä naarashiiriä pitkäaikaisissa kokeissa, joihin liittyy kivuliasta kirurgiaa minkä jälkeen seuraa useita käyttäytymistestejä. Ryhminä pidetyt naarashiiret tappelevat harvoin, mikä on hyvin tärkeää kirurgiasta toipumisen ja käyttäytymistestien tulkinnan kannalta.

#### **Muu: korvaavien menetelmien jakaminen**

Kykenimme lisäämään huomattavasti eläinten hengissä pysymistä ja vähentämään eläinten ongelmia kokeellisessa kaularangan alueen selkäydinkirurgiassa. Kirurgiassa käytettävän anestesian ja kirurgian jälkeisen hoidon kehittäminen vähentävät käytettävien eläinten määrää ja kirurgian jälkeen ilmeneviä komplikaatioita. Olemme identifioineet parhaimmin soveltuvat käyttäytymistestit funktionaalisen regeneraation toteamiseksi selkäytimen hemisektiossa ja hemikontuusiossa C4-alueella hiirissä, mikä lisää kokeiden toistettavuutta ja mahdollisuutta käyttää niitä lääkekehityksessä. Pyrimme jakamaan havaintomme kahdessa julkaisussa kansainväliselle tiedeyhteisölle.

<b>YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ</b>		
<b>Hankkeen nimi</b>	Clostridium botulinumin neurotoksiinituotantoon ja taudinaiheutukseen vaikuttavat tekijät	
<b>Hankeluvan kesto</b>	3 vuotta	
<b>Avainsanat</b>	Clostridium botulinum, botulinumneurotoksiini, botuliini, botulismi	
<b>Hankkeen tarkoitus</b>	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Ei
	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
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	Clostridium botulinum –bakteeri tuottaa kasvaessaan voimak- kainta tunnettua myrkkyä, botuliinia, joka on hermomyrkky ja aiheuttaa ihmiselle henkeä uhkaavan botulismien. Botulismille on tyypillistä nelirajahalvaus. Yleisimmin botulismi saadaan ruokamyrkytyksenä kun C. botulinumin itiöitä on joutunut ruo- kaan ja ne ovat ruuan säilytyksen aikana itäneet, lisääntyneet ja tuottaneet botuliinia. Erityisesti pakattuihin ja pitkään säilytet- täviin elintarvikkeisiin liittyy botulismiriski. Tekijöitä, jotka vai- kuttavat C. botulinumin neurotoksiinituotantoon tai toksiinin taudinaiheutukseen ihmisen elimistössä, ei tunneta hyvin. Tässä tutkimuksessa selvitetään näitä tekijöitä.	
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)</b>	C. botulinum –kantojen neurotoksiinituotannon säätelymekan- ismien ja toksiinin rakenteeseen ja taudinaiheutukseen liitty- vien proteiinien tunteminen on välttämätöntä niin botulismien epidemiologian ja patogeenin ymmärtämisen ja hoitokeino- jen kehittämisen kuin elintarvike- ja lääketieteellisuuden proses- sien hallitsemisen kannalta.	

	Tutkimuksella tuotetaan tärkeää perustietoa, jonka avulla elintarvikkeisiin liittyvää botulismiriskiä voitaisiin hallita nykyistä paremmin.
<b>Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät</b>	hiiri, 3500 kpl
<b>Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b>	<p>Koe perustuu näyteuutteen ruiskuttamiseen hiiren vatsaonteloon (ip) tai annostelemiseen suun kautta (po) ja botulismille tyypillisten oireiden havaitsemiseen positiivisten näytteiden kohdalla. Näytteenantotoimenpide aiheuttaa eläimille lievää ja lyhtyaikaista kipua tai stressiä. Botulismi aiheuttaa eläimille halvaantumisoireet, mutta ei kipua eikä tajunnanmenetystä. Halvauksen edetessä hengitys vaikeutuu ja pysähtyy kokonaan. Eläimet pyritään lopettamaan ennen taudin etenemistä tähän vaiheeseen. Seuranta-ajan päätyttyä eläimet lopetetaan.</p> <p><b>Vakavuusluokat: vakava</b></p>
<b>3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b>	
<b>1. Korvaaminen - Replacement</b> <b>Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</b>	Hiiren letaalikoe on ainoa botulinumneurotoksiinin osoittamiseen standardoitu menetelmä. Koe osoittaa myös toksiinin biologisen aktiivisuuden, mikä ei ole mahdollista esim. tutkimuskäyttöön suunnitelluilla immunologisilla tai DNA/RNA-pohjaisilla in vitro -testeillä.
<b>2. Vähentäminen - Reduction</b> <b>Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</b>	Tutkimuksessa seulotaan suuri määrä C. botulinum GM-kantoja in vitro -testein (ELISA/qPCR) ja vain lupaavimmat kandidaatit valitaan hiirikokeeseen geenimutaation aiheuttaman toksiiniaktiivisuuden muutoksen osoittamiseksi. Sopivimmat näytelaimennokset valitaan hiirikokeeseen ELISA-testin tulosten perusteella ja kokeen ensimmäisessä vaiheessa seulotaan sopivimmat 10-kertaiset näytelaimennokset käyttämällä 2 hiirtä/näytelaimennos. Varsinaisessa toksisuuskokeessa käytetään tarkempaa laimennossarjaa ja tutkitaan 5 hiirtä/näytelaimennos tilastollisen luotettavuuden takaamiseksi.
<b>3. Parantaminen - Refinement</b> <b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b> <b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b> <b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b>	<p>a, b) Hiiren herkkyys botulinumneurotoksiinille on samaa luokkaa kuin ihmisen, mikä puoltaa hiiren käyttöä toksiiniosoitustestissä. Hiiren letaalikoe on ainoa botulinumtoksiinin osoittamiseen tarkoitettu standardimenetelmä.</p> <p>c) Eläimet lopetetaan tyypillisten botulismioireiden (tai muiden sairauden oireiden) ilmaannuttua. Botulismi aiheuttaa eläimille halvaantumisoireet, mutta ei kipua eikä tajunnanmenetystä. Halvauksen edetessä hengitys vaikeutuu ja pysähtyy kokonaan. Eläimet pyritään lopettamaan ennen taudin etenemistä tähän vaiheeseen.</p> <p>Vatsaonteloon (ip) näytettä ruiskutettaessa injektion jälkeen eläimiä seurataan 1–2 h välein ensimmäisen 12 h aikana, jolloin 95 %:ssa tapauksista botulismioireet kehittyvät. Laboratoriolamme on pitkäaikainen kokemus ip-testin oireiden kehittymisen seuraamisessa.</p> <p>Suun kautta (po) näytettä annosteltaessa tehdään ensin po-pi-lottikoe, jonka tarkoituksena on kartoittaa mahdollisimman</p>

	aikaisessa vaiheessa ilmenevät, botulismiin johtavat irreversibelit oireet, joiden perusteella eläimet voidaan lopettaa ennen varsinaisen systeemisen botulismien kehittymistä ja siten vähentää eläinten kokemaa kärsimystä (humane end point). Pilottikokeen tulosten perusteella valitaan sopiva seurantatiheys varsinaisiin toksisuuskokeisiin.
<b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b>	KYLLÄ

## TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

### Clostridium botulinumin neurotoksiinituotantoon ja taudinaiheutukseen vaikuttavat tekijät

#### Takautuvan arvioinnin perusteet

- X Sisältää vakavia toimenpiteitä
- Käytetään apinoita
- Muu peruste

#### Tavoitteiden saavuttaminen

Clostridium botulinum –bakteeri tuottaa kasvaessaan voimakkainta tunnettua myrkkyä, botuliinia, joka on hermomyrkky ja aiheuttaa ihmiselle henkeä uhkaavan botulismien. Botulismille on tyyppilistä nelirajahalvaus. Tekijöitä, jotka vaikuttavat C. botulinumin tuottaman toksinin taudinaiheutukseen ihmisen elimistössä, ei tunneta hyvin.

Hankkeen tavoitteet saavutettiin pääpiirteittäin. Tutkimuksessa selvitettiin toksiinituotantoon liittyvien, toistaiseksi tuntemattomien proteiinien roolia botulinum-toksiinin taudinaiheutuksessa. Tutkituilla proteiineilla oli oleellinen vaikutus botuliinin oraaliseen toksisuuteen. C. botulinum –kantojen taudinaiheutukseen liittyvien proteiinien tunteminen on välttämätöntä patogeenien ymmärtämisen sekä elintarvike- ja lääketeollisuuden prosessien hallitsemisen kannalta. Hankkeen tuloksia ei ole vielä julkaistu. Tuloksia käsittelevä käsikirjoitus on työn alla ja se lähetetään arvioitavaksi vertaisarvioituun, kansainväliseen tieteelliseen lehteen keväeseen 2023 mennessä. Julkaisun odotetaan tarkentavan ja osin muuttavan tiedeyhteisön käsitystä botulinumtoksiinin patogeenisistä ja yleisemmin oraalisesti vaikuttavien toksinien toiminnasta.

#### Todelliset haittavaikutukset: eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

-	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (Mus musculus) [A1]	0	374	212	180

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

Hankkeessa käytettyjen eläinten määrä on ennakoitua määrää pienempi. Tutkimuksessa seulottiin suuri määrä GM-kantoja in vitro -määrityksillä ja vain pieni osa osoittautui lupaaviksi kandidaateiksi, jotka tutkittiin hiirikokeissa.

Covid-19 pandemian aikana hankkeen eteneminen hidastui.

Ennakoitu vakavuusluokka oli "vakava" kaikille eläimille. Suurella osalla eläimistä esiintyi kuitenkin vain lieviä tai kohtalaisia oireita, joten todellinen eläinmäärä luokassa "vakava" oli ennakoitua matalampi.

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

Eläinten kohtalo vastasi ennakoitua kohtaloa täysin.

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

#### **Korvaaminen**

Ei voida korvata. Eläinkoe on edelleen ainoa menetelmä, joka huomioi sekä toksiinin imeytymisreitit että sen tunkeutumisen presynaptiseen hermosoluun ja endopeptidaasiaktiivisuuden hermosolussa.

#### **Vähentäminen**

Tutkimuksessa seulottiin suuri määrä GM-kantoja in vitro -määrittelyillä ja vain lupaavimmat kandidaatit käytettiin hiirikokeissa. Toteutuneiden kokeiden osalta hiirten määrä vastasi ennakoitua.

#### **Parantaminen**

Eläinkoe on edelleen tarkoituksenmukaisin. Se on ainoa menetelmä, joka huomioi sekä toksiinin imeytymisreitit että sen tunkeutumisen presynaptiseen hermosoluun ja endopeptidaasiaktiivisuuden hermosolussa.

Käytimme joustavia silikonisyöttöneuloja teräsneulujen sijaan vähentääksemme hiirten loukkaantumisriskiä ja tarpeetonta kipua.

#### **Muu: korvaavien menetelmien jakaminen**

Joustavien silikonisyöttöneulujen käyttöönotosta teräsneulujen sijaan on keskusteltu toimenpiteitä tekevien henkilöiden ja vastuullisten eläinlääkärien kanssa. Aiheeseen liittyvää laboratorio-ohjetta on tarkistettu. Joustavien syöttöneulujen hyöty kuvataan myös hankkeen tieteellisessä julkaisussa.

<b>YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ</b>		
<b>Hankkeen nimi</b>	Lääkeaineiden tehon testaaminen epilepsian ja migreenin prekliinisissä tautimalleissa	
<b>Hankeluvan kesto</b>	3 vuotta	
<b>Avainsanat</b>	Epilepsia, migreeni, lääketutkimus, prekliininen	
<b>Hankkeen tarkoitus</b>	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
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	Epilepsian ja migreenin hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lää- keaineita. Molemmat sairaudet aiheuttavat potilaille ja heidän omaisilleen kärsimystä ja niistä koituu yhteiskunnalle huomatta- via kustannuksia. Yritys tarjoaa lääkekehitysteollisuudelle in vivo -eläinmalleja lupaavien lääkeaineiden prekliiniseen tes- taukseen. Tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeai- neiden etenemistä klinisiin kokeisiin.	
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)</b>	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja migree- niin ja epilepsiaan. Tutkimusmallien käyttö edistää myös em. tautien mekanismien tutkimista, mikä edesauttaa uusien lää- keiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.	
<b>Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät</b>	1500 rottaa, 1050 hiirtä.	

<p><b>Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b></p>	<p>Tutkimuksessa eläimille aiheutuu haittaa kirurgisista toimenpiteistä, indusoidusta sairaustilasta, annosteluista, näytteenotoista sekä yksinpidosta seuranta-aikana. Tutkimuksen päätteeksi eläimet lopetetaan.</p> <p><b>Vakavuusluokat: lievä, vakava</b></p>
<p><b>3R-menettelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b></p>	
<p><b>1. Korvaaminen - Replacement</b>  <b>Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</b></p>	<p><b>1. Replacement</b>  In vitro -mallit migreenin ja epilepsian tutkimiseksi ovat hyvin rajalliset johtuen taudin moniulotteisuudesta, käsittäen hermoverkkojen yhteistoiminnan eri aivoalueiden välillä sekä keskushermostoon liittyvän patologian. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä kokeita. Myöskään tietokonepohjaiset simulaatiot epilepsian ja migreenin tutkimuksessa eivät ole mahdollisia johtuen taudin mekanismien monimutkaisuudesta.</p>
<p><b>2. Vähentäminen - Reduction</b>  <b>Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</b></p>	<p><b>2. Reduction</b>  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) ja joka määrittää koe-eläinten käytön määrän kussakin koeasetelmassa. Perusteellisen validaatiotyön ja tilastollisen voima-analyysin perusteella voidaan luotettavasti ennustaa soveltuvat ryhmäkoot, jotka minimoivat eläinten käytön alimpaan mahdolliseen ilman että koeasetelman tilastollinen voima vaarantuu.</p>
<p><b>3. Parantaminen - Refinement</b>  <b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b>  <b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b>  <b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b></p>	<p><b>3. Refinement</b>  Suurin osa epilepsian ja migreenin eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä, etenkin rotissa. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille lääkkeille ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Tutkimuksissa voidaan käyttää joko rottia tai hiiriä riippuen lääkekehitystyön tarpeista. On mahdollista, että aikaisempi tutkimusaineisto (esim. farmakokineettiset tulokset) on olemassa esim. rotissa. Tällöin on luontevaa, että itse tutkimukset tehdään samalla lajilla. Alemmilla selkärankaisilla tai in vitro -menetelmin ei voida saada samanlaista tietoa uusien lääkeaineiden tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole standardoituja 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. Yksinpidon aiheuttamaa haittaa pienennetään virikkeiden avulla.</p> <p>Epilepsia-kohtaukset voidaan havaita joko EEG-signaalista tai eläinten käyttäytymisestä. Epilepsia-kohtauksista rotalle</p>

	aiheutuu tiettyjen aivoalueiden solutuhoa. Epilepsian indusointia seuraavina päivinä kohtausten voimakkuutta ja kestoja voidaan seurata eläinkohtaisen seurantalomakkeen avulla. Lomakkeeseen kirjataan tietyllä ajanjaksolla havaitut kohtaukset ja muut mahdolliset käyttäytymismuutokset (paino, turkin kunto, aggressiivinen käyttäytyminen, liikkuminen (ataxia), hännän asento, kääntymisrefleksi yms.). Kohtausten väillä eläinten ulkoisessa habituksessa ja käyttäytymisessä ei välttämättä nähdä merkittäviä muutoksia. Eläimillä havaitaan kuitenkin esim. turkin pörröisyyttä ja mahdollisesti painon laskua. Muuten eläimet pystyvät liikkumaan normaalisti. Pääsääntöisesti eläimet toipuvat hyvin kohtauksista.
<b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b>	KYLLÄ

## TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

### Lääkeaineiden tehon testaaminen epilepsian ja migreenin prekliinisissä tautimalleissa

#### Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Käytetään apinoita

Muu peruste

#### Tavoitteiden saavuttaminen

Käytetyt eläinmallit toimivat odotetusti ja antoivat luotettavia tuloksia lääkeaineiden tehokkuudesta. Migreenimalleissa tehdyt käyttäytymistestit osoittivat huomattavaa vaihtelua eläinten välillä ja valitettavasti suurempia ryhmäkokoja ja toistokokeita tarvittiin tulosten varmistamiseksi.

#### Todelliset haittavaikutukset: eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

-	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (Mus musculus) [A1]	0	58	492	0
Rotat (Rattus norvegicus) [A2]	236	359	188	0

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

Epilepsia osahankkeen kohdalla ei tehty lainkaan kokeita, joissa eläin olisi ollut hereillä epilepsian indusoinnin aikana. Luvan voimassaoloaikana tehtiin ainoastaan tutkimuksia, joissa eläimet olivat terminaalianestesiassa epilepsian indusoinnin aikana ja kohtauksia seurattiin MRI-mittauksessa. Eläimet lopetettiin seurannan päätteeksi. Kuolleisuutta ei ilmaantunut. Tässä osahankkeessa vakavin haitta (lievä) aiheutui mittausta edeltävästä lääkinnästä. Eläimiä käytettiin huomattavasti vähemmän kuin mihin lupaa hakiessa varauduttiin (120 rottaa, 0 hiirtä).

Migreeni osahankkeen kohdalla alkuperäisen luvan arvioitiin asettuvan luokkaan lievä, sillä kokeita suunniteltiin tehtävän vain esilääkityillä eläimillä terminaalianestesiassa. Lualle kuitenkin haettiin muutos, joka nosti osassa kokeita vakavuusluokan kohtalaiseen, sillä migreeni aiheutettiin hereillä olevalle eläimelle. Käyttäytymistestitulosten perusteella näissä kokeissa voitiin myös todeta eläinten kokevan lievää/kohtalaista päänsärkyä. Eläimiä käytettiin 663 rottaa, 550 hiirtä.

## 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

Korvaavia menetelmiä ei pystytty määrittämään.

### Vähentäminen

Käytetyt eläinmäärät ovat pitkälti koeasetelmasta riippuvia. Kokeita suunnitellessa on haettu tasapainoa mahdollisimman pienten ryhmäkokojen ja tilastollisesti merkitsevien eläinmäärien välillä siten, että kaikki tarvittavat verrokkiryhmät kuitenkin otetaan mukaan kokeisiin. Eläinmääräarviot tutkimusmalleissa pohjautuvat validaatiokokeisiin, joiden tarkoituksena on ollut varmistaa mallin toistettavuus, mahdollinen kuolleisuus sekä mahdolliset muut kokeen kannalta kriittiset tekijät. Hankkeen aikana on parannettu eläinten satunnaista jakamista tutkimusryhmiin. Tämän seurauksena ns. malliin sopimattomat eläimet pystyttiin poistamaan ennen lääkinnän/testauksen aloittamista. Tämä vähensi eläinten määrää varsinaisena testipäivänä.

### Parantaminen

Epilepsiamallissa eläinmäärät olivat arvioitua pienemmät, koska tarvetta tehdä testejä hereillä olevilla eläimillä ei ollut.

Liian monimutkaiset migreenimallit, joissa kirurgisen operaation jälkeen pyrittiin indusoimaan migreeniä annostelulla aivokalvon pinnalle, voidaan onnistumisprosentin ja saatujen tulosten perusteella hylätä jatkossa. Nämä liian monimutkaiset migreenimallit eivät ole toistettavia ja luotettavat keinot eläimen aistimalle kivulle eivät olleet mitattavissa käyttämillämme kiputesteillä.

Satunnaisia haittoja eläimille voidaan vähentää kiinnittämällä huomiota eläinten käsittelyyn.

### Muu: korvaavien menetelmien jakaminen

Kokemuksista kerrotaan sopivissa tilanteissa.

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
<b>Hankkeen nimi</b>	Sydän- ja verisuonitautien geneettiset tekijät ja molekulaariset mekanismit	
<b>Hankeluvan kesto</b>	3 vuotta	
<b>Avainsanat</b>	Ateroskleroosi, sydänsairaudet, perintötekijät, tautimallit	
<b>Hankkeen tarkoitus</b>	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	Kyllä	
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tieteellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	Valtimonkovettumatauti ja sen aiheuttamat sydänkomplikaatiot ovat monista hoitomuodoista huolimatta edelleen merkittävä kuolleisuuden aiheuttaja länsimaissa. Hankkeessa pyritään selvittämään erilaisten geneettisten tekijöiden vaikutusta sydän- ja verisuonisairauksiin kuten ateroskleroosiin, sydäninfarktiin ja sydänlihaksen liikakasvuun. Hankkeessa käytetään	

	tutkimusryhmässämme vakiintuneita sydän- ja verisuonitautimalleja erilaisissa muunto- tai siirtogeenisissä hiirilinjoissa, jolloin voidaan tutkia esimerkiksi yksittäisten geenien ilmentymisen vaikutusta taudin kulkuun.
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)</b>	Sydän- ja verisuonisairauksien tautimekanismien tuntemus on edellytys olemassa olevien hoitomuotojen kehittämiseksi tai uusien hoitomuotojen luomiselle. Tässä hankkeessa kuvattu tutkimus hiirimalleilla luo tärkeän jatkumon solukokeista saaduille tuloksille. Hiirimallit tarjoavat tärkeän työkalun selvittää tarkemmin kliinisestä tutkimuksesta saatuja tuloksia, etenkin tautimekanismien osalta. Hankkeeseen liittyvän tutkimuksen tarkoituksena on löytää uusia geeniterapian mahdollisuuksia ja tietoa sydän- ja verisuonisairauksien tautimekanismeista.
<b>Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät</b>	Hiiri, 1890 eläintä
<b>Ennakoidut haitat eläimille, arvioitavat vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b>	Osalla geenimuunnelluista hiirikannoista on selkeä eliniän lyhentymisen (äkkikuolemia) ja osalle voi kehittyä luustohäiriöitä. Haittaa aiheutuu myös sydänlihaksen hypertrofian indusoinnista (kirurginen/kemiallinen), aineenvaihduntatutkimuksista ja runsasrasvaisesta ruokavaliosta (iho-oireina kutina ja raapiminen). Lievää haittaa aiheutuu tutkittavien aineiden annosteluista tai verinäytteenotoista. Kaikkien kokeiden jälkeen hiiret lopetetaan.  <b>Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava</b>
<b>3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b>	
<b>1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</b>	Sydän ja verisuonisairauksien molekulaaristen mekanismien tutkiminen vaatii kehittyneen sydän- ja verenkiertoelimistön, jotta tulosten merkittävyyttä ihmisille olisi mahdollista arvioida. Hiiren suonisto on tarpeeksi kehittynyt ja suuri kirurgisiin operaatioihin. Lisäksi geenien puutteen tai yli-ilmentymisen systeemisiä vaikutuksia on mahdollista tutkia erilaisissa muuntogeenisissä hiirimalleissa. Valtimonkovettumataudin kehittyminen on pitkäaikainen useiden vuosien prosessi, jonka tutkimiseen elävä eläinmalli on ainoa mahdollisuus saada tutkimustietoa taudin kehittymiseen liittyvistä tapahtumista. Sydän- ja verenkiertoelimistön tutkiminen ilman koe-eläinten käyttöä ei ole informatiivista, sillä soluviljelmissä mm. virtausstressin ja painekuormituksen vaikutukset puuttuvat, samoin eläimen hormonitoiminnan vaikutukset.
<b>2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</b>	Tutkimuksessa käytetään sisäsiittoisina ylläpidettäviä muuntogeenisiä hiirikantoja, joiden perimä on lähes identtinen. Näin vähennetään tulosten hajontaa. Tämän lisäksi kokeiden uusimisen tarvetta vähennetään huolellisella kokeiden suunnittelulla ja pitämällä ryhmäkoot riittävän suurina, jotta varmistetaan luotettavien tulosten saaminen. Kokeissa käytettävien siirtogeenien oikeanlainen toiminta varmistetaan solukokein ennen eläinkokeita.
<b>3. Parantaminen - Refinement</b>	a) ja b) Muuntogeeninen hiiri mallintaa hyvin ihmisen sairautta, koska sillä on kehittynyt monimutkainen sydän- ja

<p><b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b></p> <p><b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b></p> <p><b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b></p>	<p>verenkiertoelimistö. Hiiri on myös hyvin yleisesti käytössä oleva eläinlaji sydän- ja verisuonitutkimuksessa, joten saadut tulokset ovat vertailukelpoisia kansainvälisesti.</p> <p>c) Eläimille aiheutettu haitta minimoidaan käyttämällä mahdollisimman ei-invasiivisia menetelmiä (esim. kuvantaminen) sekä käyttämällä tehokkaita anesteetteja ja kivunlievitystä. Kokeissa on käytössä selkeät lopetuskriteerit, joiden täyttyessä eläin poistetaan kokeesta. Kaikki toimenpiteet toteutetaan koulutettujen ja koe-eläintyöhön harjaantuneiden henkilöiden toimesta, jolloin eläimille aiheutettu haitta on minimoitu.</p>
<p><b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b></p>	<p>KYLLÄ</p>

## TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

### Sydän- ja verisuonitautien geneettiset tekijät ja molekulaariset mekanismit

#### Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Käytetään apinoita

Muu peruste

#### Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli eläinmalleja hyödyntämällä tutkia sydän- ja verisuonisairauksien geneettisiä- ja molekulaarisia mekanismeja, sekä selvittää niihin liittyviä geeniterapiamahdollisuuksia. Sydän- ja verisuonisairaudet ovat syöpien ohella merkittävin kuolinsyy länsimaissa, ja Suomessakin vuonna 2019 34 prosenttia kuolemista johtui verenkiertoelinten sairauksista (Suomen virallinen tilasto (SVT): Kuolemansyyt 2029). Tässä hankkeessa saatiin arvokasta uutta tietoa sydänsairauksiin liittyvistä geneettisistä tekijöistä ja signalointireiteistä, ja hankkeen tuloksia on jo julkaistu tieteellisissä lehdissä. Lisäksi artikkeleita ja väitöskirjoja on vielä julkaisuprosessissa. Hankkeen aikana selvitimme muun muassa, miten BMP6/TAZ-Hippo –signalointireitti säätelee uudisverisuonten syntyä, ja voisi taten toimia terapiakohteena sydänsairauksissa ja syövässä. Havaitimme myös, että VEGFR-1 signalointi säätelee sydämen vasteita kohonneeseen verenpaineeseen, ja häiriöt signalointireitissä altistavat sydämen vajaatoiminnalle ja äkkikuolemille. Löydöstä on hyötyä kehitetäessä hoitomuotoja sydämen vajaatoimintaan. Hankkeessa tutkittiin myös virusvektorien toimintaa ja biodistributiota tulevaisuuden geeniterapiamuotoja silmällä pitäen. Hankkeessa käytetyt muuntogeeniset eläinmallit olivat tarkoituksenmukaisia, eikä hankkeen tavoitteita olisi voitu saavuttaa ilman niiden käyttöä. Hankkeesta saatiin runsaasti näytteitä ja tutkimusmateriaalia, joita voidaan hyödyntää myös tulevaisuudessa.

#### Todelliset haittavaikutukset: eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

-	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret ( <i>Mus musculus</i> ) [A1]	110	458	608	45

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

Hankkeessa käytettiin 2152 hiirtä. Jouduimme hakemaan eläinmäärän lisäystä 400 hiirellä, koska poikasmääriä on hankala arvioida ennakkoon ja luvalla oli ylläpidossa muutama hyvinvointiongelmaiseksi luokiteltu kanta, joiden poikaset syntyivät suoraan luvalla. Näin ollen myös villityypit ja parituseläimet veivät kapasiteettia luvalla, ja suurin osa hankkeen hiiristä (931 kpl) tilastoitiin luokkaan "Ei tarvetta luokitella". Sittemmin kahden näistä kannoista on katsottu olevan terveitä, ja

jatkossa ne ylläpidetään laitoksen ylläpitoluvalla. Varsinaisten toimenpiteissä käytettyjen eläinten määrä jakautui seuraavasti:

Ei toipumista: 110 hiirtä. Terminaalianestesiati, joilla on harjoitettu toimenpiteitä tai joissa on kerätty näytteitä. Määrä vastasi odotuksia.

Lievä: 458 hiirtä. Pito runsasrasvaisella ruokavaliolla, verinäytteenotot, lääkkeiden annostelut, kuvantamiset. Määrä vastasi odotuksia.

Kohtalainen: 608 hiirtä. Kipulääkitystä vaativat toimenpiteet, kuten sydänlihasinjektiot ja sydänlihasiskemian tai hypertrofian aiheuttaminen kirurgisesti. Toteutuneen haitan katsotaan vastaavan arvioitua: useimmat hiiret olivat heti operaatiota seuraavana päivänä virkeitä ja kiipeilivät tavalliseen tapaan häkin katossa, minkä katsomme merkiksi kipulääkityksen tehosta.

Vakava: 45 hiirtä. Hankkeessa ei tehty vakavia toimenpiteitä, mutta koska yhtenä hiirimallina oli marfan-syndroomaa mallintava hiirikanta, jolla on havaittu äkkikuolemia, hankelupaa haettaessa päädyttiin luokittelemaan äkkikuolleet eläimet luokkaan ”vakava”. Perusteena oli, että eläinten kokemaa haittaa oli sen hetkisen tiedon perusteella hankala arvioida. Hankkeen aikana kuitenkin havaittiin, että äkkikuolleista eläimistä harvalla oli ennako-oireita tai hyvinvointiongelmia. Kuolemat tapahtuivat yöllä hiirten ollessa aktiivisia, mikä viittaa äkilliseen sydänkohtaukseen. Jatko-hankkeeseen ennako-oireettoman äkkikuoleman aiheuttama kärsimys on katsottu vain kohtalaiseksi.

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

Kaikki hankkeessa käytetyt hiiret lopetettiin kokeen päätteeksi kudoksenäytteiden keräämiseksi.

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

#### **Korvaaminen**

Hankkeessa tuotettua tietoa ei ole mahdollista nykytieteen ja teknologian keinoin saavuttaa ilman eläinten käyttöä. Sydän- ja verisuonisairauksien tutkimiseen vaaditaan kehittynyt verenkiertoelämä, ja näiden sairauksien syntyyn ja kulkuun vaikuttavat lisäksi monet muut elimistöt, tulehdusreaktiot, ravinto ja hormonitoiminta. Tätä on mahdoton mallintaa esimerkiksi soluviljelmillä tai tietokonemalleilla. Hankkeessa käytettiin kuitenkin solumalleja muun muassa geeninsiirtovektorien testaamiseen ja spesifien solutason mekanismien selvittämiseen, ja näitä menetelmiä suositaan jatkossakin aina kun se on mahdollista ja tarkoituksenmukaista.

#### **Vähentäminen**

Hankkeessa pyrittiin maksimoimaan jokaisesta käytetystä eläimestä saatava informaatio keräämällä laajalti dataa ja näytteitä, joita voidaan käyttää tulevaisuudessa erilaisten tutkimuskysymysten yhteydessä, mikä vähentää eläinkokeiden määrää. Myös tässä hankkeessa hyödynnettiin aiemmissa hankkeissa saatua informaatiota esimerkiksi sopivimpien aikapisteiden ja toimivimpien geeninsiirtovektorien valinnassa, jottei kokeita turhaan toistettaisi.

#### **Parantaminen**

Hankkeessa käytetyt eläinmallit ovat tarkoituksenmukaisia. Hankkeessa pyrittiin käyttämään nykyaikaisia ja parhaiksi todettuja menetelmiä eläinten kärsimyksen ja kuolleisuuden vähentämiseksi, sekä laadukkaan tutkimusmateriaalin saamiseksi. Esimerkiksi hankkeessa käytetty kirurginen sydänlihasiskemiamalli (Gao et al., 2010) on tavanomaista nopeampi ja vähemmän invasiivinen, koska se ei vaadi rintaontelon avaamista tai intubointia. Kirurgisten mallien kipulääkeprotokollia ja niiden toimivuutta on seurattu jatkuvasti, lääkitystä on lisätty tarvittaessa, ja tätä hanketta seuraavaan jatkohankkeeseen kipulääkityksen määrää on pysyvästi lisätty. Hyvinvointiongelmaiseksi todetun, ihmisen marfan-syndroomaa mallintavan hiirikannan ylläpidossa on siirrytty hankkeen aikana huomioimaan eläimelle perimästä koituva haitta siten, että eläimiä paritettaessa naaras on mahdollisuuksien mukaan ns. villityypin eläin ja uros muuntogeeninen. Näin tiineenä olevalla

emolla ei ole taakkanaan perimästä mahdollisesti koituvia haittoja. Lisäksi jatkohankkeeseen on otettu tässä hankkeessa saadun tiedon perusteella hyvinvoinnin pisteytystaulukko, jota käytetään jatkossa marfan hiirimallin hiirten tilan arviointiin.

#### **Muu: korvaavien menetelmien jakaminen**

Hankkeessa käytetyt menetelmät raportoidaan ja kuvataan hankkeen pohjalta julkaistavien tieteellisten artikkeleiden ja väitöskirjojen metodeissa. Tutkimusryhmän sisällä tietoa ja kokemuksia jaetaan viikoittaisissa seminaareissa sekä erityisesti hiirityöskentelyyn keskittyneen tiimin kesken.

<b>YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ</b>		
<b>Hankkeen nimi</b>	Proteaasi furin immuunivasteen säätelijänä	
<b>Hankeluvan kesto</b>	3 vuotta	
<b>Avainsanat</b>	hiiri, immuniteetti, T-solu, myeloinen solu	
<b>Hankkeen tarkoitus</b>	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	Kyllä
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	Immuunijärjestelmän solujen toiminnan säätelyn häiriytyminen saa aikaan esimerkiksi allergian, immuunipuutoksen tai autoimmuunitaudin kaltaisia tautitiloja. Proteaasi furin säätlee T-solujen ja myeloisten immuunisolujen aktivaatiota ja sytokiinituotantoa, joten sen toiminnan häiriöt voivat vaikuttaa näiden tautitilojen syntyyn. Furinilla saattaa olla merkitystä myös immuunijärjestelmän solujen kehityksessä. Hankkeen tavoite on saada arvokasta lisätietoa puolustusjärjestelmän solujen toiminnan ja kehityksen säätelystä ja luoda siten pohjaa uusien diagnostisten markkereiden ja lääkkeiden kehitystyölle.	
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)</b>	Kokeista saatavat tulokset auttavat ymmärtämään immuunivasteen toimintaa ja immunologisia häiriöitä. Furinin merkityksen selvittäminen immuunijärjestelmässä on tärkeää, kun arvioidaan furin-inhibiittorien mahdollista käyttöä syöpä- ja tulehduslääkkeinä.	
<b>Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät</b>	Hiiri, 6350 eläintä	
<b>Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b>	Furin-T-solupuutteiset hiiret sairastuvat autoimmunitettiin ja suolistotulehdukseen noin puolen vuoden iässä. Eläimet lopetetaan ja niistä otetaan näytteet pääsääntöisesti ennen autoimmunitetin kehittymistä. Hiirille aiheutuu haittaa myös aineiden annosteluista ja verinäytteiden otosta. Vakavaa infektiota mahlintavan eloonjäämiskokeen kokeen aikana kiinnitetään erityistä huomiota merkkeihin, jotka ennakoivat kuolema ja eläimet lopetetaan lopetuskriteerien mukaisesti.	
	<b>Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava</b>	

<b>3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b>	
<b>1. Korvaaminen - Replacement</b> <b>Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</b>	Puolustusjärjestelmän solut muodostavat kehittyessään ja toiminnassaan eliössä verkoston, jossa eri solutyypit säätelevät toistensa toimintaa eritettävien kasvutekijöiden ja solujen välisen kontaktien avulla. Yksittäisen immuunivasteen solutyypin tutkiminen soluviljelmissä ei siten täydellisesti vastaa kokonaisen eliön immuunihomöostaasin tilannetta. Immuunivasteen tutkiminen luonnollisessa ympäristössä on välttämätöntä, jotta ymmärtäisimme paremmin puolustusjärjestelmän toimintaa esimerkiksi autoimmuunitautien tai immuunipuutostilojen synnissä ja immuunipuolustuksessa patogeeneja vastaan.
<b>2. Vähentäminen - Reduction</b> <b>Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</b>	Eläinmäärät pidetään niin pieninä kuin mahdollista, niin että tulokset ovat tilastollisesti luotettavia. Tarpeettomat eläimet lopetetaan mahdollisimman varhaisessa vaiheessa, ennen kuin ne ehtivät kehittää geenimuunnoksesta johtuvia haittoja. Projektissa käytetään myös solulinjoja ja banaani-kärpäsiä siltä osin kuin se on mahdollista.
<b>3. Parantaminen - Refinement</b> <b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b> <b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b> <b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b>	a ja b) Hiiren immuunijärjestelmä on hyvin karakterisoitu, ja lisäksi se nisäkkäänä muistuttaa ihmisen immuunijärjestelmää. Hiirissä furin-geenin toiminta voidaan estää kudosspesifisesti Cre-loxP-tekniologialla, tätä menetelmää ei ole saatavilla muille koe-eläinmalleille. Furin-puutteisia immuunijärjestelmän solulinjoja ei tiedettävästi ole kuvattu. c) Furin-T-solupuutteiset hiiret lopetetaan pääsääntöisesti alle 4 kk iässä, jolloin ne eivät ole vielä sairastuneet autoimmunitettiin. Toimenpiteiden määrä rajoitetaan minimiin, suurin osa käytettävistä eläimistä ainoastaan lopetetaan kudosten talteenottoa varten. Eloönjäämiskokeessa käytetään tihennettyä tarkkailua ja eläimet lopetetaan lopetuskriteerien perusteella.
<b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b>	KYLLÄ

## **TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET**

### **Proteaasi furin immuunivasteen säätelijänä**

#### **Takautuvan arvioinnin perusteet**

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Käytetään apinoita

Muu peruste

#### **Tavoitteiden saavuttaminen**

Hankkeen tavoitteena oli saada arvokasta lisätietoa puolustusjärjestelmän solujen toiminnan ja kehityksen säätelystä ja luoda siten pohjaa uusien diagnostisten markkereiden ja lääkkeiden kehitystyölle. Furinin merkityksen selvittäminen immuunijärjestelmässä on tärkeää, kun esimerkiksi arvioidaan Furiini-inhibiittorien mahdollista käyttöä syöpä- ja tulehduslääkkeinä. Hankkeen aikana olemme tutkineet Furiini-puutteisten CD8 positiivisten T-solujen (ns. tappaja T-solut) toimintaa ja Furiinin vaikutusta myeloisten solujen, kuten neutrofiilien toimintaan. Olemme näissä tutkimuksissamme havainneet, että tappaja T-soluissa Furiinin puutos aktivoi soluja normaalioloissa, mutta tästä huolimatta näiden solujen sytotoksisuus on heikentynyt stimulaatiossa. Täten tappaja T-solu spesifinen Furiinin inhibiatio voi olla haitallista tulehdussairauksissa ja virusinfektioiden ja syövän

immuunipuolustuksessa ja tulisikin ottaa huomioon näiden sairauksien hoitokehittelyssä. Neutrofiileissä olemme havainneet, että Furiinin puutos voi vaikuttaa näiden solujen kulkeutumiseen tulehduspaikalle ja täten vaikuttaa esimerkiksi paikallisten tulehdusten syntyyn. Tutkimushankkeiden tuloksia ei ole vielä julkaistu, mutta ne pyritään julkaisemaan vuoden 2022 aikana hyvätasoisissa, vertaisarvioituissa immunologian alan tiedelehdissä.

#### **Todelliset haittavaikutukset: eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan**

-	<b>Ei toipumista</b>	<b>Lievä</b>	<b>Kohtalainen</b>	<b>Vakava</b>
Hiiret (Mus musculus) [A1]	484	5	247	0

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

Eläinkoeluvassa haettu eläinmäärä oli 6350 ja toteutunut eläinmäärä oli 736. Täten toteutunut eläinmäärä oli alle 12 % ennakoidusta. Ennakoitua pienempi eläinmäärä selittyy osaltaan koronapandemian aiheuttamista tutkimusta rajoittavista tekijöistä. Moni suunniteltu koe jäi myös toteutumatta henkilövaihdosten ja tästä aiheutuneiden projektifokusointien seurauksena. Vakavan vakavuusluokan (SV4) eloonjäämiskokeita ei suoritettu eläinkoeluvan voimassaoloaikana, mistä johtuen arvioidut vakavuusluokat jäivät suunniteltua pienemmiksi.

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

Kaikki eläimet lopetettiin toimenpiteen päätteeksi näytteiden saamiseksi. Eläinten kohtalo lopetushetkellä oli hyvin ennakoitavissa. Esimerkiksi CD4Cre-Furin-flox/flox hiiret lopetettiin pääsääntöisesti jo ennen 5 kuukauden ikää, jottei genotyypistä johtuva suolitulehdus ehdi puhkeamaan; vain noin 8 % näistä eläimistä (12/144) saivat suolisto-oireita.

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

##### **Korvaaminen**

Hankkeessa ei ole kehitetty uusia eläinkokeita korvaavia menetelmiä/tekniikoita.

##### **Vähentäminen**

Hankkeen perusteella saadun tiedon perusteella käytettävien eläinten määrää ei voida vähentää.

##### **Parantaminen**

Hankkeen haittojen todellinen vakavuus oli arvioitua lievempi, koska suunniteltuja eloonjäämiskokeita ei suoritettu. Vaikkei hankkeessa voitu toteuttaa kaikkia suunniteltuja toimenpiteitä ja kokeita, niin suunnitellut hiirimallit ovat edelleen tarkoituksenmukaisia, jotta monimutkaisia immuunipuolustuksen tekijöitä voitaisiin tutkia. CD4Cre-Furin-flox/flox hiirten osalta keskityttiin tarkasti hiirten ikään, jotta auto-inflammatorinen suolistotulehdus ei ehdi puhkeamaan ennen eläinten käyttämistä. Näin tekemällä pystyimme estämään näkyvän tulehduksen kehittymisen huomattavan suurelta osalta näistä hiiristä. CD4Cre-Furin-flox/flox hiiristä 144 eläintä (144/247 kohtalaisen vakavuusluokan kokonaiseläinmäärästä) merkittiin kohtalaiseen vakavuusluokkaan (SV3) niiden haitallisen genotyypin perusteella. Näistä eläimistä kuitenkin vain edellä mainittu 12 hiirtä sai haittaa aiheuttavia suolisto-oireita.

Tulevaisuutta varten hankkeen perusteella ehdotettavia muita parantamistoimenpiteitä ei ole tullut esiin. Havaintojemme perusteella hyvä kokeiden suunnittelu (mm. ikätarkkailu, paritusten ajoittaminen) sekä omien hiirilinjojen fenotyypin ymmärtäminen auttavat edistämään 3R-periaatteita.

##### **Muu: korvaavien menetelmien jakaminen**

**YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ**

<b>Hankkeen nimi</b>	Sydänsairauksien molekulaariset mekanismit	
<b>Hankeluvan kesto</b>	3 vuotta	
<b>Avainsanat</b>	sydänfysiologia, sydänsairaudet, geeni, aineenvaihdunta	
<b>Hankkeen tarkoitus</b>	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Ei
	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
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	<p>Tässä tutkimuksessa tutkitaan normaalin ja patologistesti rasit- tun sydämen geeni-ilmentymisprofiileja, aineenvaihduntaa, sähköfysiologiaa ja sydänsairauksien molekulaarisia mekanis- meja erilaisten geneettisesti muunneltujen hiirikantojen ja pa- tologisten mallien avulla. Sydämen patologisia rasituksia ovat etenevä vasemman kammion hypertrofia ja sydäninfarkti, jotka ovat länsimaissa hyvin yleisiä työkyvyttömyyden ja ennenaikai- sen kuoleman aiheuttajia. Hankkeen tavoitteena on saada sy- vempää ja yksityiskohtaisempaa tietoa sydänsairauksien taus- talla olevista molekulaarista muutoksista. Tutkimuksessa saa- tuja tuloksia hyödynnetään mahdollisuuksien mukaan sydänsai- rauksien ehkäisyssä sekä uusien terapiamuotojen kehittämi- sessä.</p>	
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)</b>	<p>Tutkimuksessa etsitään aikaisen vaiheen eroja normaalin ja sai- raan sydämen välillä geenien ilmentymisessä ja molekulaari- sissa tapahtumissa. Näin pyritään saamaan uutta tietoa niistä mekanismeista, jotka aiheuttavat sydämen sairastumisen. Näi- den tietojen avulla sydänsairaudet voitaisiin diagnosoida ny- kyistä aiemmin ja vaikuttaa hoidollisesti niihin ennen sydämen toiminnan heikkenemistä. Tutkimuksessa pyritään lisäksi esi- merkiksi geeniterapian avulla kumoamaan sairauksiin yhdistet- tyjä molekulaarisia muutoksia ja näin estämään sydämen sai- rastuminen.</p> <p>Lisäksi tutkimuksessa tutkitaan sukupuolihormonien vaikutusta sydänsairauksien etenemiseen. Tämä perustuu siihen tutkit- tuun tietoon, että naiset kestävät sydämen vajaatoimintaa mie- hiä paremmin.</p>	
<b>Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät</b>	Hiiri, 5540 eläintä	
<b>Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b>	<p>Eläimille aiheutuu tutkimuksessa kipua kirurgisista toimenpi- teistä (kipulääkityksestä huolehditaan) sekä aiheutetusta sydänlihaskemiasta, verinäytteenotoista ja tutkittavien ainei- den annostelusta injektoimalla. Lisäksi haittaa aiheutuu paasto- tuksesta ja kuvantamisiin liittyvistä nukutuksista. Yhdellä käy- tettävistä kannoista esiintyy ennakoimatonta kuolleisuutta. Eläimet lopetetaan tutkimuksen päätyttyä.</p>	

	<b>Vakavuusluokat: kohtalainen</b>
<b>3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b>	
<b>1. Korvaaminen - Replacement</b> <b>Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</b>	Sydän- ja verisuonisairauksien tutkiminen vaatii kehittyneen verenkiertoelimistön ja erityisesti tätä tutkimuskokonaisuutta ajatellen nelilokeroisen sydämen. Jotta tuloksista voitaisiin vetää johtopäätöksiä ihmisen sairauteen, täytyy olla myös yhdenmukaisuutta geenien ilmentymisessä. Tässä tutkimuksissa sydänsairauksien syntymekanismien ja geenimutaatioiden tutkimiseen käytetään kehitysbiologialtaan alhaisinta mahdollisinta eläinlajia, eli hiirtä. Mahdollisuuksien mukaan tämän tutkimuksen yhteydessä tehdään solukokeita sekä ex vivo -tutkimuksia, joilla löydöksiä pyritään varmistamaan ilman lisäeläinten käyttöä.
<b>2. Vähentäminen - Reduction</b> <b>Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</b>	Tutkimusryhmät pidetään tarpeeksi suurina, jotta varmistetaan luotettavien tulosten saaminen kustakin tutkimuksesta. Näin vältetään uusimisen tarve. Tutkimuksessa käytetään sisäsiittoisia tai takaisinristeytettyjä hiirikantoja, joiden perimä on 99 % identtinen. Näin minimoidaan tulosten hajonta. Kustakin eläinyksilöstä pyritään saamaan mahdollisimman laajasti tutkimustuloksia, kuitenkin aiheuttamatta suurta kärsimystä.
<b>3. Parantaminen - Refinement</b> <b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b> <b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b> <b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b>	a) Tässä tutkimuksessa käytetään kehitysbiologialtaan mahdollisimman alhaista nisäkästä (hiiri), jolla on kuitenkin kehittynyt sydän- ja verenkiertoelimistö. Geenimutaatioiden ja yksittäisten geenien vaikutuksia tutkitaan takaisinristeytettyjen, muunto-geenisten hiirikantojen avulla. b) Perustutkimuksellisesti muuntogeeniset hiirimallit soveltuvat erittäin hyvin yksittäisten geenien roolin tutkimiseen. Sairauksien mekanismien tutkimiseen hiiri soveltuu hyvin, koska se on kustannustehokas malli, jonka geeni-ilmentyminen on hyvin lähellä ihmisen vastaavaa. c) Kaikkien operaatioiden yhteydessä huolehditaan asianmukaisesta rauhoituksesta, nukutuksesta ja kivunpoistosta. Eläimet ovat säännöllisen tarkkailun alla. Jokaisen toimenpiteen osalta käytössä ovat lopetuskriteerit, joissa ennalta sovittujen kriteerien täytyessä eläin poistetaan kokeesta. Kaikki toimenpiteet toteutetaan koulutettujen henkilöiden toimesta, jolloin eläimille aiheutettu haitta on minimoitu.
<b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b>	KYLLÄ

## TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

### Sydänsairauksien molekulaariset mekanismit

#### Takautuvan arvioinnin perusteet

Sisältää vakavia toimenpiteitä

Käytetään apinoita

X Muu peruste: Vakavuusluokka kohtalainen, mutta takautuva arviointi määrättiin: on annettava selvitys siitä mitä kuolemaa ennakoivia merkkejä voitiin löytää gm-kannoissa.

## Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena on ollut kerätä syvempää ja yksityiskohtaisempaa tietoa sydänsairauksien, erityisesti vasemman kammion hypertrofian ja infarktin, taustalla olevista molekulaarisista muutoksista ja pyrkiä siirtämään näitä tietoja uusien hoitomuotojen kehittämiseen. Hankkeen aikana kerätystä tiedosta on saatu valmiiksi yksi vertaisarvioitu julkaisu ja toinen on lähes valmis (lähetetty arvioitavaksi ja julkaistavaksi). Lisäksi tämän hankkeen ja tätä edeltävän samankaltaisen hankkeen aikana kerätyn tiedon perusteella on löydetty uusi mahdollisesti sydämen hypertrofiaa ehkäisevään geeni-ilmentymiseen liittyvä hoitomuoto, jota on alustavasti jo testattu hankkeen aikana eläinmallissa. Hankkeen tavoitteet on siis saavutettu melko hyvin, mutta joidenkin hankkeen osakokeiden eteneminen on viivästynyt hankkeen aikana tapahtuneiden henkilöstövaihdosten takia.

## Todelliset haittavaikutukset: eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

-	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret ( <i>Mus musculus</i> ) [A1]	187	421	281	27

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

Hankkeen aikana käytettiin reilut 900 eläintä, vaikka arvioitu eläinmäärä oli noin 5540 eläintä. Hankelupaa hakiessa eläinmääriä ei vielä tarvinnut arvioida vakavuusluokittain, vaan todellisen aiheutuvan harmin arvioitiin kullakin eläimellä olevan korkeintaan kohtalainen. Lähes kaikilla hankkeessa käytetyillä eläimillä todellinen koettu haitta olikin kohtalainen tai vähäisempi, mutta 47 eläimellä haitaksi arvioitiin vakava. Eläimet, joiden kokemaksi haitaksi on arvioitu vakava, ovat pääosin löydetty kuolleena, ja kuolinsyytä tai kuoleman aiheuttanutta tekijää ei ole voitu varmistaa, joten haitaksi on ohjeistuksen vuoksi laitettu vakava. Yli puolella näistä tapauksista yhteinen tekijä on ollut haitallinen genotyyppi, mutta nämä eläimet kuolivat ennen vieroituskäyttöä, ja osa näistä eläimistä lienee tavallista poikaskuolleisuutta. Hankelupaa hakiessa eläinmäärä on arvioitu huomattavasti toteutunutta suuremmaksi, koska hankeluvalla on ollut 3 ylläpidettävää haitallisen genotyypin omaavaa hiirikantaa, ja käytössämme oleva eläintietojärjestelmä laskee kaikki näiden hiirikantojen eläimet hankeluvan eläinmäärään, vaikka todellisuudessa tilastoituun eläinmäärään tulevat lopulta vain haitallisen genotyypin omanneet eläimet tai eläimet, joille on tehty toimenpiteitä. Myös hankkeen aikana tapahtuneet henkilövaihdokset eläinkokeiden tekijöissä ovat vähentäneet käytettyjen eläinten määrää, koska kokeiden tekeminen on viivästynyt.

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

Eläimiä ei jätetty henkiin toimenpiteen päätyttyä. Hankkeessa eläinten kokemaksi haitaksi arvioitiin alun perin korkeintaan kohtalainen ja eläimille haittaa aiheuttavat tekijät olivat ennakoitua tiedettyjä. Kokeissa ei tullut esiin sellaisia eläinten hyvinvointia heikentäviä tekijöitä, jotka eivät olisi olleet ennakoitavissa. Haittaa aiheutui eniten sydämen liikakasvusta ja osalla myös sydämen vajaatoiminnasta, mutta eläinten tiiviillä seurannalla eläinten kuolemat kokeen aikana ennen ennakoitua päätapistettä voitiin estää lähes kokonaan.

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

### Korvaaminen

Hankkeen aikana on pyritty koko ajan kehittämään entistä paremmin toimivia 3D-solumalleja ja mittaamaan sydänsolujen toimintaa in vitro. Vaikka solukokeissakin tarvitaan edelleen myös hiiriä solujen luovuttajana, ovat nämä kokeet silti osittain korvanneet eläinkokeita. Hanketta

toteuttaneessa tutkimusryhmässä solukokeet ovat olleet aina merkittävässä roolissa ja eläinkokeita on yleisesti ottaen tehty vasta, mikäli solukokeista on saatu positiivisia tuloksia, ja jatkotutkimukset ovat ehdottomasti vaatineet eläinmallissa testaamisen.

### Vähentäminen

Tautimalleista kerättyä tietoa käytetään aina hyväksi seuraavien kokeiden eläinmääriä laskiessa, mutta hankkeessa ei saatu varsinaisesti sellaista tietoa, jonka avulla esimerkiksi ryhmäkokoja voitaisiin pienentää, pikemminkin voisi olla syytä suurentaa ryhmäkokoja. Kokonaisuudessaan hankkeessa käytettiin huomattavasti vähemmän eläimiä kuin alunperin arvioitiin, sillä hankkeessa ei ollut lopulta tarpeeksi käytettävissä työntekijöitä kaikkien kokeiden suorittamiseksi.

### Parantaminen

Luvalla olevista eläinmalleista tämän hankkeen aikana on käytetty enimmäkseen kirurgisesti toteutettavaa sydämen hypertrofiamallia (TAC) ja geenimuunneltuja hiirilinjoja (gm-muunneltujen hiirten fenotyyppaus). Nämä eläinkoemallit ovat edelleen tarkoituksenmukaisia ja niistä voidaan saada tieteen kannalta merkittävää tietoa. Sydämen hypertrofiamallissa post-operatiivista hoitoa on tehostettu aikaisemmasta: kipulääkityskertoja on lisätty, annosta suurennettu ja eläinten painon seuranta on tehostettu. Eläinten painon seurannalla saadaan tietoa sydämen hypertrofian etenemisestä (painon taittuminen laskuun korreloi tautimallin etenemisen kanssa) ja siten voidaan yleensä ajoittaa päätepiste siten, ettei eläimen kokema haitta kasva tarpeettomasti. Geenimuunneltuja hiirikantoja, joilla on haitallinen fenotyyppi, on pyritty käyttämään mahdollisimman varhaisessa vaiheessa, jotta fenotyypin aiheuttama haitta on mahdollisimman lyhytkestoinen. Sydämen tautimalleissa sydänten toimintaa seurataan etenkin uusien eläinkoemallien yhteydessä tiiviisti non-invasiivisin kuvantamismenetelmin (etenkin ultraäänikuvantaminen), ja siten käytettävissä on runsaasti dataa taudinkuvan etenemisen ennustamiseksi.

### Muu:

Takautuvassa arvioinnissa pyydettiin erityisesti antamaan selvitys siitä, mitä kuolemaa ennakoivia merkkejä gm-kannoissa voitiin löytää. Hankkeessa käytettiin haitallisen fenotyypin omaavia gm-hiirikantoja, joilla tiettyjen geenien poistaminen tai yliekspressio aiheutti eriasteisia sydämen toiminnan häiriöitä, jotka johtivat sydämen vajaatoimintaan ja lopulta kuolemaan. Hankkeen alkessa kunkin hiirikannan sydämen vajaatoiminnan kehittymisen nopeus oli jo melko hyvin tiedossa, joten haitallisen genotyypin omaavien eläinten lopetusaikapisteeksi määritettiin niin varhainen aikapiste, ettei sydämen vajaatoiminta ehtinyt aiheuttaa yleensä merkittävää haittaa eläimelle. Tutkimuksessa olevia eläimiä seurattiin punnitsemalla ja ultraäänikuvantamisella, ja mikäli eläintä täytyi seurata sydämen merkittävään vajaatoimintaan asti, seurattiin lopulta myös eläimen hengitysfrekvenssiä. Pisimpäänkin seuratut eläimet lopetettiin, mikäli paino kääntyi laskuun pidemmällä aikajänteellä tai jos hengitysfrekvenssi kasvoi tai muuttui selkeästi raskaammaksi.

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
<b>Hankkeen nimi</b>	Lääkeaineen tehon testaaminen Parkinsonin taudin prekliinissä tautimalleissa	
<b>Hankeluvan kesto</b>	Kolme vuotta	
<b>Avainsanat</b>	Parkinsonin tauti, transgeeninen, hiiri, rotta, prekliininen lääkeainetutkimus	
<b>Hankkeen tarkoitus</b>	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
<b>Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)</b>	Parkinsonin taudin hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lääkeli- toja. Parkinsonin taudista aiheutuu potilaille hyvin vakavia oi- reita ja kärsimystä sekä yhteiskunnalle huomattavia kustannuk- sia. Yritys tarjoaa lääkekehitysteollisuudelle in vivo -eläinmalleja lupaavien lääkeaineiden prekliiniseen testaukseen sairauksissa, joihin ei ole olemassa hoitomuotoja. Tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä kliinisiin kokeisiin.	
<b>Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)</b>	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja Parkin- sonin tautiin. Tutkimusmallien käyttö edistää myös geenivirhei- den mekanismien ja vaikutusten ymmärtämistä eri sairauksissa, mikä edesauttaa uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen ke- hittämistä.	
<b>Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät</b>	Hiiri, 10 800; rotta, 7 200	
<b>Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</b>	Tautitilojen indusointi tehdään toksiineilla joko systeemisenä antona tai kirurgisesti aivoihin tiettyyn kohtaan. Kemiallisesti indusoituihin tautimalleihin voi liittyä vakavaa haittaa. Käyttä- ytymistesteistä, lääkinnästä ja kuvantamisesta aiheutuu eläimille kohtalaista haittaa. Lääkinnät suoritetaan tavanomaisia annos- telureittejä juomavedessä tai osana dieettiä. Pienelle määrälle kokeita (arvio < 5 %), voidaan käyttää kirurgiaa vaativia annos- telumuotoja. Eläimille tehtävät käyttäytymistestit aiheuttavat lievää haittaa. Eläimet lopetetaan tutkimusten loputtua.  <b>Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava</b>	
<b>3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</b>		
<b>1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi kor- vaavaa menetelmää ei voi käyt- tää?</b>	In vitro -mallit ovat hyvin rajalliset johtuen koko eliön elimistön fysiologisten ja anatomisten ulottuvuuksien puuttumisesta mal- linnettaessa kutakin sairautta in vitro olosuhteissa. Uusien lää- kkeiden 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.	
<b>2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?</b>	Koeasetelmat ovat standardoituja ja niiden käytön pohjana on perusteellinen mallien validointityö. Kunkin geneettisen mallin taustalla on ihmissairautta oleellisin osin mallintava eläinmallin ilmiäsu (fenotyyppi) jonka tulee olla 1) perinnöllisesti (geneetti- sesti) relevantti että 2) oireistoltaan/patologialtaan ihmissai- rautta kuvaava. Perusteellisella validointityöllä varmistetaan, että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ja antaa oikeanlaisen taudinkuvan. Koeasetelmissa ryhmän sisäinen vari- aatio minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määrittelee tilas- tollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi) ja joka	

	määrittää koe-eläinten käytön määrän kussakin koeasetelmassa. Perusteellisen validaatiotyön ja tilastollisen voima-analyysin perusteella voidaan luotettavasti ennustaa soveltuvat ryhmäkoot, jotka minimoivat eläinten käytön alimpaan mahdolliseen ilman että koeasetelman tilastollinen voima vaarantuu.
<b>3. Parantaminen - Refinement</b> <b>a) Perusteet eläinlajin valinnalle.</b> <b>b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?</b> <b>c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</b>	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 hyväksytyjä ja käytettyjä. Tämän lisäksi näistä menetelmistä ei ole saatavissa tietoa tällä hetkellä käytettyjen lääkeaineiden vasteista, joita voitaisiin käyttää verrattaessa uusista lääkeaineista saatavia tuloksia.
<b>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</b>	KYLLÄ

## TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TULOKSET

### Lääkeaineen tehon testaaminen Parkinsonin taudin prekliinisissä tautimalleissa

#### Takautuvan arvioinnin perusteet

X Sisältää vakavia toimenpiteitä

Käytetään apinoita

Muu peruste

#### Tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja Parkinsonin tautiin. Tutkimusmalleilla myös pyrittiin ymmärtämään geenivirheiden 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. Tuloksia on julkaistu kansainvälisissä kokouksissa. Osa lääkeaineista on edennyt klinisiin kokeisiin.

#### Todelliset haittavaikutukset: eläinten määrä todellisen vakavuusluokan mukaan

-	Ei toipumista	Lievä	Kohtalainen	Vakava
Hiiret (Mus musculus) [A1]	87	2220	1169	2095
Rotat (Rattus norvegicus) [A2]	34	252	264	23

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

Tutkimuksessa käytettiin 5571 hiirtä (ennakoitu määrä 10800) ja 573 rottaa (ennakoitu määrä 7200). Käytetyt eläimet jakaantuivat seuraavasti: hiiristä 2 % luokassa ei toipumista, 40 % luokassa lievä, 21 % luokassa kohtalainen ja 37 % luokassa vakava, rotista 6 % luokassa ei toipumista, 44 % luokassa lievä, 46 % luokassa kohtalainen ja 4 % luokassa vakava.

Käytettyjen eläinten määrä oli n. 34 % suunnitellusta käytöstä, koska tarvetta ennakoituille kokeille ei ollut. Vakavuusluokkien osalta noin 35 % käytetyistä eläimistä kuului vakavuusluokkaan vakava. Mallikohtaisesti vakavaa haittaa aiheutui/kokonaismäärä: Parkinsonin taudin 6-OHDA-,

LPS-, PFF- ja AAV A53T-mallit; hiiri 38/2121, rotta 23/371, Parkinsonin taudin MPTP-toksiinimalli; hiiri 1945/3141 ja Parkinsonin taudin geenimuunnellut hiiri- ja rottakannat; hiiri 112/309.

### **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**

Lupahankkeen aikana ei ole saatu eläinten korvaamiseen liittyvää lisätietoa.

#### **Vähentäminen**

Käytetyt eläinmallit ovat pitkälti koeasetelmasta riippuvia. Eläinten määrää pyritään vähentämään jatkuvalla mallivalidaatiolla ja kehittämällä tutkimusmenetelmiä. Tilastollisilla menetelmillä pyritään selvittämään pienimmät tarvittavat ryhmäkoot erojen havaitsemiseksi.

#### **Parantaminen**

Lautakunta edellytti takautuvassa arvioinnissa annettavan selvitys siitä, miten suuri osa eläimistä lopetettiin lopetuskriteerien perusteella ja miten moni ehti kuolla itseksensä osahankkeessa, sekä vähensikö tiheämpi seuranta ja/tai tukihoido odottamattomia kuolemia.

Osahankkeessa 1 lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 48 hiirtä ja 14 rottaa, kuolleena löydettiin 23 hiirtä ja 7 rottaa. Osahankkeessa 2 lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 55 hiirtä ja kuolleena löydettiin 135 hiirtä. Osahankkeessa 3 lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 18 hiirtä ja 23 rottaa, kuolleena löydettiin 11 hiirtä ja 2 rottaa.

Osahankkeessa 2 eläimille tarjottiin lisälämpöä MPTP-altistuksen aikana, minkä ansiosta kuolleisuutta saatiin vähennettyä (historiallisen aineiston perusteella ilman lisälämpöä kuolleisuus oli n. 6 %, kun lisälämpö otettiin käyttöön, kuolleisuus oli n. 2 %). Myös osahankkeessa 3 lisälämmön tarjoaminen busulfan-käsitellyille hiiri vähensi kuolleisuutta (ilman lisälämpöä kuolleisuus oli 23 %, kun lisälämpö otettiin käyttöön, kuolleisuus väheni 0 % keskenään samanlaisissa koeasetelmissä). Kipulääkkeiden anto 30 minuuttia ennen malli-induktiota, jolloin kipulääkkeen teho on parempi kuin juuri ennen anestesia-induktiota annettuna. Käyttöön otettiin myös hyvinvoinnin pisteytystaulukko avustamaan post-operatiivisen hoidon tarpeen arviointia ja lopetuskriteereitä määrittäessä.

Satunnaisia haittoja voidaan vähentää anestesian huolellisemmalla seurannalla ja teknikoiden paremmalla koulutuksella eri lääkintätekniikoihin.

#### **Muu: korvaavien menetelmien jakaminen**

Tietoa jaetaan toiminnanharjoittajan ja yhteistyöryhmien kesken.