

2018 - TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN ANNETUT TIEDOT

– julkaistaan tässä yhdessä hankkeiden yleistajuisen tiivistelmien kanssa.

Hankeluvat ovat vuosilta 2014 ja 2015.

1

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, ks. EU-komission ohje ja esimerkki.		
Hankkeen nimi	Lääkeaineiden tehon testaaminen Huntingtonin taudin prekliinissä tautimalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Huntingtonin tauti, preklininen lääketutkimus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Huntingtonin taudin hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lääke- aineita. Huntingtonin tauti aiheuttaa potilaille ja heidän omai- silleen kärsimystä ja taudeista 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.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja Hun- tingtonin tautiin. Tutkimusmallien käyttö edistää myös Hun- tingtonin taudin mekanismien tutkimista, mikä edesauttaa uu- sien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri 11800; rotta 720 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Osa eläimistä, lähinnä R6/2 kantaa olevat hiiret tulevat kärsi- mään geenimutaation aiheuttamista oireista, jotka voivat olla voimakkaita. Tutkimukset ovat pääasiassa subkroonisia tai kroonisia, alkaen muutamista päivistä useisiin kuukausiin. Tut- kimuksen päätteeksi eläimet lopetetaan. Vakavuusluokat: vakava	
3R-menetelmien soveltaminen	Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	1. Replacement In vitro -mallit Huntingtonin taudin tutkimiseksi ovat hyvin ra- jalliset johtuen taudin moniulotteisuudesta, käsittäen sekä pe- rifeerisen että keskushermostoon liittyvän patologian. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voi- daan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen klinisiä	

	kokeita. Myöskään tietokonepohjaiset simulaatiot Huntingtonin taudin tutkimuksessa eivät ole mahdollisia johtuen taudin mekanismien monimutkaisuudesta.
2. Vähentäminen Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	2. Reduction 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).
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	3. Refinement 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 -menetelmin ei voida saada samanlaista tietoa uusien lääkeaineiden tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole standardoituja eivätkä yleisesti hyväksyttyjä ja käytettyjä. Tämän lisäksi näistä menetelmistä ei ole saatavissa tietoa tällä hetkellä käytettyjen lääkeaineiden vasteista, joita voitaisiin käyttää verrattaessa uusista lääkeaineista saatavia tuloksia.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 5.6.2018

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja Huntingtonin tautiin. Käytetyt eläinmallit toimivat odotetusti ja antoivat luotettavia tuloksia lääkeaineiden tehokkuudesta. Tutkimusmallien käyttö edisti myös omalta osaltaan tietoutta Huntingtonin taudin mekanismeista, mikä edesauttaa jatkossa uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.

Osahanke 1

Farmakokineettisissä (PK) kokeissa tutkittiin lääkeaineiden pitoisuuksia tietyn mittaisen tai tietyn tyyppisen lääkehoidon jälkeen eläimiltä otetuista veri- ja kudospäytteistä. Tarkoituksena oli selvittää tehotutkimuksissa käytettävät lääkkeiden antotavat ja pitoisuudet. Tavoitteiden saavuttamisessa onnistuttiin odotusten mukaisesti.

- Toimenpiteet: lääkintä, lopetus ja näytteenkeruu

Osahanke 2

NOEL (no observable adverse effect level) – tyyppisissä kokeissa selvitettiin akuutin ja kroonisen annostelun jälkeen havaittavia mahdollisia haittavaikutuksia. Nämä tutkimukset suoritetaan PK-kokeen perusteella valittuja annoksia yhtä/kahta kertaluokkaa suuremmilla annoksilla. Tavoitteena oli löytää suurin annos, jolla ei havaittu haittavaikutuksia ja mikä mahdollistaisi parhaan

mahdollisen tuloksen tehotutkimuksissa. Tavoitteiden saavuttamisessa onnistuttiin odotusten mukaisesti.

- Toimenpiteet: lääkintä, ruumiin painon ja ruumiin lämmön seuranta, neurologinen indeksi testi, lopetus ja näytteenkeruu

-

Osahanke 3

Tehotutkimuksissa selvitettiin lääkeaineiden vaikutusta eläinten käyttäytymiseen ja motorisiin toimintoihin sekä aivojen rakenteisiin ja niiden toimintaan. Tavoitteiden saavuttamisessa onnistuttiin odotusten mukaisesti. Hankkeen aikana havaittiin useissa tutkimuksissa positiivisia lääkeainevas-teita.

- Toimenpiteet: lääkintä, käyttäytymistestit, aivojen kuvantaminen, lopetus ja näytteenkeruu

Osahanke 4

Kemiallisesti indusoidut Huntingtonin taudin eläinmallit mitokondrioiden toimintaan vaikuttavilla toksiineilla. Hankkeessa selvitettiin lääkeaineiden vaikutuksia kemiallisesti indusoiduissa tautimal-leissa. Tavoitteiden saavuttamisessa onnistuttiin odotusten mukaisesti.

- Toimenpiteet: mitokondriotoksiinin annostelu, lääkintä, neurologinen indeksi testi, lopetus ja näytteenkeruu

Osahanke 5

Aineenvaihduntamittaukset. Ei tutkimuksia hankkeen aikana.

Osahanke 6

Telemetriamenetelmien käyttö Huntingtonin taudin transgeenisillä R6/2 ja Q175 hiirillä. Tavoittei-den saavuttamisessa onnistuttiin odotusten mukaisesti.

- Toimenpiteet: lääkintä, telemetriakirurgia, telemetriamittaukset, lopetus ja näytteenkeruu

Osahanke 7

Metaboliakammiotutkimukset hiirillä. Ei tutkimuksia hankkeen aikana.

2. Millaista haittaa?

Geenimuunnoksesta aiheutuva haitta oli mukana kaikissa osahankkeissa. Tautimallin vakavuusaste riippui käytettävästä transgeenisestä hiirikannasta ja eläimen iästä. Kaikki kokeet, joissa R6/2-kan-nan eläimet elivät yli 14 viikkoa, luokiteltiin vakavuusluokkaan vakava. Tämä johtuu R6/2-kannan vakavasta fenotyypistä tuon ikäpisteen jälkeen (painon lasku, liikeaktiivisuuden lasku, lisääntynyt kuolleisuus). Kaikki muut R6/2-kokeet, jotka päättyivät 14 ikäviikkoon mennessä tai olivat ns. mal-tillisemmin etenevää tautimallia (Q175-kanta), olivat vakavuusluokaltaan lieviä tai kohtalaisia. Tämä selittää sen, että kokeista suurimman osan haittaluokitus oli korkeintaan kohtalainen eikä suinkaan vakava kuten alun perin oli arvioitu.

R6/2-kannan fenotyypin lisäksi vakavaa haittaa aiheutui myös osahankkeessa 4, jossa eläimille an-nosteltiin mitokondriotoksiinia (kemiallisesti indusoitu malli). Osaltaan haittaa aiheutui myös kirur-gisista operaatioista, vaikkakin ne suoritettiin anestesiassa ja eläimille annosteltiin kipulääkkeitä operaation jälkeen. Joissakin kokeissa yllätyksiä aiheutui myös annosteltavista lääkeaineista, jotka aiheuttivat haitallisia sivuvaikutuksia.

Eniten eläimiä kuoli tai jouduttiin lopettamaan osahankkeessa 2, jossa yhteensä 79 hiirtä kuoli tai lopetettiin ennen päätepidettä. Näissä kokeissa eläimet saivat vakavia sivuoireita suuren annoksen lääkeryhmissä.

Osahankkeessa 3 pitkäkestoisissa kokeissa (kesto yli 14 eläinten ikäviikkoa, yhteensä 8 kpl) jouduttiin osa transgeenisistä R6/2-eläimistä lopettamaan lopetuskriteerien perusteella ennen päätepidettä ja osa kuoli spontaanisti tautimallista johtuviin kohtauksiin. Näissä tutkimuksissa lopetuskriteerien perusteella jouduttiin lopettamaan suhteellisen pieni osuus eläimistä, noin 2-4 %.

3. 3R-mahdollisuudet

Käytetyt eläinmäärät ovat pitkälti koe-asetelmasta riippuvia. Kokeita suunniteltaessa 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 sekä mahdolliset muut kokeen kannalta kriittiset tekijät.

Kokeissa työskentelevä henkilökunta on koulutettua. Ennen pääsyä eläintyöhön työntekijät perehdytetään yrityksen toimintatapoihin. Lisäksi kaikki eläintyötä tekevät teknikot ja tutkijat osallistuvat vuosittain yrityksen järjestämään eläinten hyvinvointikoulutukseen, jonka teema vaihtelee vuosittain. Malleihin liittyviä lopetuskriteerejä käydään läpi henkilökunnan kanssa.

Eläimiä pidetään pääsääntöisesti ryhmähäkeissä, jolloin niillä on jatkuvasti tarjolla lajitovereiden seuraa. Kokeissa käytettävä kuivike on vaihdettu luvan voimassaoloaikana haapahakkeesta maissikuivikkeeseen, koska maissikuivikkeen imukyky on haapahaketta parempi ja se myös pölyää vähemmän. Kuivikkeenvaihdon myötä häkkienvaihtoväliä on voitu pidentää ja näin ollen eläinten stressiä siltä osin vähentää. Samalla eläintenhoitajien aikaa on vapautunut muihin tukitoimiin häkinvaihtojen sijasta. Erityisesti kohtausherkkien R6/2-kannan hiirten osalta päivittäisen eläinten käsittelyn vähentäminen (häkkien vaihto) on vähentänyt hiirten riskiä saada epileptisiä kohtauksia.

Merkittävä hankkeen aikana käyttöön otettu 3R-keino eläinten kärsimyksen vähentämiseksi on ollut käytettävien eläinten etukäteisvalikointi. Menetelmä perustaa siihen, että kaikilta eläimiltä otetaan verinäyte, josta määritetään sappihappopitoisuus. Korkea sappihappopitoisuus toimii merkkinä eläimen maksan porttilaskimon tukoksesta. Eläimet, joilla on porttilaskimotukos poikkeavat normaaleista eläimistä niin käyttäytymiseltään, lääkinevasteeltaan kuin myös aivojen toiminnan ja rakenteen suhteen. Valikoimalla mukaan vain eläimiä, joilla on normaalit sappihappopitoisuudet (=ei porttilaskimotukosta), on saadut tulokset luotettavampia ja niissä esiintyy vähemmän hajontaa. Tämän perusteella on ryhmäkokoja mahdollista pienentää ja näin ollen vähentää osalle eläimistä aiheutuvaa haittaa itse tutkimusmenetelmistä. Itse eläinten käytön kokonaismäärää menetelmä ei vähennä, koska kaikilta hiiriltä otetaan verinäyte ja korkean sappihappopitoisuuden omaavat hiiret lopetetaan. Näille hiirille ei siis kuitenkaan koidu muuta kuin verinäytteenotosta aiheutuva haitta.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Erityistä aiheutettuun haittaan liittyen: esim. satunnainen / toistuva, saatu vähenemään/ loppumaan 3R-keinoin	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa?
Farmakokineettiset kokeet	Hiiri	+	11800 / 2499	Vakava/ Lievä 1765, Kohtalainen 42, Vakava 0	Vakavuusluokka yleensä lievä, sillä lääkintäkertoja oli vain muutama ja kokeen kesto lyhyt (päiviä). Lisäksi usein tutkimukset suoritettiin ei-muuntogeenisillä hiirillä, esim. C57:illa, joten kannan fenotyypistä ei ollut lisähaittaa.	PK-tutkimuksissa käytössä usein melko pieni ryhmä (esim. jopa n=3), joka usein riittävä halutun lopputuloksen saamiseksi. Tällaisia tutkimuksia oli mukana kokonaisuudessa.
NOEL (no observable effect level) kokeet	Hiiri	+	11800 / 502	Vakava/ Lievä 279, Kohtalainen 102 Vakava 121	Osahankkeista suurin kuolleisuus. Yhteensä 79 hiirtä kuoli tai jouduttiin lopettamaan ennen suunniteltua aikapistettä. Kuolleisuus johtui annosteltavasta lääkeaineesta. Tavoitteena oli löytää suurin annos, jolla ei havaittu haittavaikutuksia.	Kuten PK-tutkimuksissa, NOEL-tutkimuksissa käytettiin yleensä suhteellisen pieniä n-määriä (usein n=3-6).

Tehoko- keet	Hiiri/Rotta	+	11800 / 8023 hiirtä + 48 rottaa	Vakava/ Lievä 3091, Kohtalainen 2406, Vakava 758	Pitkäkestoiset kokeet olivat tässä osahank- keessa. Suurin osa elä- mille kohdistuneesta haitasta kuului luok- kaan lievä tai kohtalai- nen (pitkäaikainen lää- kintä, käyttäytymistes- tit tai kuvantamismit- taukset useassa eri ai- kapisteessä). Osa eläi- mistä kuului luokkaan vakava, mikä selittyy eläinten fenotyypistä (taudin eteneminen) ja pitkäaikaisesta seuran- nasta.	Kokeiden maksimikestoa voitaisiin lyhentää R6/2 –kannan kohdalla 3-4 viikolla
Kemialli- sesti in- dusoidut Hunting- tonin tau- din eläin- mallit	Hiiri	+	11800 / 161	Vakava/ Vakava 161	Eläimille annosteltiin mitokondritoksiineja tautimallin indusoi- miseksi. Kaikki eläimet, joille toksiineja annos- teltiin, kuuluivat luok- kaan vakava. Eläimiä lo- petettiin lopetuskritee- rien perusteella 11 kpl ja löydettiin kuolleen 21 kpl.	Toksiineissa käytettiin mahdollisimman pientä an- nosta, jolla kuitenkin saatiin esille esim. haluttu striatum-vaurio.
Aineen- vaihdu- tamittauk- set	Hiiri	+	11800 / 0	Ei tutkimuksia	Ei tutkimuksia	Ei tutkimuksia

Telemet-riako-keet	Hiiri	+	11800 / 36	Vakava/ Kohtalainen 36	Telemetria-implantin suhteellisen suuri koko hankaloittaa jonkin ver-ran eläimen liikkumista. Eläimille annosteltiin ki-puläläkettä operaation jälkeen.	Operaatiot anestesiassa. Kipulääkitys ja post-ope-ratiivinen hoito.
Metabo-liakam-miotutki-mukset	Hiiri	+	11800 / 0	Ei tutkimuksia	Ei tutkimuksia	Ei tutkimuksia

Yhteensä luvassa on arvioitu 11800 hiirtä ja 720 rottaa. Tosiasiallinen eläinten käyttö oli 11221 hiirtä ja 48 rottaa.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoidessa
Aikaisempi päätepiste pitkäaikaisissa seuran-noissa lopetuskriteerejä tarkastamalla	X	X	-	-
Lyhyempi seuranta-aika, jos lääkevaste on saa-vutettu	X	X	-	-
Pesämateriaali	X	X	X	-
Tukiruuun tarjoaminen operoinnin jälkeen	X	X	X	-
Eläinten etukäteisvalikointi perustuen veri-näytteestä määritettävään sappihappopitoi-suuteen maksan porttilaskimotukoksen havait-semiseksi	X	X	X	X

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, ks. EU-komission ohje ja esimerkki.

Hankkeen nimi	Lääkeaineiden farmakodynamiikan ja farmakokinetiikan tutkiminen kirurgisesti indusoiduissa prekliinisissä tautimalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Aivoverenkiertohäiriöt, aivoverenvuoto, aivotrauma, selkäydinvaurio, prekliininen lääketutkimus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Aivoverenkiertohäiriöiden, aivotrauman, aivoverenvuodon sekä selkäydintrauman hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lääkeai- neita ja taudeista koituu sekä yksilölle että yhteiskunnalle huo- mattavaa haittaa ja kustannuksia. Mainittujen aivosairauksien mallintaminen jyrksijöillä on ensisijainen keino uuden lääkeai- neen tehon, mekanismien ja turvallisuuden tutkimiseen ennen ihmisillä tehtäviä kliinisiä kokeita. Yritys tarjoaa lääkekehityste- ollisuudelle in vivo -eläinmalleja lupaavien lääkeaineiden prek- liiniseen testaukseen. Tavoitteena on edesauttaa potentiaalis- ten lääkeaineiden etenemistä kliinisiin kokeisiin jonka seurauk- sena mahdollistetaan tulevaisuudessa tehokas ja turvallinen lääkehoito em. sairauksiin. Käytettävät prekliiniset tautimallit ovat tieteellisessä kirjallisuudessa laajasti kuvattuja ja käytet- tyjä, ns. kultaisia standardeja toistettavuutensa ja ennustetta- vuutensa vuoksi. Tästä johtuen mallit ovat myös lääketieteellisuu- dessa laajalti käytettyjä malleja arvioitaessa kehitteillä olevien lääkeaineiden tai terapioiden tehoa aivosairauksia vastaan in vivo.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja aivove- renkiertohäiriöiden, aivotrauman, aivoverenvuodon sekä sel- käydintrauman hoitoon.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri, 3 000; rotta 10 200 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Kirurgisesti aiheutetut mallit aiheuttavat sekä indusointivai- heessa että tutkimuksen kuluessa kipua ja kärsimystä, joka voi olla voimakasta. Hankkeen haitat eläimille luokitellaan luok- kaan: Vakava. Tutkimukset ovat luonteeltaan akuutteja (muuta- masta tunnista-muutamaan päivään) tai kroonisia (useita kuu- kausia, yleensä ei yli 6kk). Tutkimuksen päätteeksi eläimet lo- petetaan joko inhalaatioanestesiassa, pentobarbitaali-yliannos-	

	tuksella, niskamurrolla tai dekapitaatiolla hiilidioksiditainnutuksessa. Lopetuksen jälkeen tarvittaessa kerätään veri-, selkäydinneste ja eri laisia kudospäytteitä. Vakavuusluokka: vakava
3R-menetelmien soveltaminen	Application of the 3Rs
1. Korvaaminen Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	1. Replacement In vitro -mallit aivoverenkiertohäiriöiden, aivotrauman, aivoverenvuodon sekä selkäydintrauman tutkimiseksi ovat hyvin rajalliset johtuen tautien monimuotoisuudesta ihmispopulaatioissa. Tästä johtuen sairauden mallintaminen luotettavasti vaatii useita malleja eri lajeissa ja niiden kannoissa. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä kokeita. In vitro kokeet ovat hyvin rajallisia johtuen tutkimusmenetelmien yksinkertaisuudesta verrattuna nisäkkään koko fysiologiaan. Myöskään tietokonepohjaiset simulaatiot eivät sovellu kyseisissä malleissa lääkeaineen tehon testaamiseen, johtuen lukuisista sairauden vakavuuden osatekijöistä.
2. Vähentäminen Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	2. Reduction 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.
3. Parantaminen a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	3. Refinement Suurin osa aivoverenkiertohäiriöiden, aivotrauman, aivoverenvuodon sekä selkäydintrauman eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä, sekä hiirissä että rotissa. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille lääkkeille ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat kohtalaiset. Ne ovat kuitenkin niin tieteellisen yhteisön kuin lääketeollisuuden hyväksymiä menetelmiä tutkia näitä sairauksia, koska parempia ei ole pystytty kehittämään tähän päivään mennessä. Alemmilla selkärangaisilla 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 vertaamalla uusista lääkeaineista saatavia tuloksia.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TAKAUTUVAA ARVIONTI

Saapumispvm: 12.1.2018, täydennys 5.2.2018, täydennys 27.9.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli testata uusien kehitettävien lääkeaihioiden tehoa aivoverenkiertohäiriöiden, aivotrauman, aivoverenvuodon sekä selkäydintrauman kokeellisissa eläinmalleissa hiirillä ja rotilla. Tavoitteena oli edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä kliinisiin kokeisiin potilailla. Käytetyt mallit ovat tieteellisessä yhteisössä ja kirjallisuudessa laajasti hyväksyttyjä ja käytettyjä toistettavuutensa ja ennustettavuutensa vuoksi.

Tutkimusmallit toimivat odotetusti ja niiden avulla voitiin arvioida luotettavasti testattujen lääkeainekandidaattien tehoa.

Tutkimusmalli soveltuu tähän tutkimukseen (+).

2. Millaista haittaa?

Kirurgisesti aiheutetut mallit aiheuttavat sekä indusointivaiheessa että tutkimuksen kuluessa kipua ja kärsimystä, joka voi olla pahimmillaan voimakasta. Hankkeen haitat eläimille luokitellaan luokkaan vakava. Tutkimukset olivat luonteeltaan akuutteja (muutamasta tunnista-muutamaan päivään) tai kroonisia (pisimmillään yhdeksän viikkoa). Osassa tutkimuksista kerättiin verinäytteitä kokeen aikana. Tutkimuksen päätteeksi eläimet lopetettiin, minkä jälkeen kerättiin veri-, selkäydinneste ja erilaisia kudokset.

Aivohalvaus

Aivohalvausmalleissa aiheutettiin kirurgisin menetelmin keskimmäisen aivovaltimon (a.cerebri media) tilapäinen tai pysyvä tukos. Mallin kirurgisen indusoinnin päätteeksi kaulan tai kallon avanteet, suonet, lihakset ja iho suljettiin ja eläimen annettiin herätä anestesiasta. Kaikkien yllä kuvattujen operaatioiden jälkeen aloitettiin post-operatiivinen hoito. Aivohalvausmallien tyypillisimmät oireet olivat toispuolinen halvaus sekä akuutti painolasku. Eläinten halvausoireet näkyivät etu- ja takaraajan tunnottomuutena ja heikkoutena sekä kehon kiertämisenä (puoltamisena), myös selältä kääntyminen hidastui akuutisti. Oireet väistyivät tai vähintään lievenivät selkeästi päivistä muutamaan viikkoon välisenä aikana. Pääsääntöisesti lopetuskriteerinä oli eläinten painonlasku tai minimaalinen vaurio kirurgian jälkeen, yksittäisissä tapauksissa lopetuskriteerinä olivat operaatiota seuranneet epileptiformiset kohtaukset. Aivohalvausmallissa kuolleisuus liittyi pääsääntöisesti vaurion laajuuteen, verenvuotoihin tai nukutuksen aikaisiin komplikaatioihin. Yksittäisissä tapauksissa selkeää kuolinsyytä ei onnistuttu määrittämään. Aivohalvauskokeiden seuranta-aika (kokeen kesto) vaihteli vuorokaudesta seitsemään viikkoon.

Aivotrauma

Aivotraumamallissa aiheutettiin aivovaurio mekaanisen voiman avulla kohdistamalla isku joko suoraan aivokudokseen käyttäen mekaanista aivotraumalaitetta sekä stereotaktista laitetta iskun kohdentamiseen. Operaation jälkeen aloitettiin post-operatiivinen hoito. Aivotraumamallien tyypillisimmät oireet olivat toispuolinen halvaus sekä akuutti painolasku. Eläinten halvausoireet näkyivät etu- ja takaraajan tunnottomuutena ja heikkoutena sekä kehon kiertämisenä (puoltamisena) myös selältä kääntyminen hidastui akuutisti. Oireet väistyivät tai vähintään lievenivät selkeästi päivistä muutamaan viikkoon välisenä aikana. Aivotraumamallissa kuolleisuus liittyi pääasiassa

vaurion laajuuteen tai nukutuksen aikaisiin komplikaatioihin. Aivotraumakokeiden seuranta-aika vaihteli vuorokaudesta viiteen viikkoon.

Aivoverenvuoto

Aivoverenvuotomallissa aiheutettiin aivovaurio injisoimalla rotan omaa verta suoraan aivokudokseen tyvitumakkeeseen. Operaation jälkeen aloitettiin post-operatiivinen hoito. Aivoverenvuotomallien tyypillisimmät oireet olivat toispuolinen halvaus sekä akuutti painolasku. Eläinten halvausoireet näkyivät etu – ja takaraajan tunnottomuutena ja heikkoutena sekä kehon kiertämisenä (puoltamisena) myös selältään kääntyminen hidastui akuutisti. Oireet väistyivät tai vähintään lievenivät selkeästi päivistä muutamaan viikkoon välisenä aikana. Aivoverenvuotomallissa kuolleisuus liittyi pääasiassa nukutuksen aikaisiin komplikaatioihin. Aivoverenvuotokokeiden seuranta-aika vaihteli vuorokaudesta neljään viikkoon.

Selkäydinvaurio

Kontuusio vauriomallissa toimenpiteessä tehtiin T10 nikaman kohdalle nikaman osittainen poisto, jotta selkäydin saatiin näkyviin. Tämän jälkeen paljastetun selkäytimen päälle aiheutettiin hallittu kontuusio (mekaaninen isku), jonka aikana seurattiin iskun voimakkuutta, nopeutta ja kestoa. Kontuusion jälkeen lihakset ja sidekudokset suljettiin kerroksittain ja lopulta selkänahka ja iho desinfioitiin. Operaation päätyttyä eläinten annetaan herätä anestesiasta ja ne siirrettiin toipumaan yksittäishäkkeihin ja aloitettiin post-operatiivinen hoito. Kontuusion vaikutuksesta selkäytimeen kehittyi vaurio, josta aiheutui totaalinen, mutta osittain palautuva takaraajahalvaus ja virtsaamiskyvyn heikkeneminen sekä akuutti painolasku. Oireet väistyivät tai vähintään lievenivät selkeästi päivistä muutamaan viikkoon välisenä aikana. Selkäydinvauriomallissa kuolleisuus liittyi pääasiassa nukutuksen tai operaation aikaisiin komplikaatioihin. Selkäydinvauriokokeiden seuranta-aika vaihteli kuudesta tunnista yhdeksään viikkoon.

PK

Farmakokineettisissä kokeissa, joissa eläimille ei tehty kirurgista operaatiota käytettiin 1072 rottaa ja 1007 hiirtä. Tehdyissä kokeissa kuoli tai lopetettiin lopetuskriteerien perusteella 40 rottaa. Kuolleisuus liittyi muihin kuin itse lääkkeeseen tai lääkintään liittyviin tekijöihin (esim. kasvaimet, huono liikkuminen tms.). Seuranta-ajat farmakokineettisissä kokeissa vaihtelivat viidestä minuutista kolmeen kymmeneen kahteen päivään.

Kokeissa, joissa ei aiheutettu aivo- tai selkäydinvauriota, mutta tehtiin kirurgista lääkkeenannostelua joko kerta-antona tai minipumpuilla käytettiin 235 rottaa ja 414 hiirtä. Kirurgiaa vaativa operaatio tehtiin 402 rotalle ja 27 rottaa toimi terveinä verrokkeina. Tehdyissä kokeissa kuoli 7 rottaa ja 13 hiirtä ja lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 8 rottaa. Kuolleisuus liittyi pääasiassa nukutuksen aikaisiin komplikaatioihin tai lääkeaihioiden annosteluun. Seuranta-ajat kokeissa, joissa lääkeannostelu suoritettiin kirurgisesti vaihtelivat 15 minuutista neljään kymmeneen yhdeksään päivään.

Ei haittaa (non-recovery) tyyppisiin kokeisiin käytettiin 240 rottaa. Nämä kokeet olivat pääsääntöisesti kuvantamiskokeita (MRI).

Trakeostomia-harjoittelu

Trakeostomia-operaatiossa jalan laskimo ja valtimo (v. and a. femoralis) kanyloitiin näytteenkeräystä (verikaasut) ja lääkeaineinfuusiota (lihasrelaksantti) varten. Henkitorveen asetettiin hengi-

tysputki kirurgisesti ventilaattoria varten. Eläimiä kuvannettiin 10 min – 1 h, jonka jälkeen ne lopetettiin välittömästi ilman herättämistä. Eläimet olivat anestesiassa koko operaation ja kuvantamisen ajan ja niiden elintoimintoja, kuten ruumiinlämpöä ja hengitystiheyttä seurattiin jatkuvasti.

Perifeerinen verenkiertohäiriö

Alaraajaiskemian mallissa kudoksen hapenpuute (iskemia) indusoiitiin kirurgisesti eläimen takaraajan luurankolihaskudokseen sulkemalla ja katkaisemalla joko reisivaltimo, tai vaihtoehtoisesti reisi-valtimo ja – laskimo yhdessä. Suonten ympärille solmittiin kaksi paria ligatuuria sulamattomasta langasta, ja parien väliin jäävältä matkalta poistettiin noin 5 mm:n pituinen pätkä suonta. Suonen katkaisemisella varmistettiin, ettei suoni päässyt nopeasti uudelleenkanavoitumaan.

Alaraajaiskemian kokeiden kesto vaihteli seitsemästä kahteenkymmeneen kahdeksaan päivään.

Valo- ja äänihoito aivotraumamallissa

Hiirille annettiin valo- ja äänihoitoa. Koeasetelmassa aivotraumalle altistetut koe-eläimet asetettiin yksittäin virikkeettömissä häkeissä valo- ja äänilähteellä varustettuun kammioon, jossa eläimet pystyivät vapaasti liikkumaan. Eläimet saivat valo- ja äänihoitoa 1 tunnin päivittäin yhteensä 21 vuorokauden ajan.

3. 3R-mahdollisuudet

Käytetyt eläinmäärät ovat pitkälti koe-asetelmasta 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 validaatio-kokeisiin, joiden tarkoituksena on ollut varmistaa mallin toistettavuus, kuolleisuusprosentti sekä mahdolliset muut kokeen kannalta kriittiset tekijät.

Kokeissa työskentelevä henkilökunta on koulutettua. Ennen pääsyä eläintyöhön työntekijät perehdytetään yrityksen toimintatapoihin. Jokainen operaation tekijä on suorittanut näytön kustakin kirurgisesta tekniikasta harjoittelujakson päätteeksi. Vain hyväksytysti näytön suorittaneet voivat operoida eläimiä kokeissa. Harjoittelu aloitetaan lopetetuilla eläimillä ja kun tekniset taidot katsotaan riittäviksi vastuulaborantin toimesta, siirrytään harjoittelemaan elävillä nukutetuilla eläimillä, jotka lopetetaan välittömästi operaation jälkeen ennen heräämistä. Kun kirurgiset taidot ovat riittävät, näyttö suoritetaan pilottikokeelle, jossa eläimet jätetään henkiin lyhyeksi ajaksi (kahdesta päivästä noin viikkoon), jotta mallin toimivuus kyseisen operoijan tekemänä voidaan varmistaa. Kullekin tekniikalle on määrätty oma vastuulaboranttinsa. Lisäksi kaikki eläintyötä tekevät teknikot ja tutkijat osallistuvat vuosittain yrityksen järjestämään eläinten hyvinvointikoulutukseen, jonka teema vaihtelee vuosittain.

Kokeissa samaa eläintä seurataan useassa aikapisteessä niin käyttäytymistesteissä kuin kuvantamisessa, jolloin tarvittava eläinmäärä pienenee. Pre-testien avulla taataan, että kokeisiin otetaan mukaan vain fyysisesti niihin sopivia eläimiä, jolloin ryhmien vertailu jälkikäteen on luotettavampaa (esimerkiksi aivohalvaustutkimuksissa jätettiin kokeiden ulkopuolelle yksittäisiä eläimiä, joilla havaittiin pre-testeissä epänormaalia käytöstä tai fyysisiä poikkeamia. Lopetuksen jälkeen näiden eläinten kohdalla todettiin aivojen olleen epämuodostuneet eli eläimet ovat olleet ns. vesipäitä).

Eläinten vointia seurataan leikkauksen jälkeen kahdesti päivässä vähintään 48 tunnin ajan, eläimen kunnon niin vaatiessa kauempaankin. Varsinkin selkäydinvauriokokeissa eläimiä voidaan tarvittaessa seurata tiheemmin koko kokeen keston ajan. Näissä kokeissa kahdesti päivässä tehtävä seuranta lopetetaan, kun eläimet pystyvät virtsaamaan itsenäisesti, eikä manuaalista rakon tyhjentä enää tarvita. Eläimiä tarkkaillaan myös mm. painonpudotuksen osalta ja jos paino putoaa alle lopetuskriteeripainon tukitoimista huolimatta, eläimet lopetetaan. Malleille on olemassa selkeät mallikohtaiset lopetuskriteerit, joita päivitetään saadun kokemuksen perusteella.

Eläimiä pidetään pääsääntöisesti ryhmähäkeissä, jolloin niillä on jatkuvasti tarjolla lajitovereiden seuraa. Poikkeuksen muodostavat laskimo/valtimoportti-operoidut eläimet, joita ei voida pitää ryhmissä. Portteja pyritään käyttämään useita kertoja kokeen aikana toistuvissa i.v.-lääkinnöissä tai pitkien infuusioiden aikana, jolloin suonensisäisen lääkinnän vaatiman pistämisen ja kiinnipitämisen sijaan lääkintä voidaan tehdä hyvin helposti ja kivuttomasti portin kautta.

Kokeissa käytettävä kuivike on vaihdettu luvan voimassaoloaikana haapahakkeesta maissikuivikkeeseen, koska maissikuivikkeen imukyky on haapahaketta parempi ja se myös pölyää vähemmän. Kuivikkeenvaihdon myötä häkkienvaihtoväliä on voitu pidentää ja näin ollen eläinten stressiä siltä osin vähentää. Samalla eläintenhoitajien aikaa on vapautunut muihin tukitoimiin häkinvaihtojen sijasta.

Tutkimusmallikohtaiset tukitoimet ja 3R

Aivohalvaus

Eläimiä pidetään lämpömatolla operaation jälkeen, jotta kehonlämpö pysyy normaalina nukutuksesta toipumisen ajan. Kipulääkintää ei tilapäisessä aivohalvausmallissa käytetä sen aiheuttaman korkean kuolleisuuden vuoksi sekä rotilla että hiirillä. Lähtökohtaisesti kaikissa malleissa käytetään joko NSAID tai opioidipohjaisia kipulääkkeitä ja aivohalvausmallissa päädyttiin opioidipohjaiseen siitä syystä, että NSAIDt vaikuttavat itse kehittyvään vaurioon. Opioidien kanssa havaitsimme selkeän aivoverenvuototaipumuksen, jota ei normaalisti näe ilman niitä. Kokemukset perustuvat kolmeen erilliseen kokeeseen, joissa kuolleisuus oli 30–50 %, kun se muuten mallissa on 10–20 %.

Nesteytys ja tukiruokinta (pehmitetty ruoka) on tärkeä aivohalvausmallissa, jossa eläinten paino voi pudota alkuun rajusti. Huonokuntoisille eläimille voidaan annostella pehmitettyä rehua myös oraalisesti ruiskulla oma-aloitteisen syömisen kannustamiseksi. Painonseuranta jatketään koko kokeen ajan. Tarvittaessa eläimiä voidaan eristää yksittäishäkkiin tukihoitoon tehostamiseksi.

Aivohalvausmalleissa rottakanta vaihdettiin Sprague Dawleysta Wistariin. Syy vaihtoon oli mallissa lisääntynyt hajonta, jonka seurauksena eläinkantaa vaihdettiin ja havaittiin sen johtavan yhdenmukaisempiin vaurioihin. Samaan aikaan rottakannan vaihdon kanssa validoitiin käytettäväksi kaupallinen silikonipäällysteinen siima/lanka aiemmin käytössä olleiden, itse valmistettujen siimojen sijaan. Silikonipäällysteiseen siimaan vaihtamalla pystyttiin minimoimaan mahdolliset siimasta johtuvat suonensisäiset vauriot.

Aivotrauma

Eläimiä pidetään lämpömatolla operaation jälkeen, jotta kehonlämpö pysyy normaalina nukutuksesta toipumisen ajan. Aivotrauma mallissa kipulääkintää jatketaan tavallisesti 48 tuntia operaation jälkeen. Seuranta-ajan ollessa lyhyempi, kipulääkintä tehtiin viimeisen kerran joko lopetusta edeltävänä iltana tai samana aamuna kuin lopetukset.

Nesteytys ja tukiruokinta (pehmitetty ruoka), aivotraumamallissa pehmennetyn rehun syöttöä ruiskulla ei ole tarpeen tehdä eläinten aivohalvausmallia paremman kunnon vuoksi. Eläinten painoa seurataan päivittäin koko kokeen ajan.

Aivoverenvuoto

Eläimiä pidetään lämpömatolla operaation jälkeen, jotta kehonlämpö pysyy normaalina nukutuksesta toipumisen ajan. Aivoverenvuotomallissa kipulääkintää jatketaan tavallisesti 48 tuntia operaation jälkeen. Seuranta-ajan ollessa lyhyempi viimeinen kipulääke annettiin joko lopetusta edeltävänä iltana tai lopetuspäivän aamulla.

Nesteytys ja tukiruokinta (pehmitetty ruoka), aivoverenvuotomallissa pehmennetyn rehun syöttöä ruiskulla ei ole tarpeen tehdä eläinten aivohalvausmallia paremman kunnon vuoksi. Eläinten painoa seurataan päivittäin koko kokeen ajan.

Selkäydinvaurio

Selkäydinvauriomallissa rotat totutetaan käsittelyyn ennen operaatiota, jotta niitä olisi helppo käsitellä tukihoitoa aikana. Eläinten totuttaminen käsittelyyn vähentää eläimen kokemaa stressiä tukihoitoa ja mahdollisen virtsarakon manuaalisen tyhjennyksen aikana. Selkäydinvauriomallissa kipulääkintää jatketaan tavallisesti 48 tuntia operaation jälkeen. Seuranta-ajan ollessa lyhyempi kipulääke annettiin viimeisen kerran lopetusta edeltävänä iltana tai lopetuspäivän aamuna.

Eläimiä pidetään lämpömatolla operaation jälkeen, jotta kehonlämpö pysyy normaalina nukutuksesta toipumisen ajan.

Nesteytys ja tukiruokinta (pehmitetty ruoka), selkäydinvauriomallissa pehmennetyn rehun syöttöä ruiskulla ei ole tarpeen tehdä eläinten aivohalvausmallia paremman kunnon vuoksi. Eläinten painoa seurataan päivittäin koko kokeen ajan. Tarvittaessa ja varsinkin operaatiota seuraavina päivinä eläinten virtsarakko tyhjennetään manuaalisesti tarvittaessa. Virtsaamisen avustamista jatketaan niin kauan kuin se on tarpeen, tarvittaessa koko kokeen ajan. Virtsarakko tyhjennetään käsin, siten että eläimen rakkoon kohdistetaan kevyt paine. Halvaantuneille eläimille käytetään maissi-haapahakeseosta, mikä helpottaa eläinten liikkumista häkissä.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pysytettiin jatkossa vähentämään?
Osahanke 1 - Aivohalvaus	Rotta	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja koikeista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lääkeainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	2800/1592	Vakava/ Vakava 1477 (aivohalvaus); Kohtalainen 88 (SHAM), 153 (ei aivovauriota; operaatio suoritettu, mutta vaurio ei ole syntynyt); lievä 29 (naivi kontrolli = ei operoitu, muuten samat toimenpiteet kuin muilla) Ei heräämistä 30 (kirurgian harjoittelu)	Vakava: Haitta on mallista johtuva. Tehdyissä kokeissa kuoli 262 rottaa ja lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 123 rottaa.	Tukiruokinta ja nesteytys. Lisäksi vuonna 2015 tehtiin sisäinen validaatio, jossa todettiin Wistar-kannan rottien kehittävän yhtenevämpiä oireita toisen kannan rottiiin verrattuna ja silikonipäällysteinen siimojen vähentävän suonensisäisestä vauriosta johtuvia verenvuotoja kallon pohjassa.
Osahanke 1 - Aivohalvaus	Hiiri	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja koikeista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lääkeainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	800/257	Vakava/ Vakava 245 (aivohalvaus); Kohtalainen 9 (ei aivovauriota operaatio suoritettu, mutta vaurio ei ole syntynyt), lievä 4 (naivi kontrolli), ei heräämistä 20 (kirurgian harjoittelu)	Vakava: Haitta on mallista johtuva Tehdyissä kokeissa kuoli 70 hiirtä ja lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 5 hiirtä	Tukiruokinta ja nesteytys

Osahanke 2 - Aivo-trauma	Rotta	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja ko-keista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lää-keainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	2800/333	Vakava/ Vakava 282 (aivotrauma); Kohtalainen 50 (SHAM), ei heräämistä 30 (kirurgian harjoittelu)	Vakava: Haitta on mallista johtuva Tehdyissä kokeissa kuoli 19 rottaa ja lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 1 rotta.	Tukiruokinta ja nesteytys. Vuonna 2014 hankittu uusi trauma/selkäydinvauriolaite validoitiin käyttöön vaurioko-kojen hajonnan vähentä-miseksi.
Osahanke 2 - Aivo-trauma	Hiiri	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja ko-keista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lää-keainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	800/464	Vakava/ Vakava 319 (aivotrauma); Kohtalainen 145 (SHAM), ei heräämistä 20 (kirurgian harjoittelu)	Vakava: Haitta on mallista johtuva Tehdyissä kokeissa kuoli 3 hiirtä ja lo-petuskriteereiden perusteella lope-tettiin 2 hiirtä.	Tukiruokinta ja nesteytys. Vuonna 2014 hankittu uusi trauma/selkäydinvauriolaite validoitiin käyttöön vaurioko-kojen hajonnan vähentä-miseksi.
Osahanke 3 - Aivove-renvuoto	Rotta	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja ko-keista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lää-keainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	1800/157	Vakava/ Vakava 137 (aivoveren-vuoto); Kohtalainen 20 (SHAM)	Vakava: Haitta on mallista johtuva Tehdyissä kokeissa kuoli 17 rottaa ja lopetuskriteerien perusteella lo-petettiin 9 rottaa.	Tukiruokinta ja nesteytys
Osahanke 4 - Selkä-ydinvaurio	Rotta	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja ko-keista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lää-keainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	2800/374	Vakava/ Vakava 321 (selkäydinvau-rio); Vakava 50 (SHAM); lievä 3 (naiivi kontrolli), ei heräämistä 30 (kirurgian harjoittelu)	Vakava: Haitta on mallista johtuva Tehdyissä kokeissa kuoli 17 rottaa ja lopetuskriteerien perusteella lo-petettiin 28 rottaa.	Selkäydinvauriomallissa rotille laitetaan maissi-haapahake-seosta liikkumista helpotta-maan, tukiruokinta, nesteytys, rakon tyhjennys manuaalisesti (kevyt painelu) vähintään kaksi kertaa päivässä taudin in-dusoinnista rakon toiminnan normalisoitu-miseen. Vuonna 2014 hankittu uusi trauma/selkäydinvauriolaite validoitiin käyttöön vaurioko-kojen hajonnan vähentä-miseksi.

Osahanke 4 -Selkäydinvaurio	Hiiri	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja ko-keista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lää-keainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	800/26	Vakava/ Vakava 14 (selkäydinvau-rio); Vakava 8 (SHAM); lievä 4 (naiivi kontrolli), ei heräämistä 20 (kirur-gian harjoittelu)	Vakava: Haitta on mallista johtuva Tehdyissä kokeissa kuoli 3 hiirtä ja lo-petuskriteereiden perusteella lope-tettiin 3 hiirtä.	Tukiruokinta, nesteytys, rakon tyhjennys manuaalisesti (kevyt painelu) vähintään kaksi kertaa päivässä taudin indusoinnista rakon. toiminnan normalisoitumi-seen. Vuonna 2014 hankittu uusi trauma/selkäydinvaurio-laite validoitiin käyttöön vau-riokokojen hajonnan vähentä-miseksi.
Farmako-kineettiset kokeet	Rotta	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja ko-keista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lää-keainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	1020 (arvio: 10% kokonais-lukumäärästä) /1072	Vakava/Lievä	Lievä Tehdyissä kokeissa kuoli 15 rottaa ja lopetuskriteerien perusteella lope-tettiin 25 rottaa.	Rottien anestesia i.v.-lääkin-nässä ja i.v.-näytteenotossa. Laskimo/valtimoporttien käyttö toistuvissa suonensisäi-sissä lääkinnöissä.
Farmako-kineettiset kokeet	Hiiri	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja ko-keista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lää-keainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	300 (arvio:10% kokonaisluku-määrästä) /1007	Vakava/Lievä (i.v. lääkinnöissä kohtalai-nen johtuen hereillä ole-van eläimen kiinnipitämi-sestä putkessa)	Lievä	Laskimo/valtimoporttien käyttö toistuvissa suonensisäi-sissä lääkinnöissä.
Kirurgiaa vaativa lääkkeen anto ilman aivo- tai selkäydin-vauriota	Rotta	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja ko-keista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lää-keainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	2800/276	-	Kohtalainen Tehdyissä kokeissa kuoli 7 rottaa ja lo-petuskriteerien pe-rusteella lopetet-tiin 8 rottaa.	-

Kirurgiaa vaativa lääkkeen anto ilman aivo- tai selkäydinvauriota	Hiiri	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja ko-keista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lää-keainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	800/384	-	Kohtalainen Tehdyissä kokeissa kuoli 13 hiirtä.	-
MRI-kuvantaminen ilman kirurgiaa	Rotta	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja ko-keista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lää-keainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	2800/115 (kaikki kuvan- tamista vaati- vat kokeet luo- kiteltu aivohal- vausosion alle, vaikka eläi- mille ei ole in- dusoitu aivo- vauriota)	-	Lievä	-
Trakeosto- miahar- joittelu	Rotta	Tutkimusmenetelmä pys- tytetty onnistuneesti.	20/18	Ei heräämistä (eläimet anestesiassa koko kokeen ajan)	Ei heräämistä (eläi- met anestesiassa koko kokeen ajan)	Eläimen lopettaminen ennen heräämistä.
Trakeosto- miahar- joittelu	Hiiri	Tutkimusmenetelmä pys- tytetty onnistuneesti.	20/11	Ei heräämistä (eläimet anestesiassa koko kokeen ajan)	Ei heräämistä (eläi- met anestesiassa koko kokeen ajan)	Eläimen lopettaminen ennen heräämistä.
Perifeeri- nen veren- kiertohäi- riö	Rotta	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja ko- keista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lää- keainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luot- ettavasti.	10200/15	Vakava 12, Kohtalainen 3 (sham)	Vakava; haitta on mallista johtuva. Tehdyissä kokeissa lopetettiin 1 rotta lopetuskriteerien perusteella	Vaikka tutkimus sinänsä onnis- tui suunnitelman mukaisesti, on jatkotutkimukset lupakau- den päättymisen jälkeen alka- neella uudella lupa-kaudella tehty eläimen hyvinvoinnin kannalta vähemmän vakavalla mallilla. Muutokseen päädyt- tiin mallin vakavan haitta-as- teen takia.

Perifeerinen verenkiertohäiriö	Hiiri	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja kokeista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lääkeainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	3000/71	Vakava 71	Vakava; haitta on mallista johtuva. ehdyissä kokeissa kuoli 1 hiirtä ja 10 hiirtä lopetettiin lopetuskriteerien perusteella	Vaikka tutkimus sinänsä onnistui suunnitelman mukaisesti, on jatkotutkimukset lupakauden päättymisen jälkeen alkaneella uudella lupa-kaudella tehty eläimen hyvinvoinnin kannalta vähemmän vakavalla mallilla. Muutokseen päädyttiin mallin vakavan haitta-asteen takia.
Valohoito aivotraumassa	Hiiri	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja kokeista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lääkeainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	80/61	Vakava 41; kohtalainen 20 (SHAM)	Vakava; haitta on mallista johtuva. Kokeessa kuoli yksi hiiri (SHAM)	

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	x	x	-	-
Lyhyempi seuranta-aika	x	-	-	-
Pesämateriaali ja kuivikkeet	x	-	-	-
Lisälämpö operoinnin jälkeen	x	-	-	-
Totuttaminen	x	x	x	-
Riittävä koulutus ja perehdytys	x	x	x	-
Validaatiot ja pilotointi	x	x	x	-

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, ks. EU-komission ohje ja esimerkki .		
Hankkeen nimi	Lääkeaineiden tehon testaaminen epilepsian ja migreenin prekliinisissä tautimalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	epilepsia, migreeni, prekliininen lääketutkimus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Epilepsian ja migreenin hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lää- keaineita. Molemmat em. taudit aiheuttavat potilaille ja heidän omaisilleen kärsimystä ja taudeista koituu yhteiskunnalle huo- mattavia kustannuksia. Yritys tarjoaa lääkekehitysteollisuudelle in vivo -eläinmalleja lupaavien lääkeaineiden prekliiniseen tes- taukseen. Tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeai- neiden etenemistä klinisiin kokeisiin.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja migree- niin ja epilepsiaan. Tutkimusmallien käyttö edistää myös em. tautien mekanismien tutkimista, mikä edesauttaa uusien lää- kkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Rotta 1500 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Tutkimuksessa eläimille aiheutuu haittaa kirurgisista toimenpi- teistä, indusoiduta sairaustilasta, annosteluista, näytteen- otoista sekä yksinpidosta seuranta-aikana. Tutkimuksen päät- teeksi eläimet lopetetaan. Vakavuusluokka: vakava, kohtalainen	
3R-menettelmien soveltaminen	Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	1. Replacement In vitro -mallit migreenin ja epilepsian tutkimiseksi ovat hyvin rajalliset johtuen taudin moniulotteisuudesta, käsittäen her- moverkkojen yhteistoiminnan eri aivoalueiden välillä sekä kes- kushermostoon liittyvän patologian. Uusien lääkkeiden todel- lista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotet- tavasti vain koe-eläinmalleissa ennen klinisiä kokeita. Myös- kään tietokonepohjaiset simulaatiot epilepsian ja migreenin tutkimuksessa eivät ole mahdollisia johtuen taudin mekanis- mien monimutkaisuudesta.	

2. Vähentäminen Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	2. Reduction 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.
3. Parantaminen a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	3. Refinement 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. Alemmilla selkärankaisilla tai in vitro -menetelmin ei voida saada samanlaista tietoa uusien lääkeaineiden tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole standardoituja eivätkä yleisesti hyväksyttyjä ja käytettyjä. Tämän lisäksi näistä menetelmistä ei ole saatavissa tietoa tällä hetkellä käytettyjen lääkeaineiden vasteista, joita voitaisiin käyttää verrattaessa uusista lääkeaineista saatavia tuloksia. Yksinpidon aiheuttamaa haittaa pienennetään virikkeiden avulla.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN
Saapumispvm: 12.2.2018, tarkennukset 29.5.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli testata uusien kehitettävien lääkeaineiden tehoa epilepsian ja migreenin kokeellisissa eläinmalleissa rotilla. Tavoitteena oli edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etene- mistä klinisiin kokeisiin potilailla. Käytetyt mallit ovat tieteellisessä yhteisössä ja kirjallisuudessa laa- jasti hyväksyttyjä ja käytettyjä toistettavuutensa ja ennustettavuutensa vuoksi.

2. Millaista haittaa?

Tutkimuksessa eläimille aiheutui haittaa kirurgisista toimenpiteistä, indusoiduista sairaustiloista, annosteluista, näytteenotoista sekä yksinpidosta seuranta-aikana. Tutkimuksen päätteeksi eläimet lopetettiin. Lopetuksen yhteydessä kerättiin kudokset.

Epilepsia

Osahankkeessa 1 tavoitteena oli tutkia lääkeaineiden vaikutusta epilepsiaautimallisissa, jossa rotille aiheutettiin kemiallisesti epilepsia-kohtauksia. Lääkeaineiden vaikutusta epilepsia-kohtauksiin arvi- oitiin seuraamalla eläimen käyttäytymistä, epilepsia-kohtausten voimakkuutta, kestoa ja määrää

seurantajakson aikana. Kirurgisia menetelmiä kokeessa ei käytetty lainkaan. Lisäksi lääkeaineiden tehoa epilepsiamallissa tutkittiin rotan terminaalinäytteistä. Näistä menetelmistä ja mittauksista eläimille aiheutui vähäistä haittaa. Sen sijaan eläimille aiheutui vakavaa haittaa epileptisistä kohtauksista, joista osa oli luonteeltaan hyvin voimakkaita (eläimen kaatuilu, pyöriminen). Epilepsian tutkimusmalleissa on kirjallisuuden mukaan todettu joissakin tutkimuksissa huomattavaa kuolleisuutta (20-80%) tutkimusmallista riippuen. Tässä hankkeessa todettiin n. 30% kuolleisuus, mikä on suunnilleen samaa luokkaa kuin mitä on aikaisemmin havaittu.

Migreeni

Osahankkeessa 2 tavoitteena oli tutkia lääkeaineiden vaikutusta migreenimallissa, jossa rotille annosteltiin tutkittavia lääkeaineita eripituisia jaksoja ja sen jälkeen aiheutettiin nukutuksessa migreenikohtauksia joko kemiallisesti tai sähköisesti. Lääkeaineiden vaikutusta kohtausten voimakkuuteen, taajuuteen ja kestoon mitattiin elektrofysiologisilla mittauksilla nukutuksen aikana. Lisäksi lääkeaineiden tehoa migreenimallissa tutkittiin rotan terminaalinäytteistä (esim. aivot, aivokalvo, plasmanäytteet). Tutkimuksessa aiheutui haittaa lähinnä lääkintään liittyvistä sivuvaikutuksista, joiden takia muutamia eläimiä jouduttiin lopettamaan tai löydettiin kuolleenä lääkinnän kuлуessa. Koska lääkeaineet ovat vielä kehitysvaiheessa, ei niiden turvallisuudesta olla varmaa tietoa. Myös tulokset lääkeaineiden haitallisista sivuvaikutuksista ovat tärkeitä lääkekehitystyössä, ja nämä raportoidaan eteenpäin asiakkaille. Lääkintään kuolleiden eläinten lisäksi yksittäisiä eläimiä menehtyi nukutuksen aikana migreenimittauksissa anestesiaan liittyvissä komplikaatioissa. Muuten toimenpiteistä ei aiheutunut lääkinnän lisäksi muuta haittaa, koska kaikki migreenimittauksiin mittauksiin liittyvät toimenpiteet suoritettiin nukutuksessa.

3. 3R-mahdollisuudet

Käytetyt eläinmäärät ovat pitkälti koe-asetelmasta 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 validaatio-kokeisiin, joiden tarkoituksena on ollut varmistaa mallin toistettavuus, kuolleisuusprosentti sekä mahdolliset muut kokeen kannalta kriittiset tekijät.

Kokeissa työskentelevä henkilökunta on koulutettua. Ennen pääsyä eläintyöhön työntekijät perehdytetään yrityksen toimintatapoihin. Lisäksi kaikki eläintyötä tekevät teknikot ja tutkijat osallistuvat vuosittain yrityksen järjestämään eläinten hyvinvointikoulutukseen, jonka teema vaihtelee vuosittain. Malleihin liittyviä lopetuskriteerejä käydään läpi henkilökunnan kanssa.

Eläimiä pidetään pääsääntöisesti ryhmähäkeissä, jolloin niillä on jatkuvasti tarjolla lajitovereiden seuraa. Kokeissa käytettävä kuivike on vaihdettu luvan voimassaoloaikana haapahakkeesta maissi-kuivikkeeseen, koska maissikuivikkeen imukyky on haapahaketta parempi ja se myös pölyää vähemmän. Kuivikkeenvaihdon myötä häkkienvaihtoväliä on voitu pidentää ja näin ollen eläinten stressiä siltä osin vähentää. Samalla eläintenhoitajien aikaa on vapautunut muihin tukitoimiin häkinvaihtojen sijasta.

Epilepsiaosahankkeessa ei itse kuolleisuuden määrää ole pystytty vähentämään. Kuolleisuus on suunnilleen samalla tasolla kirjallisuudessa havaittavan kuolleisuuden kanssa. Tavoitteena on kuitenkin ollut saavuttaa tutkimuksen tieteellinen tavoite mahdollisimman pienellä kuolleisuudella. Sen sijaan tarkkojen lopetuskriteerien avulla pyritään ehkäisemään eläimelle aiheutuvia haittoja.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.						
Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Epilepsia	Rotta	Käytetyt eläinmallit toimivat odotetusti ja antoivat luotettavia tuloksia lääkeaineiden tehokkuudesta.	750/255	Vakava/Vakava 255	Epilepsia osahankkeessa ei käytetty kirurgisia menetelmiä lääkeaineiden annostelussa. Itse lääkeaineiden annostelua ja epilepsian indusointi onnistui hyvin. Vakavin haitta aiheutui mallin indusoinnista johtuvista epilepsiakohtauksista. Malliin liittyi korkeaa kuolleisuutta. Eläimiä kuoli kohtauksiin tai niitä jouduttiin lopettamaan liian voimakkaiden kohtausten takia n. 30% (92 eläintä).	Eläinten hyvinvointia epilepsiamalleihin liittyvässä tutkimuksessa voidaan jatkossa pyrkiä edelleen parantamaan usealla eri tavalla (Lidster et al. 2016: Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures. J. Neuroscience Meth. 260:2-25). Tällaisia keinoja ovat esim. eläinkantoihin, eläinten toimittajaan, ikään ja sukupuoleen liittyvän variaation vähentäminen; tutkimuksen käytännön toimenpiteiden suorittamisen suunnittelu siten, että tutkimuksen tieteellinen tavoite saavutetaan mahdollisimman alhaisella malliin liittyvällä kuolleisuudella; lopetuskriteerien tarkka läpikäynti henkilökunnan kanssa siten, että kaikki tietävät tarkasti, milloin eläin täytyy lopettaa; epilepsian indusointi eläinkohtaisesti kasvavalla annoksella, sen sijaan, että kaikille eläimille annosteltaisiin sama annos – herkäät eläimet säästyvät yliannokselta.

Migreeni	Rotta	Käytetyt eläinmallit toimivat odotetusti ja antoivat luotettavia tuloksia lääkeaineiden tehokkuudesta.	750/559	Kohtalainen/ei toipumista - lievä (eläin unessa, ei komplikaatioita, lääkkeen annostelu 3 viikkoa – 5 min ennen mittausta: 547 eläintä; eläin kuollut mittauksen aikana anestesiassa: 5 eläintä; eläin kuollut lääkintäjakson aikana: 3 eläintä) yhteensä 555 eläintä. vakava (eläin lopetettu lääkkeen haittavaikutusten takia) 4 eläintä.	Eläimille annosteltiin tutkittavia lääkeaineita eripituisia jaksoja ja sen jälkeen aiheutettiin nukutuksessa migreenikohtauksia joko kemiallisesti tai sähköisesti. Myös varsinaiset migreeni-mittaukset suoritettiin eläimen ollessa anestesiassa. Anestesian aikana suoritetusta migreenin indusoinnista tai varsinaisista mittauksista ei eläimelle aiheudu suurempaa haittaa. Vakavin haitta kohdistui eläimiin, jotka jouduttiin lopettamaan lääkeannostelun sivuvaikutusten takia tai löydettiin kuolleena migreenimittausta edeltävän lääkintäjakson aikana.	Lääkeaineiden turvallisuuteen liittyen pyritään asiakkaalta saamaan kaikki mahdollinen tieto, jolla voidaan vähentää lääkkeen annosteluun liittyviä mahdollisia eläimen hyvinvointia vaarantavia tekijöitä. Kun operointi ja mittaukset tehdään nukutuksessa, eläimelle ei aiheudu näistä nukutusta suurempaa haittaa.
----------	-------	--	---------	---	--	---

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	x	x	x	-
Riittävä koulutus ja perehdytys erityisesti lopetuskriteereihin liittyen	x	x	x	-
Validaatiot ja pilotointi	x	x	x	-
Lääkeaineiden turvallisuuteen liittyvien tietojen saaminen yhteistyökumppaneilta	x	x	x	-

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, ks. EU-komission ohje ja esimerkki .		
Hankkeen nimi	Aivoverenkiertohäiriöiden hoito soluterapialla, lääkkeillä ja kuntoutuksella	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	aivoverenkiertohäiriöt, iskeeminen kudostuho, toiminnallinen kuntoutuminen, hoito	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä,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
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Väestön ikääntyessä keskushermoston sairaudet kuten erilaiset aivoverenkiertoon liittyvät ongelmat lisääntyvät ja niiden mer- kitys jokapäiväistä elämää vaikeuttavana tekijänä korostuu. Tässä hankkeessa kehitetään hoitoja, joilla voidaan estää tai lie- vittää iskeemistä kudostuho ja tehostaa toiminnallista kun- toutumista (mm. soluterapia, lääkehoito, kuntoutus) aivoveri- suonitukoksen jälkeen.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyöttyä hankkeen tuloksista)	Uusilla hoidoilla voidaan parantaa aivoverenkiertohäiriöistä kärsivien potilaiden elämänlaatua ja vähentää kalliin erikoislai- toshoidon ja kuntoutuksen tarvetta.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Rotta 900, hiiri 150 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Tutkimuksessa eläimille aiheutuu haittaa aivoverenkiertohäi- riön aiheuttamisesta, tutkittavien aineiden annosteluista, mo- torisista testeistä ja kuvantamisista. Kokeen jälkeen eläimet lo- petetaan histologiaa ja kudostutkimuksia varten. Vakavuusluokat: vakava	
3R-menettelmien soveltaminen	Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	1. Replacement Sensorimotoristen ja kognitiivisten toimintojen tutkiminen ei ole mahdollista in vitro –menetelmillä tai kehitystasoltaan alemmilla eläimillä.	
2. Vähentäminen Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?	2. Reduction Voima-analyysillä on varmistettu pienin mahdollinen eläin- määrä, jolla saadaan tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välille (yleensä 10-15 eläintä per ryhmä).	
3. Parantaminen a) Perusteet eläinlajin valinnalle.	3. Refinement a) Rotan aivoverenkierto tunnetaan hyvin ja se vastaa ihmisen aivoverenkiertoa. Rotan sensorimotoristen ja kognitiivisten	

b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	toimintojen arviointi huomattavasti luotettavampaa ja helpompaa kuin esimerkiksi hiiren. b) Tässä hankkeessa käytetyt kokeelliset mallit mallintavat hyvin ihmisen aivoverenkiertohäiriöitä (mm. pysyvä tukos, ohimenevä tukos). c) Kaikki invasiiviset toimenpiteet tehdään eläimen ollessa nukutuksessa. Toimenpiteiden jälkeen huolehditaan asianmukaisesta kivunlievityksestä. Eläinten painonkehitystä ja hyvinvointia seurataan säännöllisesti.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 14.2.2018, tarkennukset 4.6.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää aivoverenkiertohäiriöihin (AVH) hoitoja joko estämällä akuuttia solukuolemaa (osahanke 1) tai edistämällä toiminnallista kuntoutumista (osahanke 2).

Varsinaisia solukuoleman estokokeita (osahanke 1) ei hankkeen aikana ollut. Yhdessä väitöskirjatyön viimeistelyssä käytettiin siimamallia ja suurehkossa Horizon2020 –hankkeessa pysyvää tukosmallia. Molemmissa saavutettiin tavoitteet.

Siimamallissa (ohimenevä aivovaltimon tukos) verenkierto palautuu ja sitä voidaan käyttää tutkitessa solujen kulkeutumista iskeemiseen aivokudokseen ja veriaivoesteen läpi. Sen ongelmana on kuitenkin massiivinen kudostuho, joka ei ole kliinisesti relevantti (Corbett et al., 2017). Tämä olikin syynä, että Horizon2020 –hankkeessa päädyttiin toiseen iskemiamalliin. Pysyvän kudostumallin etuna on myös se, ettei eläimen paino putoa operaation jälkeen ja kaiken kaikkiaan hyvinvointiongelmia on vähemmän.

2. Millaista haittaa?

Ohimenevä aivovaltimon tukos:

- kokeet eivät varsinaisia neuroprotektiotutkimuksia ja kipulääkitys annettiin ennen ja jälkeen operaation, seuranta-aika max 3 vrk, MRI-kuvaus, kuvattua diabetestä ei aiheutettu
- tyypillistä ko mallille on vakava painonmenetys ensimmäisten vuorokausien aikana, tästä syystä tukiruokinta ja tarvittaessa vatsaontelon sisäisesti keittosuola
- haitat olivat tiedossa, eläimiä ei jouduttu lopettamaan huonon kunnon vuoksi osin johtuen lyhyestä seurannasta

Pysyvä aivovaltimon tukos:

- osa eläimistä käytettiin mallin validointiin ja operaatioharjoitteluun
- kipulääkitys annettiin ennen ja jälkeen operaation
- eläimillä ei merkittävää painonmenetystä, osalla eläimistä leikkaushaava avautui ja ne paikattiin
- seurannan aikana eläimillä 2x MRI, 3x verinäyte ja useita käyttäytymistestejä, joten kertyvä haitta kohtalainen

- muutama eläin hylättiin kokeesta koska eivät oppineet käyttäytymistestejä tai aiheutettu leesio oli pieni/suuri (päätetty ennen koetta), lopetuskriteerien perusteella ei hylätty eläimiä
- eläinten operaatiossa odotettua suurempi kuolleisuus, joka tasoittui leikkausten edetessä, ei aiheuttanut hyvinvointiongelmia
- yllätyksenä tuli 2 eläimelle etuhampaiden kasvu, jotka leikattiin

3. 3R-mahdollisuudet

Motorista tai kognitiivista kuntoutumista aivoiskemian jälkeen voidaan tutkia ainoastaan eläimillä. Kuitenkin edelleen on epäselvää, miksi niin monet eläinmalleissa löydetty mekanismit/lääkeaineet eivät toimi potilailla.

Koeasetelmiin ja malleihin liittyviä ohjeistuksia on julkaistu lukuisia. Suunta on varmasti oikea, luotettavimmat kokeelliset mallit vähentävät eläinkokeiden määrää. Aikaisemmin paljon käytetystä siimamallista (tMCAO) ollaan vähitellen luopumassa ja erityisesti tähän malliin liittyvät hyvinvointiongelmien vähenevät.

Uusissa malleissa eläinten välistä variaatiota leesion koossa ja paikassa voidaan paremmin kontrolloida, mikä tarkoittaa pienempiä ryhmäkokoja. Toisaalta tätä on myös kritisoitu, koska mennään yhä kauemmas kliinisestä hyvin heterogeenisestä potilasaineistosta.

Kansainvälinen yhteistyö ja tutkimusmateriaalin entistä tehokkaampi käyttö ja avoimuus varmasti lisäävät eläimistä saadun tiedon hyödynnettävyyttä.

Muuta Taulukko 2. Hankkeessa sovellettava ja Omassa toiminnassa sovellettava ero epäselvä

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Erityistä aiheutettuun haittaan liittyen: esim. satunnainen / toistuva, saatu vähenemään/ loppumaan 3R-keinoin	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa?
Osahanke 2/ohimenevä aivovaltimon tukos	rotta	tavoitteet saavutettu	900/57	vakava/oma arvio kohtalainen: Pään traumaan verrattuna: ohimenevä aivovaltimon tukos ja pään trauma johtavat akuuttiin aivoturvotukseen, ko. iskemiamallissa lisäksi vakava painonmenetys johtuen todennäköisesti a. externa carotiksen katkaisusta, muuten komplikaatiot hyvin samanlaisia.	kipulääkitys annettu ennen ja jälkeen operaation, eläimillä akuutti aivoturvotus, silmien rähmiminen ja voimakas painon lasku (15% 3 vrk), halvausoireet jyrkijöillä lyhytaikaisia, lyhyen seurannan (max 3 vrk) ja tehokkaan kipulääkityksen perusteella vakavuusluokka kohtalainen	osahankkeen kokeet tyypiltään ”exploratory” jolloin eläinmäärät voivat olla pieniä, ko. mallista ollaan siirtymässä pois, jolloin hyvinvointiongelmien todennäköisesti vähenevät
Osahanke 2/pysyvä aivovaltimon tukos	rotta	tavoitteet saavutettu	900/190	vakava/oma arvio kohtalainen Pysyvä aivovaltimon tukos ja pään trauma johtavat akuuttiin aivoturvotukseen, komplikaatiot hyvin samanlaisia, mm. silmien rähmiminen.	kipulääkitys annettu ennen ja jälkeen operaation, eläimillä akuutti aivoturvotus, leikkausalueen turvotus ja silmien rähmiminen, halvausoireet lieviä ja ohimeneviä, vakavuusluokka kohtalainen perustuen tehokkaan kipulääkitykseen, eläinten totutukseen testeihin ja kaasuanestesian käyttöön kuvauksissa ja verinäytteiden otossa.	malliin ei liity painonmenetystä, voima-analyysin perusteella määritetty eläinmäärät

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Käyttäytymistestien vähentäminen	X	-	-	-
Lyhyempi seuranta-aika	X	-	-	-
Pesämateriaali	X	X	X	X
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	X
Totuttaminen	X	X	X	X
Postoperatiivinen kivunpoisto	X	X	X	X
Voima-analyysi	X	X	X	X

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, ks. EU-komission ohje ja esimerkki .		
Hankkeen nimi	Neuropatia- ja opioidilääkityksen uudet tehostamismahdollisuudet	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	morfiinianalgesia, neuropatia, glia	
Hankkeen tarkoitus	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
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Tutkimussarjassa selvitetään uusia mahdollisuuksia hoitaa her- movaurion aiheuttamaa kipua sekä estää morfiinin kaltaisille ki- puläkkeille kehittyvää kipuherkkyyden lisääntymistä ja tole- ranssia eli vaikutuksen vähenemistä pitkään jatkuvan annoste- lun yhteydessä.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Hankkeen tavoitteena on ymmärtää keskushermoston tasolla tapahtuvaa varo- ja suojajärjestelmissä tapahtuvaa herkisty- mistä sekä arvioida tämän tiedon pohjalta kehitettävien uusien hoitomuotojen toimivuutta.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Rotta 1600 ja hiiri 350 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu haittaa kipumalleihin liittyvästä kirurgiasta, itse hermovauriosta, käyttäytymiskokeista sekä annosteluista. Eläimet lopetetaan kokeen lopussa. Vakavuusluokat: kohtalainen ja vakava	
3R-menettelmien soveltaminen	Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	1. Replacement Nosiseptio ja kipu ovat hermoverkoston kokonaisvaltaisia vas- teita, joita pystyy tutkimaan vain elävällä organismilla, jonka käyttäytymistä pystytään seuraamaan.	
2. Vähentäminen Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?	2. Reduction Eläinten määrän vähentämiseen on pyritty kokeiden huolelli- sella suunnittelulla ja tehokkaiden koejärjestelyjen käytöllä. Sa- moja eläimiä käytetään toistuvasti (maksimissaan kolmesti) sil- loin kun kokeesta aiheutuu hyvin vähäistä haittaa eläimelle	
3. Parantaminen a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on pa- ras tieteellisten tavoitteiden kan- nalta?	3. Refinement a) Rotta ja hiiri soveltuvat hyvin käyttäytymiskoetutkimuksiin. b) Hiirellä ja rotalla on myös yhtenevyyttä ihmisen kanssa ja ne ovat käytännöllisiä suhteessa tutkimusasetelmiin. c) Kokeissa käytetään ensisijaisesti malleja, joissa tutkitaan spontaania väistöheijastetta nosiseptiiviselle ärsykkeelle.	

c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	-
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 22.2.2018

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Tutkimussarjan 1. osahankkeessa selvitettiin uusia mahdollisuuksia hoitaa hermovaurion aiheuttama kipua. Hankkeen tavoitteena oli ymmärtää keskushermoston tasolla tapahtuvaa varo- ja suo-
jajärjestelmissä tapahtuvaa herkimistymistä sekä arvioida tämän tiedon pohjalta kehitettävien uusien hoitomuotojen toimivuutta. Erityisesti SNI-malli osoittautui hyväksi mekaanista hermovauriota tutkittaessa.

Osahankkeessa 2 tutkittiin aineiden vaikutuksia akuuteissa käyttäytymismalleissa väistämishetjais-
teisiin. Mallit soveltuvat hyvin kipulääkkeiden tutkimiseen koe-eläimillä.

Osahankkeessa 3 tutkittiin aineiden vaikutuksia opioiditoleranssin syntyyn ja ilmenemiseen. Mallit soveltuvat hyvin tähän tutkimukseen.

2. Millaista haittaa?

Eläimille aiheutui haittaa kipumalleihin liittyvästä kirurgiasta, itse hermovauriosta, käyttäytymisko-
keista sekä annosteluista. Eläimet lopetettiin kokeen lopussa.

SNI-mallin onnistumisprosentti on parempi kuin SNL-mallin. Lisäksi SNI-mallissa operaatiosta ai-
heutuva kudosaivurio on pienempi kuin SNL-mallissa ja siten SNI-malli soveltuu paremmin poik-
keustapauksia lukuun ottamatta mekaanisen hermovaurion tutkimiseen.

Streptozotosin- ja oxaliplatiinimalleissa eläimet eivät voineet hyvin mikä näkyi mm. vähäisenä pai-
non nousuna.

3. 3R-mahdollisuudet

Korvaaminen

Nosiseptio ja kipu ovat hermoverkoston kokonaisvaltaisia vasteita, joita pystyy tutkimaan vain elä-
vällä organismilla, jonka käyttäytymistä pystytään seuraamaan.

Vähentäminen

Eläinten määrän vähentämiseen on pyritty kokeiden huolellisella suunnittelulla ja tehokkaiden
koejärjestelyjen käytöllä. Samoja eläimiä käytettiin toistetusti (maksimissaan kolmesti) silloin kun
kokeesta aiheutui hyvin vähäistä haittaa eläimelle (osahanke 2).

Parantaminen

- a) Rotta ja hiiri soveltuvat hyvin käyttäytymiskoetutkimuksiin.
- b) Hiirellä ja rotalla on myös yhtenevyyttä ihmisen kanssa ja ne ovat käytännöllisiä suhteessa tutkimusasetelmiin.
- c) Kokeissa käytetään ensisijaisesti malleja, joissa tutkitaan spontaania väistöheijastetta nosiseptiiviselle ärsykkeelle.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
1/neuropatiamallit	rotta	Tavoitteet saavutettiin. SNI-mallissa onnistumisprosentti parempi kuin SNL-mallissa	500/426	Vakava/ Vakava: SNL-, oxaliplatiini- ja streptozotosin-malleissa 246 eläintä Kohtalainen: ed. kontrollieläimet 82 eläintä Kohtalainen: SNI-malli 98 eläintä	SNL-mallin operaatioon liittyy suurempi haittariski (suurempi kudusvaurio) kuin SNI-malliin. SNL-mallien jälkeen osa eläimistä voi huonosti ja sen vuoksi lopetettiin. Hyvin harvoin motorinen heikkous taksuissa. Oxaliplatin- ja streptozotosin-malleissa vähäinen painon nousu	Korvataan SNL-malli SNI-mallilla. Olemme luopuneet oxaliplatin- ja streptozotosin malleista
2/akuutit kokeet	rotta	Tavoitteet saavutettiin hyvin	500/300	Kohtalainen/ Kohtalainen tai lievä	-	-
3/opioidi -toleranssi	rotta ja hiiri	Tavoitteet saavutettiin hyvin	600/385 150/33	Kohtalainen/Kohtalainen tai lievä	-	-

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

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

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, ks. EU-komission ohje ja esimerkki.		
Hankkeen nimi	Lääkeaineiden tehon testaaminen psykiatristen sairauksien prekliinisissä tautimalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Skitsofrenia, autismi, psykiatriset sairaudet, prekliininen lääke-tutkimus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope-tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie-teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Psykiatristen tautien kuten esim. skitsofrenian ja autismin hoi-toon ei ole aina olemassa tehokkaita lääkkeitä. Psykiatrista taudeista aiheuttaa potilaille ja heidän omaisilleen kärsimystä ja taudeista koituu yhteiskunnalle huomattavia kustannuksia. Yritys tarjoaa lääkekehitysteollisuudelle in vivo -eläinmalleja lu-paavien lääkeaineiden prekliiniseen testaukseen. Tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä kliini-siin kokeisiin.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi-vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja eri psy-kiatrisiin tauteihin. Tutkimusmallien käyttö edistää myös psyki-atristen tautien mekanismien tutkimista, mikä edesauttaa uu-sien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin-määrät	Hiiri, 2 400; rotta, 2 400 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi-oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu haittaa tautitilan indusoinnista, tutkittavien aineiden annosteluista, verinäytteiden otosta, kuvantamisista sekä käyttäytymistesteistä. Eläimet lopetetaan kokeen päätyt-tyä. Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava	
3R-menetelmien soveltaminen	Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	1. Replacement In vitro -mallit psykiatristen tautien tutkimiseksi ovat hyvin ra-jalliset johtuen tautien moniulotteisuudesta. Uusien lääkkei-den todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tut-kia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä kokeita. Myöskään tietokonepohjaiset simulaatiot psykiatristen tautien tutkimuksessa eivät ole mahdollisia johtuen taudin mekanis-mien monimutkaisuudesta.	

2. Vähentäminen Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	2. Reduction Koeasetelmat on standardoituja ja niiden käytön pohjana on perusteellinen mallien validointityö. Validointityöllä varmistetaan että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ja antaa oikeanlaisen tautivasteen. Tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot määritetään voima-analyysillä.
3. Parantaminen a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	3. Refinement Suuri osa psykiatrinen tautien eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille lääkkeille ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Alemmilla selkärangkaisilla tai in vitro -menetelmin ei voida saada samanlaista tietoa uusien lääkeaineiden tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole standardoituja eivätkä yleisesti hyväksyttyjä ja käytettyjä. Tämän lisäksi näistä menetelmistä ei ole saatavissa tietoa tällä hetkellä käytettyjen lääkeaineiden vasteista, joita voitaisiin käyttää verrattaessa uusista lääkeaineista saatavia tuloksia.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 24.11.2017, täydennys 8.12.2017 ja 29.5.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja eri psykiatriin tauteihin eli edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä kliinisiin kokeisiin. Toisena tavoitteena oli kehittää itse tutkimusmallien käyttöä, mikä edesauttaa uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä. Tutkimusmallit toimivat odotetusti ja niiden avulla voitiin arvioida luotettavasti testattujen lääkeainekandidaattien tehoa.

Oman validaatiotyön osalta saavutettiin myös tavoitteet: kehitettyjä menetelmiä ja tutkimusmalleja voidaan käyttää varsinaisessa lääkekehitystyössä yhdessä asiakkaiden kanssa. Käytettävät eläin- ja tutkimusmallit soveltuvat tähän tutkimukseen.

2. Millaista haittaa?

Hanke oli jaettu neljään osahankkeeseen, joiden vakavuusluokat oli arvioitu joko kohtalaiseksi (osahankkeet 1 ja 4) tai vakavaksi (osahankkeet 2 ja 3). Kokonaisuudessa hankkeessa käytettiin suunniteltuun nähden vähän eläimiä (588/2400 hiirtä; 0/2400 rottaa). Esim. osahankkeessa 1 ei käytetty eläimiä lainkaan. Myös hankkeessa kuvattuja vakavuusluokkaan vakava kuuluvia tutkimuksia oli kulu-neella lupakaudella vähän. Esim. sähköiskujen käyttöä opitun avuttomuuden testissä sekä LPS-annosteluja ei lupakauden aikana tehty yhdessäkään tutkimuksessa.

Eläimille suoritettiin seuraavia toimenpiteitä: osahanke 1: ei kokeita; osahanke 2: tehotutkimus - eläinten lääkintä ja testaus pakotetussa uintitestissä (FST); osahanke 3: validaatiotutkimus - eläinten testaus sosiaalisen kanssakäymisen testissä (ei lääkintää) ja tehotutkimus - eläinten lääkintä, testaus

toistetun alistamisen aiheuttaman stressin testissä sekä käyttäytymistestien suorittaminen; osahanke 4: tehotutkimus - lääkeaineen annostelu, stimulantin annostelu aktiivisuusmittaus, ja lopetus. Osahankkeiden 2 ja 3 osalta vakavuusluokkaa on tiputettu osassa tutkimuksia luokkaan kohtalainen (Osahanke 2) tai lievä (Osahanke 3).

Osahankkeen 3 osiossa Social defeat –testi arvioitu ja tosiasiallinen vakavuusluokka olivat molemmat vakavia. Toimenpiteistä aiheutuva haitta oli odotusten mukainen. Haittaa aiheutui erityisesti testihiirten altistusjaksoista aggressorihirille (osahanke 3). Kuolleisuus tappeluvammojen takia oli n. 9% testihiirissä. Eläimet jouduttiin lopettamaan tappeluvammojen takia. Vammautumisen mahdollisuus tappeluvammojen takia oli tiedossa kokeen suunnitteluvaiheessa. Muissa osahankkeissa ei havaittu kuolleisuutta tai mitään muita yllätyksiä.

3. 3R-mahdollisuudet

Hankkeiden suunnittelussa on otettu huomioon tutkimusmalleihin liittyvä aikaisempi tuotekehitystyö. Tuotekehitystyön pohjalta testiryhmien koko on pyritty minimoimaan samalla kuitenkin turvaten riittävä ryhmäkoko tilastollisen merkitsevyyden saamiseksi.

Osassa validaatiotutkimuksissa keskityttiin vakavuusluokaltaan lievien tutkimusmallien kuten sosiaalisen kanssakäymiseen liittyvien testien kehittämiseen. Tämä osaltaan vähensi myös eläimille aiheutuvaa haittaa.

Social defeat –testissä (Osahanke 3) tappeluvammoja pyrittiin ehkäisemään lyhentämällä aggressorihirten hampaat säännöllisesti vammojen vakavuuden ehkäisemiseksi. Tarvittaessa tappelualtistusta pahtumaa lyhennettiin tai jopa keskeytettiin vammojen vakavuuden ehkäisemiseksi. Syntyneitä tappeluvammoja hoidettiin olemassa olevan ohjeistuksen mukaisesti kärsimysten vähentämiseksi ja tarvittaessa tappeluvammojen ollessa vakavia, eläin lopetettiin.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kri-terit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pysyttäisiin jatkossa vähentämään?
Osahanke 1	-	-	Arvio: 600 hiirtä / 600 rottaa	Arvio: kohtalainen	-	Osahankkeen 1 tutkimuksia ei ollut.
Osahanke 2	hiiri	+ (mallit toimivat odotetusti).	Arvio: 600 hiirtä / 600 rottaa Tosiasiallinen: 77 hiirtä / 0 rottaa	Arvio: vakava / tosiasiallinen: kohtalainen	Haitta odotetun mukainen: Eläinten lääkintä tutkittavilla aineilla ja testaus pakotetussa uittotestissä (FST)	Osahankkeen 2 tutkimuksia suoritettu lupakaudella vähän. Testiryhmien koko pyritty minimoimaan aikaisempien tutkimustulosten pohjalta.
Osahanke 3	hiiri	Validaatiotutkimus suoritettu protokollan mukaisesti (+). Tuloksia on käytetty menetelmien kehitystyössä (+). Menetelmää voidaan käyttää asiakastutkimuksissa (+).	Arvio: 600 hiirtä / 600 rottaa Tosiasiallinen: 85 hiirtä / 0 rottaa	Arvio: vakava / tosiasiallinen: lievä – 85 hiirtä	Haitta odotetun mukainen (osahankkeessa kuvatut menetelmät vakavuustasoltaan eri tasoisia): Eläinten testaus sosiaalisen kanssakäymisen testissä vakavuudeltaan vähäinen, ei lääkintää. Lopetus. Sosiaalisen kanssakäymisen testissä kaksi toisilleen vierasta hiirtä on laitettu samaan tilaan siten, että niillä on mahdollista lähestyä ja haistella toista hiirtä, mutta mahdollisuutta fyysiseen tappeluun ei ole. Hiirten sosiaaliseen kanssakäymiseen kulunutta aikaa tutkitaan.	Osahankkeen 3 tutkimuksia suoritettu lupakaudella vähän. Validaatiotutkimuksessa keskitetty sosiaalisen kanssakäymisen testin kehittämiseen

Osahanke 3	hiiri	+ (mallit toimivat odotetusti).	Arvio: 600 hiirtä / 600 rottaa Tosiasiallinen: 451 hiirtä / 0 rottaa	Arvio: vakava / tosiasiallinen: vakava – 451 hiirtä Vakavuusluokka on määritetty vakavaksi kaikille tässä osahankkeessa käytetyille eläimille. Vakavuusarvio perustuu toistetun alistamisen aiheuttamaan stressiin eläimille (alustusjakson kokonaiskesto 2 viikkoa). N. 9% eläimistä jouduttiin lopettamaan tappeluvammojen takia ja osalle eläimistä aiheutui vähäisempiä vaurioita. Tämän lisäksi eläimiä lääkittiin ja niille suoritettiin käyttäytymistestejä.	Haitta odotetun mukainen: Eläinten testaus toistetun alistamisen aiheuttaman stressin testissä, lääkeaineen annostelu, käyttäytymistestit, lopetus. Lopetus tappeluvammojen takia oli n. 9% testihiiressä (tutkimus 1: 0/36; tutkimus 2: 11/86 kpl). Eläimet jouduttu lopettamaan tappeluvammojen takia. Vammautumisen mahdollisuus tappeluvammojen takia oli tiedossa. Toistetussa alistamisessa tutkimus-hiiri joutuu noin kahden viikon ajan 10 min ajaksi suoraan fyysiseen kanssa-käymiseen vanhemman ja suuremman hiiren kanssa. Session aikana hiirten tappeluun kulunutta aikaa seurataan. Muun ajan tutkimushiiri on samassa häkissä vahvemman hiiren kotihäkissä läpinäkyvän ja rei'itetyn väliseinän takana. Kahden viikon altistusjakson jälkeen stressaantuneen hiiren suoriutumista käyttäytymistesteissä tutkittiin lääkehoidon ollessa päällä.	Tappeluvammoja on pyritty ehkäisemään seuraavasti: - aggressorihierren hampaat lyhennetty säännöllisesti vammojen vakavuuden ehkäisemiseksi - tappelu-altistustapahtumaa tarvittaessa lyhennetty tai tapahtuma keskeytetty vammojen vakavuuden ehkäisemiseksi - tappeluvammoja hoidettu ohjeistuksen mukaisesti - tappeluvammojen ollessa vakavia, eläin lopetettu
------------	-------	---------------------------------	---	--	--	---

Osahanke 4	hiiri	+ (mallit toimivat odotetusti).	Arvio: 600 hiirtä/600 rottaa Tosiasiallinen: 137 hiirtä / 0 rottaa	Arvio: kohtalainen / tosiasiallinen: kohtalainen – 137 hiirtä	Haitta odotetun mukainen: Lääkeaineen annostelu, stimulantin annostelu aktiivisuusmittaus, ja lopetus. Eläimille annosteltiin psykostimulanttia ja stimulantin aiheuttamaan aktiivisuuden muutosta tutkittiin aktiivisuusmittauksella lääkehoidon ollessa päällä.	Osahankkeen 4 tutkimuksia suoritettu lupakaudella vähän. Testiryhmien koko pyritty minimoimaan aikaisempien tutkimustulosten pohjalta
Lautakunta pyysi erityisesti kertomaan kokemuksista sähköiskujen käytöstä opitun avuttomuuden testissä, social defeat testistä sekä LPS-annostelujen vaikutuksesta. Sähköiskujen käytöstä opitun avuttomuuden testissä sekä LPS-annostelujen vaikutuksesta voidaan todeta, että kyseisiä testejä ei ole lupakauden aikana tehty yhdessäkään tutkimuksessa. Social defeat –testin osalta kokemukset on kuvattu Osahankkeen 3 kohdassa.						

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Mallivalidaatio ryhmäkokoanalyysiä varten	x	x	x	-
Social defeat –testi: tappeluvammojen ehkäisy ja minimointi: hampaiden lyhentäminen säännöllisesti, tapahtuman lyhentäminen tai keskeyttäminen tarvittaessa, haavojen hoito, eläinten lopetus tarvittaessa	x	x	x	x

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, ks. EU-komission ohje ja esimerkki.		
Hankkeen nimi	Silmäsairaus- ja silmälääkitystutkimus	
Hankeluvan kesto	kolme vuotta	
Avainsanat	silmälääke, imeytyminen, näkövamma, sokeus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Useat silmäsairaudet tuhoavat hitaasti ja lähes oireettomasti näkökykyyn tarvittavia silmän rakenteita aiheuttaen näön heikkenemistä ja sokeutta. Monien silmäsairauksien etenemistä voidaan hidastaa, mutta usein näkökyky on jo vaurioitunut ennen potilaan hakeutumista hoitoon. Valitettavasti myöhäisessä sairauden toteamisvaiheessa parantavaa hoitoa on erittäin harvoin tarjolla. Suomessa n. 80 000 ja maailmanlaajuisesti 180 miljoonaa ihmistä on näkövammaisia. Tutkimuksessa selvitetään sekä uusien lääkevalmisteiden että jo olemassa olevien silmälääkkeiden ja muiden hoitomenetelmien tehoa. Lisäksi selvitetään silmäsairauksien synty- ja etenismekanismeja.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Uudet silmälääkkeet sekä hoito- ja tutkimusmenetelmät auttavat säilyttämään ihmisten jokapäiväisessä arjessa tarvittavaa näkökykyä ja estää sokeutumista. Tutkimuksista on hyötyä myös vastaavia silmäsairauksia sairastaville eläimille. Hankkeen tutkimukset auttavat myös vähentämään eläinkokeita.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri, 4310; rotta, 2930; kaniini, 930 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Suurin osa tutkimuksista on lääkeainetutkimuksia, joissa eläimille annostellaan erilaisia uusia tai jo käytössä olevia lääkeaineita silmään tai verenkiertoon. Muutamassa toimenpiteessä eläimille aiheutetaan näkövamma, johon pyritään löytämään sairautteen tehoavia lääkeaineita ja/tai uusi hoitomenetelmä. Näön heikentyminen tai sokeutuminen ei yleensä aiheuta eläimelle kipua. Lääkitys ja hoitotoimenpiteet eivät aiheuta kipua. Kipua aiheuttavat toimenpiteet tehdään nukutuksessa. Jotkin lääkeaineet saattavat aiheuttaa silmän punoitusta ja hiekan tunnetta silmässä. Eläimet lopetetaan tutkimuksen päätyttyä. Vakavuusluokat: lievä, kohtalainen, vakava	

3R-menetelmien soveltaminen	Application of the 3Rs
1. Korvaaminen Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	1. Replacement Kaikki hankkeessa testattavat lääkkeet ja lääkeaineet on ensin testattu laboratorioissa soluviljelykokeilla. Lääkkeiden farmakokinetiikka silmässä simuloidaan tietokoneen avulla, mikä auttaa vähentämään ja suuntaamaan eläinkokeita. Jotta uudet lääkkeet sekä tutkimus- ja hoitomenetelmät voidaan hyväksyä kliiniseen käyttöön, tarvitaan eläinkokeita. Silmässä on sellaisia fysiologisia prosesseja, joita ei voi soluviljelyllä tutkia. Osa hankkeen tutkimuksista tähtää sellaisten uusien silmälääkkeiden tutkimusmenetelmiin, mitkä vähentäisivät eläinten käyttöä hankkeissa.
2. Vähentäminen Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	2. Reduction Koe-eläintyöt suunnitellaan siten, että tarvetta koesarjojen toistamiselle ei olisi. Lisäksi tutkimuksissa käytetään lähes aina koe-eläimen toista silmää kontrollina, joka vähentää tilastollisesti analysoitaessa käytettävien koe-eläinten määrää. Jos toista silmää ei voida pitää kontrollina, pyritään kokeet suunnittelemaan siten, että kontrollieläimistä saatuja tuloksia voidaan käyttää hyväksi useissa hankkeen osakokeissa. Vankan farmakokineettisen tutkimuskokemuksen vuoksi, käytettävät eläinmäärät pystytään arvioimaan tarkkaan.
3. Parantaminen a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	3. Refinement a) Kokeissa käytetään eläimiä, joiden silmän rakenne ja toiminta vastaavat mahdollisimman hyvin ihmisen silmää. Pienistä nisäkkäistä hiiren, rotan ja kanin silmät soveltuvat parhaiten silmätutkimukseen. b) Kyseiset kokeelliset mallit tutkitusti mallittavat hyvin ihmisessä esiintyviä vakavia silmäsairauksia. c) Kipua aiheuttavat toimenpiteet tehdään eläimen ollessa nukutuksessa. Kivunlievityksestä huolehditaan sekä toimenpiteen aikana että sen jälkeen. Eläinten vointia kontrolloidaan säännöllisesti. Noninvasiivisia menetelmiä esim. kuvantaminen käytetään mahdollisimman paljon.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 23.5.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteina oli selvittää sekä uusien lääkevalmisteiden että jo olemassa olevien silmälääkkeiden ja muiden hoitomenetelmien tehoa. Lisäksi tutkittiin silmäsairauksien synty- ja etenemismekanismeja.

Hanke koostui kahdeksasta eri osahankkeesta, joista eläintöitä tehtiin neljässä osahankkeessa.

OSAHANKE 1. Glaukoomatutkimus

Eläinmalli, jossa glaukooma indusoidaan eläimelle, oli jo aikaisemmin kehitetty. Kuitenkin sairauden monimuotoisuuden vuoksi (glaukoomaa useita erilaisia) mallin tutkimusta jatkettiin, jotta pystyttiin osoittamaan varmuudella indusoidun sairauden vaikutukset silmässä. Tutkimustemme mukaan kyseinen malli soveltuu erittäin hyvin mallittamaan glaukoomaa, jonka aiheuttaa silmän etukammionesteen vaihtumisen ongelmat (etukammioneste ei pääse pois etukammioista).

OSAHANKE 4. Verkkokalvon ikärappeuman kuivan muodon tutkimus

Hankkeessa ei indusoitu eläimille sairautta. Muutamassa hoitotoimenpiteessä käytettiin laseria. Osahanke sisälsi mm. yhden hiirikannan tuotannon sekä ylläpidon. Tutkittiin tämän hiirikannan soveltuvuutta ja käyttöä sairauden mallittamisessa. Koska kyseessä oli sairauden tutkiminen, eläimiä pääasiassa lopetettiin eri ikäisinä morfologisiin ja immunologisiin tutkimuksiin. Eläimille ei siis tehty juuri mitään toimenpiteitä, ainoastaan muutamasta eläimestä otettiin kuvantamistutkimuksia. Tutkimuksissa on käynyt ilmi, että kyseinen hiirikanta mallittaa hyvin sairauden verkkokalvolle aiheuttamaa kroonista tulehdusta ja morfologisia muutoksia.

OSAHANKE 7. Lääkeaineiden imeytyminen ja kuljetus: farmakokineettiset, silmä-ärsytys ja lääketutkimukset

Osahankkeessa käytettiin terveitä eläimiä lääketutkimuksissa. Tutkittavat lääkkeet/lääkevalmisteet annosteltiin silmätippoina tai injektioina (lasiaiseen tai verkkokalvon alle). Seuranta-ajat olivat muutamasta minuutista useisiin kuukausiin. Koko tutkimusaikana ei tutkimuksissa tullut esille sellaista valmistetta, joka olisi aiheuttanut eläimelle akuutin tai kroonisen tulehdusreaktion silmään tai osoittautunut toksiseksi. Täten ryhmämme in vitro- ja in silico –tutkimukset ennen in vivo –tutkimuksia osoittautuivat onnistuneiksi.

OSAHANKE 8. Sarveiskalvon uudissuonittuminen

Mallin pystyttäminen ja optimointi. Eläinmalli mallittaa hyvin sarveiskalvon uudissuonittumista, joka aiheutuu esim. jonkun emäksisen aineen räiskähtämisestä silmään.

2. Millaista haittaa?

Takautuvan arvioinnin peruste oli Osahanke 2 ”Sokeritaudin aiheuttaman verkkokalvosairauden tutkiminen (diabeettinen retinopatia)”. Kyseistä osahanketta ei aktivoitu hankkeen voimassaoloaikana.

Aktiivisissa osahankkeissa (1, 4, 7 ja 8) toimenpiteet onnistuivat hyvin. Silmäinjektioista johtuvia infektoita ei esiintynyt. Eläimille ei aiheutunut sairauden indusoinnista tai toimenpiteistä sellaisia reaktioita, joihin emme etukäteen olisi osanneet varautua. Siten etukäteen arvioimamme haitat ja mahdolliset ongelmat oli kuvattu kattavasti hankehakemuksessa.

Osahankkeessa 1 lopetettiin sairaana neljä rottaa. Sairauksille ei löydetty selitystä. Yksi tapaus luokiteltiin luokkaan SV4 (vakava). Lopetuksessa tapahtui inhimillinen virhe ja on mahdollista, että eläin hetkellisesti (muutamia sekunteja) koki vakavaa kipua.

Osahankkeessa 8 lopetettiin yksi rotta hengitysvaikeuksien vuoksi. Syy hengitysvaikeuksiin tuntematon.

Osahankkeessa 7 jouduttiin lopettamaan kaksi kania ja kolme rottaa lopetuskriteereiden perusteella. Kaneilla oli silmävauriot, jotka eivät olleet aiheutuneet toimenpiteistä tai tehtävistä tutkimuksista. Yhdeltä rotalta löytyi verkkokalvokasvain, joka oli satunnaislöydös. Kaksi muuta lopetusta liittyivät myös satunnaisiin silmävaurioihin, jotka saattoivat liittyä tutkimuksiin.

3. 3R-mahdollisuudet

Käyttämämme lääkeaineet on ennen eläinkokeita testattu solu- ja kuduskokeilla (in vitro ja ex vivo) tai kirjallisuudesta on saatu riittävä tieto mm. toksisuudesta, lääkkeen/yhdisteen soluunottosta ja läpäisevyyssominaisuuksista solukalvon ja/tai irrotetun kudoksen läpi. Selkeästi toksiset ja tehottomat aineet karsiutuvat pois jo tässä vaiheessa. Lisäksi joukosta karsiutuvat myös ne lääkeaineet, jotka sinällään on voitu todistaa tehokkaiksi in vitro- ja ex vivo -kokeissa, mutta tämänhetkisen tiedon mukaan lääkeainetta ei pystyittäisi saamaan silmään terapeuttisissa pitoisuuksissa.

Jo olemassa olevien tietokonemallien avulla simuloitiin lääkkeiden kulkeutumista ja vaikutuksia silmässä. Mallit ottavat huomioon kokonaisia kudoksia ja silmän fysiologiaa (mm. nestevirtaukset) ja näin ollen ennustavat tilannetta elintasolla toisin kuin soluviljely.

Oletuksemme oli, että in vitro -kokeiden ja tietokonepohjaisten mallinnusten perusteella, todennäköisyys silmää ärsyttävien lääkkeiden in vivo- vaiheeseen pääsystä on vähäinen. Oletuksemme osoittautui oikeaksi. Yksikään tutkimamme lääkeaine tai lääkeformulaatio ei aiheuttanut eläimille sellaista ärsytystä, mikä olisi ollut normaali tutkimusmenetelmillä havaittavissa ja näin ollen mahdollisesti kliinisesti relevantti.

Farmakokineettisissä tutkimuksissa pyrimme käyttämään mahdollisimman paljon lääkeseoksia, jolloin käytettävien eläinten määrä väheni, kun jokaiselle yksittäiselle lääkkeelle ei tarvinnut omaa eläinryhmää. Koesarjoissa käytettiin tarvittaessa koe-eläimen toista silmää kontrollina, joka vähensi tilastollisesti analysoitaessa käytettävien koe-eläinten määrä. Terveillä eläimillä tehdyissä farmakokineettisissä tutkimuksissa ei usein ollut tarvetta kontrollisilmille, jolloin eläimen molempiin silmiin voitiin annostella tutkittava aine ja täten käytetty eläinmäärä kyseisessä kokeessa puolittui.

Sairauden etenemis- ja mekanismitutkimukset tehtiin lähes yksinomaan eläinmallilla, jolle kehittyi tutkittava sairaus ilman erillistä sairauden indusointia. Eläimille tehtiin hyvin vähän luvanvaraisia toimenpiteitä ja nekin olivat vakavuudeltaan lieviä. Hankkeessa tutkimme silmänsairauksiin ei ole käytettävissä eläinkokeita korvaavia solu- tai kudosisviljelymenetelmiä, vaikka niiden avulla voidaan eläinkokeita suunnata.

Hankkeen voimassaoloaikana muutimme käytäntöjä liittyen koe-eläintyöskentelyyn. Nykyään suunnitella olevat eläinkokeet, käydään läpi tiimissä, johon kuuluu useita henkilöitä. Suunnitelmista kysytään tarvittaessa lisätietoa väitöskirjaohjaajilta (jos eläinkoe liittyy väitöskirjan tekoon) ja /tai projektin johtajilta. Hankkeen toteutuksesta vastaavat henkilöt varmistavat, että tilausta tekevä (koe-eläintutkimuksen tekevä) tutkija osaa käytännössä käsitellä eläimiä, hallitsee nukutuksen sekä kivunlievityksen ja ne toimenpiteet, jotka hänen on määrä tehdä eläimille. Lisäksi tutkijan on osoitettava hallitsevansa indusoidun sairauden oireet ja mahdollinen lääkitys oireisiin. Tarvittaessa opetetaan ja annetaan lisäopetusta. Erityisesti huomiota kiinnitetään tilattaviin eläinmääriin. Tutkijan eläintilaukset, jotka tehdään aina KEK:n kautta, lähtevät eteenpäin vasta siinä vaiheessa, kun hankkeen toteutuksesta vastaavat henkilöt (hankemuksen kohta 1.2) antavat tilaukselle luvan.

Viimeisen vuoden aikana olemme saaneet hankittua useita silmätutkimuslaitteita, jotka ovat merkittävästi vähentäneet käyttämiämme eläinmääriä. Aikapistetutkimuksissa, oli kyseessä sitten lääkeaineen kulkeutuminen/imeytyminen/poistuminen silmästä tai sairauden etenemisen tutkiminen, pystymme nykyään tutkimaan elävän eläimen silmät eri aikapisteissä. Aikaisemmin jouduimme usein lopettamaan eläimet eri aikapisteissä.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Osahanke 1	-	-	-	kohtalainen / ks. alla	-	Eläinmääriä on pystytty vähentämään laitehankinnoilla. Eli elävää eläintä voidaan tutkia monipuolisesti erilaisilla kuvantamismenetelmillä selvittäessä silmän rakennetta, toimenpiteistä/tutkitavista lääkkeistä aiheutuvia mahdollisia haittoja ja lääkeainepitoisuuksien määrittämistä silmän eri osissa. Aikaisemmin piti lopettaa useita eläimiä eri aikapisteissä vastaavan tiedon saamiseksi. Uudet laitteet ovat auttaneet merkittävästi myös eläinten hyvinvointin tarkastelussa. Tämä liittyy kaikkiin osahankkeisiin.
Osahanke 1	hiiri	+	1030/46	lievä tai kohtalainen	Nukutuksen jälkeinen olotila.	-
-	rotta	+	1440/258	lievä tai kohtalainen	Tulehdus silmän etuosassa. Mallista aiheutuva, mutta satunnainen haitta. Hoidettiin lääkityksellä.	-
Osahanke 2	-	-	1060/0	-	-	-
Osahanke 3	--	-	1520/0	-	-	-

Osahanke 4	-	-	-	kohtalainen/ ks. alla	-	-
-	hiiri	+	1800/47	lievä tai kohtalainen	Pitkästä nukutuksesta aiheutuneet ongelmat heräämisessä, koska eläimet pääasiassa vanhoja. Ongelmat satunnaisia, yksilöistä riippuvaisia.	-
-	rotta	+	720/5	kohtalainen	Nukutuksesta heräämisen jälkeen silmässä tuntuva lievä kirvely.	-
Osahanke 5	-	-	330/0	-	-	-
Osahanke 6	-	-	50/0	-	-	-
Osahanke 7	-	-		kohtalainen/ ks. alla	-	-
-	hiiri	+	500/22	lievä tai kohtalainen	Verkkokalvon alainen injektio ja siitä johtuva epämiellyttävä tunne silmässä n. vuorokauden ajan injektion jälkeen. Toimenpide tehtiin yhdesti/eläin. Tuntemusreaktiot yksilöllisiä.	-
-	rotta	+	500/313	lievä tai kohtalainen	Silmätippa-annostelu lievä. Silmäinjektiot kohtalainen. Silmän sisäinen injektio ja/tai laserointi ja niistä johtuva epämiellyttävä tunne silmässä n. vuorokauden ajan toimenpiteiden jälkeen. Lääkkeen annostelusta riippuva. Silmäinjektioita tehtiin vain yhdesti/eläin.	-
-	kani	+	720/208	lievä tai kohtalainen	Silmätippa-annostelu lievä. Silmäinjektiot kohtalainen. Silmän sisäinen injektio ja niistä johtuva epämiellyttävä tunne silmässä n. vuorokauden ajan toimenpiteiden jälkeen. Lääkkeen annostelusta riippuva. Silmäinjektiot tehtiin vain yhdesti/eläin.	-

Osahanke 8	-	-	--	kohtalainen/ks. alla	-	-
-	hiiri	-	30/0	-	-	-
-	rotta	+	130/58	kohtalainen	Sairauden indusoinnista aiheutuva akuutti silmätulehdus. Tätä oli vain alussa muutama tapaus, kun mallia kehitettiin.	-

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportointaessa
in vitro	x	x	x	x
ex vivo	x	x	x	x
in silico	x	x	x	x
sopivan eläinlajin valinta	x	x	x	x
hyvät kuvantamisvälineet	x	x	x	x

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, ks. EU-komission ohje ja esimerkki.		
Hankkeen nimi	Riittävä lihasmassa ja aerobinen kunto eliniän pidentäjänä lihas-kadossa (MassA)	
Hankeluvan kesto	Kolme vuotta	
Avainsanat	Lihasmassa, aerobinen kunto, syöpä, lihakset, liikunta, lääke-hoito	
Hankkeen tarkoitus	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
Hankkeen tavoitteet (esim. tie-teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Useat sairaudet, vammat ja ikääntyminen johtavat lihaskatoon ja heikentyneeseen aerobiseen kuntoon. Lihaskato ja huono aerobinen kunto heikentävät elämänlaatua ja ovat myös mer-kittäviä ennenaikaisen kuoleman riskejä ja. Tässä tutkimuksessa selvitetään niitä mekanismeja, joilla riittävä lihasmassa ja hyvä aerobinen kunto suojelevat lihaskadon sattuessa. Tutkimuk-sessa etsitään syy-seuraussuhteita käyttäen apuna erilaisia hii-ri-malleja. Lihaskokoa ja aerobista kuntoa manipuloidaan farma-kologisten ja geneettisten tekniikoiden sekä liikunnan avulla. Tutkimuksessa yritetään löytää uusia sairauteen ja hoitoon liit-tyviä tekijöitä, joita etsitään myöhemmin lihaskatoa sairasta-vilta ihmisiltä.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi-vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tutkimus tuottaa suuren määrän perustietoa, jonka avulla ym-märrämme laaja-alaisesti lihaskoon ja -kunnan merkitystä ja mekanismeja vakavissa lihaskatoon johtavissa sairauksissa. Löy-döksien toivotaan johtavan uusiin hoito- ja ehkäisymuotoihin ja suosituksiin sekä mahdollisiin sairauksien biomarkkereihin.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin-määrät	Hiiri, 900 kpl	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi-oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Kokeen aikana hiiriltä kerätään verinäytteitä, sekä mitataan voimaa ja toimintakykyä mm. otevoima- ja juoksutesteillä. Syö-pämallin yhteydessä hiirille injektoidaan hoitoaineita, kuten re-kombinanttiproteiineja ja mahdollisesti asennetaan tutkittavia aineita vapauttavia implantteja. Osa liikuntainterventiosta toteutetaan antamalla hiirille mah-dollisuus juosta juoksupyörässä yksittäishäkeissä. Myös pe-rusaktiivisuus- ja -aineenvaihduntamittaukset tehdään yksit-täishäkeissä. Liikuntainterventioiden jälkeen eläinten maksi-maalinen aerobinen kapasiteetti mitataan juoksutestillä, jossa eläin juoksee väsymykseen saakka. Kemoterapiaa tehdään osassa kokeista injektioina doksorubisiinilla. Syöpäsolujen	

	transplantaatioihin sisältyy metastaasin riski ja eläin voi sairastua. Kokeiden jälkeen eläimet lopetetaan ja kudokset preparoidaan. Vakavuusluokka: vakava
3R-menetelmien soveltaminen	Application of the 3Rs
1. Korvaaminen Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	1. Replacement Lihaskoon ja aerobisen kunnon mekanistista kausaalista tutkimusta solutasolla ei ole mahdollista tehdä ihmisillä. Lihasten kuormittaminen in vitro tai jopa käyttäen selkärangattomia organismeja on jossain määrin mahdollista, mutta hankalaa ja niiden sovellettavuus ihmisen lihaksistoon on hyvin vähäistä. Hiiri on nisäkäs, ja siksi tutkimuksessa päästään huomattavasti lähemmäs ihmisen biologiaa, mikä todennäköisimmin johtaa ihmistä hyödyttävien hoidollisten sovellusten kehittämiseen. Koe-eläinmallina hiiri on hyvä, muun muassa koska niille on olemassa erityisen hyvin ihmisen lihaskatoa aiheuttavia lyhytkestoisia ja hyvin standardeja syöpiä. Lisäksi lihaksen toimintaan vaikuttavien erittäin kalliiden rekombinanttiproteiinien vaikutusta ei ole mielekäästä tutkia in vitro tai tässä vaiheessa ihmisellä. Lisäksi geeniterapiamenetelmät pitää tutkia ensin jyrsijöillä ennen kuin niitä voidaan ottaa ensimmäisiin testeihin ihmisille.
2. Vähentäminen Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	2. Reduction Aikaisempiin omiin ja kirjallisuudessa kuvattuihin tutkimuksiin perustuen tutkijoilla on hyvä tieto luotettavan tutkimustuloksen saamiseksi tarvittavista eläinmääristä. Tutkimukset toteutetaan huolellisesti ja pilottikokeita tehdään tarvittaessa aina ennen kuin aloitetaan varsinaiset kokeet. Käytetyt hiiret ovat pääosin sisäsiittoisia, ja sitä kautta vasteiltaan ja perusfenotyy-piltään hyvin samanlaisia, mikä vähentää tarvittavien hiirien määrää. Esittämämme hiirimallit soveltuvat parhaimmin näihin in vivo -kokeisiin. Tutkimuksessa mitataan joitain muuttujia myös tutkimuksen aikana, jolloin kaikkia tuloksia ei tarvitse verrata hiirten välillä.
3. Parantaminen a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	3. Refinement a) Hiirellä on erittäin hyviä syöpämalleja, joita on validoitu ihmisen vastaaviin syöpiin. Tutkimuksen kustannukset muodostuisivat rotilla valtaisan suuriksi mm. tuotettavien hoitojen kallistumisesta johtuen. b) Tutkimusmallina käytettävät C26 ja LLC-syövät ovat hiirellä erittäin hyvin validoituja, ja niistä on kokemusta myös yhteistyölaboratoriossamme. c) Kokeiden aikana eläimiä valvotaan yksilökohtaisesti aiheutetun haitan minimoimiseksi ja mahdollisen liiallisen haitan estämiseksi. Tarvittaessa sairastuneet yksilöt lopetetaan tai koe keskeytetään. Humaanit lopetuskriteerit ovat aina käytössä. Osaa hiiriä hoidetaan molekyyileillä, joilla on tavoitteena vähentää syövän aiheuttamia terveysongelmia. Kipulääkitystä käytetään aina tilanteen niin vaatiessa.

Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ
--	-------

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN
Saapumispvm: 30.10.2018

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Tutkimuksessa selvitettiin mekanismeja, joilla riittävä lihasmassa mahdollisesti suojelee lihaskadon sattumassa. Tässä tavoitteessa onnistuttiin, tosin näyttöiden analysointi on vielä kesken. Osoitimme käyttämällä tuottamaamme rekombinanttiproteiinia, että kasvattamalla hiirten lihakset ja ylläpitämällä lihasmassaa jatkamalla hoitoa hiiret elivät transplantaatiosyöpämallissa (C26) pidempään ilman, että niille tuli merkkejä lopettamiskriteereistä. Sen sijaan ei ollenkaan auttanut, jos hiiriä hoidettiin rekombinanttiproteiinilla ainoastaan syöpäsolujen implantointiin asti. Tämä koe oli vakavuusasteeltaan hiirten osalta vakava.

Tämän jälkeen tutkimuksessa etsittiin syyseuraussuhteita tekemällä kaksi mekanistista koetta, joissa hiiret lopetettiin päivinä 11 ja 13 syöpäsolujen injektoinnin jälkeen. Lähes kaikki hiiret lopetettiin selvästi ennen kuin lopetuskriteerit olisivat täyttyneet. Näissä kokeissa löysimme uusia mahdollisia lihaskadon ja kakeksian mekanismeja. Tämä koe oli osalle hiiristä vaikutusluokaltaan vakava.

Luvassa ilmoitettuja geneettisiä kokeita ja liikuntakokeita emme tehneet ollenkaan syöpähiirillä, koska päädyimme panostamaan osahankkeeseen enemmän ja sen sijaan kollaboroimme Italiassa tehtävän tutkimuksen tutkimusryhmän kanssa hieman vastaavassa kokeessa. Lisäksi kehitimme näitä hankkeita korvaamaan hankkeen lopussa 1) solumallin (muokattu insert-malli Transwell) ja 2) ihmisillä tehtävän Mendelian Randomization –tilastollista tekniikkaa käyttävän asetelman. Näillä molemmilla malleilla pysyimme vastaamaan osaan hankkeen tutkimuskysymyksistä hiirten sijaan siis soluilla ja ihmisillä.

Käytetty eläinmalli oli sopiva tutkimukseen, mm. koska se aiheutti merkittävän lihaskadon suhteellisen pienikokoisella kasvaimella. Tulevaisuudessa voisi olla hyödyllistä tutkia/kehittää joitakin hitaammin eteneviä syöpämalleja, jotta esimerkiksi liikuntainterventioita pysyttäisiin paremmin tutkimaan.

Tämän lisäksi toteutimme kokeita tuottamallamme lihasta kasvattavalla geeniterapialla. Näiden kokeiden vakavuusluokat olivat ainoastaan lieviä tai kohtalaisia. Hiiret lopetettiinkin aina hyvissä voimissa. Tästä syystä näitä kokeita ei kuvata tässä enää tarkemmin, vaan keskitytään luvassa olleisiin vakavaksi katsottuihin syöpäkokeisiin.

2. Millaista haittaa?

Hiirillä ilmeni seuraavia, lähinnä syöpäkasvaimen aiheuttamia, (vakavia) haittoja:

Syöpäkasvaimen kasvu

Vakava ja nopea painon lasku ja lihasten surkastuminen

Kipu, josta indikaattorina käytettiin mm. kyyristynyttä asentoa ja silmien siristystä

Vähentynyt syöminen

Heikentynyt liikkumiskyky (huojuva ja vähentynyt liikkuminen)

Vähentynyt itsestä huolehtiminen (turkin likaisuus)

Kasvaimen haavautuminen

Itsensä vahingoittaminen

Kaikilla hiirillä ei ilmennyt kaikkia yllä mainittuja haittoja. Lisäksi kaikki hiiret kokivat hetkellistä lievää haittaa koe- ja kontrollihoitojen sekä nukutusaineiden intraperitoneaali-injektioista kokeen aikana.

Tosiasiallinen haitta vastasi etukäteen oletettua. Kokeissa ei tullut varsinaisesti suuria yllätyksiä, koska saimme konsultaatioapua kyseisiä syöpämalleja käyttäneiltä tutkijoilta. Muutamia yllättäviä havaintoja olivat kahden hiiren itsensä vahingoittaminen (hännän syöminen), jota emme osanneet odottaa ja jolle ei löytynyt selitystä ja se, että varsinkin viimeisessä kokeessa syöpäkasvainten kehittyminen oli melko vaihtelevaa yksilöiden välillä, mille ei myöskään löytynyt syytä tässä kyseisessä kokeessa.

Lähtökohtaisesti toimenpiteemme onnistuivat hyvin ja meillä oli lopulta tarve käyttää huomattavasti vähemmän hiiriä kuin mihin haimme luvan. Lopetuskriteerien mukaan lopetettiin yhteensä 38 eläintä neljässä eri kokeessa, joiden kokonaiseläinmäärä oli 139.

3. 3R-mahdollisuudet.

Onko käytettävänä uusia vaihtoehtoisia menetelmiä eläinten käytön tilalle?

Jossain määrin kyllä, kuten kuvattu alla, mutta ei fysiologisiin mekanistisiin kokeisiin ja selviytymiskokeeseen.

Korvaaminen: Kuten aiemmin kerroimme, olemme kehittäneet eläinkokeita korvaamaan hankkeen lopussa 1) solumallin (muokattu insert-malli Transwell) ja 2) ihmisillä tehtävän Mendelian Randomization – tilastollista tekniikkaa käyttävän asetelman. Näillä molemmilla pystymme vastaamaan osaan hankkeissa suunnitelluista kysymyksistä hiirten sijaan soluilla ja ihmisillä.

Vähentäminen: Arvioimme tarvittavien eläinten määrän pilottikokeen avulla, mikä mahdollisti mahdollisimman pienen mutta kuitenkin riittävän eläinten määrän arvioimisen seuraaviin kokeisiin luotettavien tulosten saamiseksi. Käytettyjen eläinten määrää pystyttiin vähentämään myös yhteistyöllä muiden tutkimusryhmien kanssa sekä osittain korvaavien menetelmien avulla.

Parantaminen: Eläinten vointia seurattiin päivittäin vähintään kerran ja kriteereiden täyttyessä kahdesti, jotta voitiin minimoida eläinten kokema haitta kunnon heiketessä. Hiirille annettiin ruokapellettejä häkkiin kuivikkeiden sekaan syömisen helpottamiseksi selviytymiskokeen loppuvaiheessa. Eläimet myös nukutettiin syöpäsolujen injektioon ajaksi, jotta tarkkuutta vaativa työ saatiin hoidettua ilman, että hiirtä jouduttiin pitämään paikallaan ja siten aiheuttamalla eläimille mahdollisimman vähän stressiä toimenpiteessä.

Voisiko toimenpiteiden toteuttamistapaa ja/tai hoitomenetelmiä edelleen kehittää?

Kyllä. Lopetuskriteereitä voisi edelleen tarkentaa vieläkin tarkemmiksi ja objektiivisemmiksi. Kokeilimme toisen lyhyemmän kokeen yhteydessä hiirten kuntoa arvioivan pisteytystaulukon käyttöä, mitä voisi tulevaisuudessa hyödyntää lopetuskriteerien määrittämiseen. Hiiret kuitenkin lopetettiin tässä kokeessa ennen inhimillistä päätepidettä.

Voisiko inhimillisiä lopetuspisteitä aikaistaa?

Lopetuspisteitä ei ehkä selviytymiskokeen tyyppisessä kokeessa voi juurikaan aikaistaa, mutta lopetuskriteereitä voisi tarkentaa malliin paremmin sopiviksi saamamme kokemuksen perusteella. Kokeilimme toisen lyhyemmän kokeen yhteydessä hiirten kuntoa arvioivan pisteytystaulukon käyttöä sekä arvioimme

sen soveltuvuutta käytettäväksi inhimillisen lopetuspisteen määrittämiseen kyseisellä mallilla. Tässä ko-
keessa emme kuitenkaan seuranneet hiiriä inhimilliseen päätepisteeseen saakka, joten lopullisia johto-
päätöksiä on vaikea tehdä. Pisteytystaulukko tuntui kuitenkin toteuttamiskelpoiselta tavalta seurata hiir-
ten kuntoa ja on mahdollista, että muokkaamalla lopetuskriteerejä tähän suuntaan, voitaisiin ”terminaali-
tapaukset” tunnistaa aikaisemmassa vaiheessa. Tämä on kuitenkin vielä spekulaaation asteella. Suurin osa
mekanistisista kokeista tehtiin ennen kuin hiirille kertyi kaikkein vakavimpia oireita ja tällöin tutkimme
pääosin vaihetta, jolloin syöpä olisi vielä ollut mahdollisesti sopivalla lääkityksellä hoidettavissa. Myöhäi-
semmän vaiheen vaikutuksia emme siis tällä aikaisemmalla valinnalla tiedä.

Pitäisikö eläinmääriä muuttaa?

Olimme ehkä hieman onnekkaita, kun päädyimme sellaiseen määrään hiiriä, joilla saimme luotettavat tu-
lokset eikä selviytymiskokeita tarvinnut toistaa. Lisäksi liikunnan vaikutuksia syövästä selviytymiseen ei
tarvinnut erikseen tutkia, koska kuulimme, että vastaava koe tapahtui Italiassa kokeneiden tutkijoiden
toimesta. Niiden tulokset antoivat osviittaa, että koetta ei kannata toistaa enää Suomessa, vaan on hyö-
dyllisempää keskittyä selittämään tekemämme selviytymiskokeen hoidettujen hiirten paremman selviyty-
misen mekanismeja syvällisemmin lyhyempikestoilla ja vähemmän vakavilla mekanistisilla kokeilla.

Voisiko käytetyistä eläimistä saada enemmän tietoa hyödynnettäväksi?

Voi ja käymme läpi mahdollisuuksia yhteistyöhön muiden tutkimusryhmien kanssa, jos joku muukin halu-
aisi käyttää pakkaseen keräämiämme näytteitä, jotta heidän ei tarvitse tehdä vastaavia kokeita.

Olisiko keksityillä 3R-keinoilla laajempaa hyödynnettävyyttä?

Emme osaa sanoa.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Osahanke 1	Balb-c	+	25/20	Vakava/Vakava	Syövän vaikutukset kuten painonlasku, yleiset merkit pahoinvoinnin lisääntymisestä. Vakavaksi luokiteltavia oireita 8/20 hiirelle ennen lopetusta.	Pilottikoe. Haittaa minimoitiin mm. päivystämällä useita kertoja päivässä hiirten luona ja lopettamalla koe ennen pahimpia oireita. Tämä pilottikoe auttoi määrittämään seuraavissa kokeissa tarvittavien eläinten määrää.
Osahanke 1	Balb-c	+	80/42	Vakava/Vakava	Syövän vaikutukset kuten painonlasku, yleiset merkit pahoinvoinnin lisääntymisestä. Vakavaksi luokiteltavia oireita 30/42 hiirelle ennen lopetusta.	Tämä oli vaikutuksiltaan vakavin koe eli selviytymiskoe ja syy miksi kokeet luokiteltiin vakavaksi. Arvioimme eläinmäärän nappiin, koska hoitojen vaikutukselle saatiin hyvä, mutta ei liian suuri tilastollinen teho. Pienemmällä eläinmäärällä tulos olisi jäänyt epäselväksi liian heikon tilastollisen tehon johdosta. Eläinten kaikkein pahin olo pyrittiin minimoimaan mm. päivystämällä useita kertoja päivässä hiirten luona ja lopettamalla koe lopetuskriteerien mukaisesti. Eläinten syömistä autettiin loppuvaiheessa laittamalla pellettejä kuivikkeiden joukkoon.
Osahanke 1	Balb-c	+	40/40	Kohtalainen/Kohtalainen, vakava vain pienellä osalla hiiriä.	Syövän vaikutukset kuten painonlasku, yleiset merkit pahoinvoinnin lisääntymisestä. Vakavaksi luokiteltavia oireita 2/40 hiirelle ennen lopetusta.	Kokeeseen tarvittavien hiirien määrä arvioitiin edellisten kokeiden perusteella. Hiirten vointia seurattiin tarkasti kokeen ajan, jotta voitiin havaita, mikäli joidenkin yksilöiden vointi alkoi heiketä.

Osahanke 1	Balb-c	+	40/37	Kohtalainen/Kohtalainen, vakava vain pienellä osalla hiiriä.	Syövän vaikutukset kuten painonlasku, yleiset merkit pahoinvoinnin lisääntymisestä. Vakavaksi luokiteltavia oireita 6/37 hiirelle ennen lopetusta.	Kokeeseen tarvittavien hiirien määrä arvioitiin edellisten kokeiden perusteella. Hiirten vointia seurattiin tarkasti kokeen ajan, jotta voitiin havaita, mikäli joidenkin yksilöiden vointi alkoi heiketä.
------------	--------	---	-------	--	--	--

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää.
ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoidessa
Aikaisempi päätepiste	X	X	-	-
Lyhyempi seuranta-aika	X	X	-	-
Pesämateriaali	X	X	X	-
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	-
Totuttaminen	X	X	-	-

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, [ks. EU-komission ohje ja esimerkki](#). Vastaa vain esitettyihin kysymyksiin. Tarkista, että vastauksesi ovat ymmärrettäviä myös lukijalle, jolla ei ole taustatietoja asiasta.

Hankkeen nimi	Anesteettien neurobiologisten ja terapeuttisten vaikutusten tutkimus	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Anesteetti, hermoston muovautuvuus, hermokasvutekijä, masennus, masennuslääke	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Tutkimuksessa selvitetään anesteettien ja niiden kaltaisten yhdisteiden terapeuttisia vaikutuksia ja niiden mekanismeja neuropsykiatristen sairauksien hoidossa käyttämällä valikoituja jyr-sijöiden masennus- ja skitsofreniamalleja. Lisäksi selvitämme varhaisen kehityksen anesteettialtistuksen haitallisia aivovaiku-tuksia ja niiden mekanismeja. Päättävöitteena on tuottaa tutki-mustietoa, jonka avulla aivosairauksien, kuten masennuksen ja skitsofrenian, hoitoa voi kehittää.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tulokset tulevat merkittävällä tavalla lisäämään tietoa anes-teettien vaikutuksista hermoston muovautuvuuteen sekä nii-den terapeuttisesta potentiaalista masennuksen ja skitsofre-nian hoidossa.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri: 3480; Rotta: 2136	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Tutkimuksessa eläimille aiheutuu haittaa kirurgisista toimenpi-teistä, johon liittyvää kipua lievennetään postoperatiivisella ki-vunpoistolla. Haittaa aiheutuu lisäksi tutkittavien aineiden an-nostelusta, sähköshokkien antamisesta hereillä sekä käyttäyty-mistestien suorittamisesta. Ennakoimattoman stressin malli ai-heuttaa psykologista stressiä eläimille. Geenimuunnoksista en-nakoitu haitta estetään käyttämällä eläimet ennen mahdollis-ten oireiden ilmaantumista. Eläimet lopetetaan kokeiden pää-tyttyä. Vakavuusluokka: vakava	

3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement- Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Käyttäytymistä, hermoston muovautuvuutta ja hermoston muovautuvuuden häiriöitä voidaan hyvin mallintaa jyrsijöillä. Skitsofrenian ja masennuksen neurobiologiaa ja käyttäytymistä voidaan osittain mallintaa kuvatuissa eläinmalleissa. Hermoston toimintaan ja muovautuvuuteen vaikuttavat lääkeaineet (ja sähköhoito) vaikuttavat monimutkaisissa intakteissa hermoverkoissa, joiden mallintamista on vaikeaa, ellei mahdotonta, simuloida viljelyolosuhteissa. Aiempien tutkimusten mukaan monet tutkittavat ilmiöt ilmenevät tietyn kehitysjakson jälkeen ja siten niiden mallintaminen viljelyolosuhteissa on vaikeaa.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Kokeet suunnitellaan siten, että eläinmäärät pysyvät mahdollisimman pieninä, kuitenkaan vaarantamatta tuloksen oikeellisuutta. Joissakin koeasetelmissa eläimet läpikäyvät useita valikoituja kokeita. Tämä luonnollisesti vähentää lukumääräisesti koe-eläimien käyttöä. Kokeet tehdään loogisessa hypoteesien todentamisjärjestyksessä. Jyrsijämallien tilalla käytämme mahdollisuuksien mukaan solumalleja.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	A-B) Käytetyillä eläinmalleilla ja koeasetelmilla on laajasti tunnettu ja rationaalinen tieteellinen pohja esitetyissä tarkoituksissa. Hiirimallien käyttö on erityisen tärkeää, koska valmiiksi luotuja ja kuvattuja tutkimuksiimme soveltuvia muuntogeenisiä hiirimalleja on saatavilla. Monet aiemmat tutkimuksemme on myös kuvattu hiirimalleissa. Rottia käytetään hiirien rinnalla erityisesti masennuksen stressimalleissa, sillä mallit toimivat odotusarvoisesti paremmin rotilla. Kaikissa jyrsijätutkimuksissa pyritään ensisijaisesti kuitenkin käyttämään hiiriä. Jyrsijöiden sijaan pyrimme käyttämään solumalleja kaikissa niissä tutkimusasetelmissa, joissa niiden osoitetaan mallintavan tieteellisiä ilmiöitä toivotulla tavalla. C) Eläimien vointia seurataan systemaattisesti. Mikäli eläimen osoitetaan kokevan kuvatuista ennakkohoitotoimenpiteistä (ml. kivun lievitys) huolimatta ennakoitua suurempaa haittaa, ryhdytään tarvittaviin toimenpiteisiin tilanteen korjaamiseksi. Kirurgisten toimenpiteiden yhteydessä ilmenevää kipua lievitetään kipulääkityksellä. Tarvittaessa eläin lopetetaan asianmukaisesti jo ennen varsinaisen eläinkokeen alkamista tai päättymistä eettisesti hyväksytyin menetelmin. Bdnf^{-/-} poistogeeniset hiiret lopetetaan ennen kuin vakavia kehityksellisiä oireita ilmaantuu.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TIEDOT

Saapumispvm: 8.6.2018, 2.versio 27.6.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen päätavoitteena on ollut selvittää nopeavaikutteisten masennuksen hoitomuotojen (ketamiini, ilokaasu, sähköhoito, unideprivaatio) neurobiologisia vaikutusmekanismeja ja vaikutuksia aivojen toimintaan, käyttäytymiseen ja kehitykseen. Hankkeessa hyödynnettiin jysijöitä (hiiri, rotta), koska ne toimivat erinomaisia eläinmalleina masennuslääketutkimuksessa. Masennuslääkkeet vaikuttavat monimutkaisissa intakteissa hermo verkoissa ja niiden aikaansaamat neurobiologiset ja käyttäytymisen tason muutokset riippuvat keskeisesti jopa aivojen kehityksestä. Siksi alkeellisempien eläinmallien ja solumallien soveltuvuus monien hankkeen kannalta keskeisten tieteellisten kysymysten selvittämisessä on vaikeaa, ellei mahdollista. Hankkeessa ei käytetty geenimuunneltuja eläimiä. Tavoitteissa on onnistuttu erinomaisesti. Keskeiset hankkeen mahdollistamat löydökset:

- (1) Nopeavaikutteisilla masennuksen hoitokeinoilla on yhtäläisiä solusignaalintason mekanismeja ja näitä mekanismeja on mahdollista lähes reaaliaikaisesti mitata/ennustaa spesifisten EEG muutosten avulla. Olemme tällä hetkellä hakemassa rahoitusta klinisiin Proof-of-Concept tutkimuksiin.
- (2) Anestesia aiheuttaa mittavia solusignaalintason muutoksia. Löydökset auttavat paremmin ymmärtämään anestesian mekanismeja ja vaikutuksia sekä auttavat parantamaan tutkimuksessa käytettäviä eläinmalleja ja työkaluja.
- (3) Lyhytaikainen altistuminen anestesialle varhaiskehityksen aikana aiheuttaa hyvin pieniä pitkäaikaisia muutoksia eläinten käyttäytymisessä

2. Millaista haittaa?

Ote hankkeen kohdasta 6.3. :

Takautuvassa arvioinnissa pyydetään selvittämään erityisesti, kuinka monta eläintä hankkeessa on lopetettu lopetuskriteereitä käyttäen ja mistä toimenpiteistä, kuinka monta eläintä on kuollut ja mistä toimenpiteistä sekä tarkempi kuvaus käsittelyiden tosiasiallisesta haitasta (esimerkiksi millaista on 30 ip pistoksen jälkeen eläinten käyttäytyminen/olemus/miltä vatsan alue näyttää jne, onko sähköshokkien jälkeen havaittavissa muutoksia eläinten hyvinvoinnissa, jne).

Hankkeen vakavuusasteeksi määriteltiin ennakkoon ”vakava”. Tämä perustui erityisesti hankkeessa kuvattujen toistuvien (jopa 30 injektiota eläimen eliniän aikana) vatsaonteloon lääkeinjektioiden suorittamisesta sekä sähköshokkien (engl. *electroconvulsive shock*; sähköhoidon eläinmalli) annostelemisesta tajuiinsa oleville eläimille. Lääkeinjektioita ei annosteltu eläimille hankkeessa kuvattua enimmäismäärää. Tyyppillisesti eläimelle annosteltiin vain yksittäisiä injektioita. Toistuvia lääkeinjektioita annosteltiin esimerkiksi EEG-mittausten aikana. Injektioiden välillä pidettiin useiden päivien taukoja eikä injektioista aiheutunut merkittävää/näkyvää haittaa eläimelle. Sähköshokkeja ei annosteltu tajuiinsa oleville eläimille.

SV3-vakavuusluokan haittaa eläimet kokivat EEG-tutkimuksissa, joissa eläimille asennettiin kirurgisesti EEG-mittauselektrodit. Kirurgia suoritettiin nukutuksen aikana ja kivunlievitystä käytettiin ennen ja jälkeen kirurgisen operaation. Lisäksi käyttäytymiskokeissa käytettiin osalle eläimistä pelkoehdollistumismallia, johon sisältyy lyhytaikainen toistettu sähköisku lattiaverkon kautta. Tästä syystä pelkoehdollistumismallin läpikäyneet eläimet luokiteltiin SV3-vakavuusluokkaan.

2 eläintä lopetettiin lopetuskriteereitä käyttäen EEG-mittauselektrodien asennuskirurgian jälkeisen leikkaushaavan tulehtumisen vuoksi. 1 eläin kuoli EEG-mittauselektrodien asennuskirurgian jälkeiseen odottamattomaan kohtaukseen. Näiden eläinten kokeman haitan vakavuudeksi on tästä syystä arvioitu SV4.

Hankkeessa käytettyjen eläinten vakavuuden arviointi on esitetty ao. taulukoissa.

Hiiri

Vakavuus-luokka	Lukumäärä
NB	0
SV1	114
SV2	1077
SV3	132
SV4	3

Rotta

Vakavuus-luokka	Lukumäärä
NB	0
SV1	0
SV2	22
SV3	0
SV4	0

NB: ei tarvetta luokitella; **SV1:** ei toipumista; **SV2:** lievä; **SV3:** kohtalainen; **SV4:** vakava

3. 3R-mahdollisuudet

Korvaaminen - Replacement

Aivosairaudet liittyvät kiinteästi korkeaan keskushermoston organisaatiotilaan ja niiden mallinnus hyvin alhaisen kehitystason eläimillä ei ole mahdollista. Tutkimuksissa pyrittiin käyttämään erilaisia soluviljelymenetelmiä ja ex vivo tutkimuksia korvaamaan eläinkokeita. Tutkimustemme mukaan jopa hermoston kehitysasteella näyttäisi olevan keskeinen merkitys tutkittavien yhdisteiden aivovaikutuksille ja tähän mennessä **in vivo** havaintojen toistaminen soluviljelmissä ei ole tuottanut tulosta. Jatkamme selvitystyötä löytääksemme olosuhteet, joissa lääkeaineiden vaikutuksia voidaan tutkia solumalleissa.

Vähentäminen - Reduction

Kokeet suunnitellaan siten, että eläinmäärät pysyvät mahdollisimman pieninä, kuitenkin vaarantamatta tuloksen oikeellisuutta (esim. käyttäytymiskokeet N=10-14/ryhmä, biokemialliset kokeet N=4-10/ryhmä; ryhmäkoosta määräytyy odotetun vasteen ja varianssin mukaan). Joissakin koeasetelmissa eläimet läpikäyvät useita tarkoin valikoituja ja perusteltuja kokeita, jolloin voidaan vähentää täydentävien kokeiden suoritusta. Kokeet tehdään loogisessa hypoteesien todentamisjärjestyksessä. Suosimme ns. pilot-tutkimuksia, joissa mallien toimintaa ja hypoteesia esiselvitetään ennen ryhtymistä isoihin koesarjoihin.

Parantaminen – Refinement

Käytetyillä eläinmalleilla ja koeasetelmilla on laajasti tunnettu ja rationaalinen tieteellinen pohja esitetyissä tarkoituksissa. Tutkimuksissa pyritään käyttämään ensisijaisesti hiirimalleja, koska valmiiksi luotuja ja kuvattuja muuntogeenisiä hiirimalleja on hyvin saatavilla. Jyrsijöiden sijaan pyrimme käyttämään solumalleja ja kudospreparaatteja tutkimusasetelmissa, joissa niiden osoitetaan mallintavan tieteellisiä ilmiöitä toivotulla tavalla. Eläimien vointia seurataan systemaattisesti ja ennakoituja haittoja ehkäistään mm. kivunlievityksellä kirurgisten operaatioiden yhteydessä ja käsittelyyn totuttamisella. Mikäli eläimen osoitetaan kokevan ennakoitua suurempaa haittaa, tarkkaillaan eläimen tilaa tehostetusti yhdessä hoitohenkilökunnan kanssa ja hoidetaan tarvittaessa esim. kipulääkityksellä ja nesteytyksellä. Tarvittaessa eläin lopetetaan asianmukaisesti jo ennen varsinaisen eläinkokeen alkamista tai päättymistä eettisesti hyväksytyin menetelmin.

Muuta

Hankkeessa kuvattiin monia osahankkeita ja toimenpiteitä, joita hankkeen aikana ei lopulta suoritettu. Näihin kuuluu mm. ohjauskanyylin ja minipumpun asentaminen, sähkösokki (tajuissaan olevalle eläimelle), geenien/proteiinien/lääkeaineiden/merkkiaineiden paikallinen annostelu hermostoon, pimeäkasvatus, ehdollistettu paikkahakuisuus, psykososiaaliseen stressiin perustuvat eläinmallit. Em. toimenpiteiden suorittamatta jättäminen johtui lähinnä tieteellisistä ja resurssisyyistä. Osa tutkimuksista suoritettiin kansainvälisen yhteistyön kautta.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuus-luokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Tutkittavien yhdisteiden biokemialliset vaikutukset	Hiiri	+	1280 / 1077	SV4-Vakava / SV1-Ei toipumista (92 eläintä) SV2-Lievä (985 eläintä)	Vakavin haitta aiheutui lääkeaineannostelusta johtuvasta injeksiokivusta ja käsittelystressistä.	Pilottitutkimukset Voima-analyysi Solumallien käyttö
-	Rotta	+	720 / 22	SV4-Vakava / SV2-Lievä	-	-
Sähköhoidon biokemialliset vaikutukset ja sähköhoidon/lääke-aineiden EEG vaikutukset	Hiiri	+	240 / 105	SV4-Vakava/ SV3-Kohtalainen (102 eläintä) SV4-Vakava (3 eläintä)	SV4: 3 eläintä Satunnainen haitta kirurgian jälkeisten komplikaatioiden vuoksi.	Pilottitutkimukset Voima-analyysi Toistetut mittaukset
-	Rotta	-	240 / 0	SV4 / -	Tutkimuksia ei tehty	-
Tutkittavien yhdisteiden käyttäytymisvaikutukset	Hiiri	+	840 / 144	SV4-Vakava / SV1-Ei toipumista (22 eläintä), SV2-Lievä (92 eläintä), SV3-Kohtalainen (30 eläintä)	SV3: 30 eläintä Mallista aiheutuva haitta. Pelkoehdollistumismalliin lukeutuvat toistuvat lievät sähköiskut.	Pilottitutkimukset Voima-analyysi Toistetut mittaukset

-	Rotta	-	336 / 0	SV4 / -	Tutkimuksia ei tehty	-
Lääke/sähköhoidon vaikutukset stressiteoriaan perustuvissa masennusmalleissa	Hiiri	-	560 / 0	SV4 / -	Tutkimuksia ei tehty	-
-	Rotta	-	420 / 0	SV4 / -	Tutkimuksia ei tehty	-
Lääke/sähköhoidon vaikutukset lääkeindusoiduissa masennuksen/skitso-frenian tautimalleissa	Hiiri	-	560 / 0	SV4 / -	Tutkimuksia ei tehty	-
-	Rotta		420 / 0	SV4 / -	Tutkimuksia ei tehty	-

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää.

ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoidessa
Solumallit	X	X	-	X
Voima-analyysit	X	X	X	X
Pilottitutkimukset	X	X	-	-
Toistetut mittaukset (lievä haitta)	X	X	-	-

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, [ks. EU-komission ohje ja esimerkki](#). Vastaa vain esitettyihin kysymyksiin. Tarkista, että vastauksesi ovat ymmärrettäviä myös lukijalle, jolla ei ole taustatietoja asiasta.

Hankkeen nimi	GDNF hermokasvutekijäperheen toiminnan tutkiminen in vivo ja in vitro	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	GDNF, Parkinsonin tauti, enterinen hermosto, immuunijärjestelmä	
Hankkeen tarkoitus	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	Kyllä
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Tarkoituksena on tutkia geenimuunneltuja hiiriä käyttämällä hermokasvutekijä GDNF:n ja sen reseptorin vaikutuksia hermo- solujen kehitykseen, toimintaan ja hermostorappeumatautien (kuten Parkinsonin tauti) ja synnynnäisten ruuansulatuskana- van hermostopoikkeamien (kuten Hirschsprungin tauti) synty- miseen. Tietoja voidaan soveltaa ihmisen hermostorappeuma- sairauksien ennaltaehkäisyyn ja hoitoon. Lisäksi selvitetään GDNF:n merkitystä munuaisten ja muiden kudosten kehityk- seen ja toimintaan. Tarkoituksemme on käyttää GDNF-tason nousua sitä luontaisesti ilmentävissä soluissa parannuskeinona esimerkiksi Parkinsonin taudin hiirimallissa.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	GDNF:n vaikutuksia elävässä elimistössä on ollut vaikeaa aiem- min tutkia, koska täysin GDNF poistogeeninen hiiri ei ole elinky- kyinen. Näillä uusilla hiirilinjoilla saadaan tietoa hermokasvute- kijän vaikutuksista elimistössä. Tiedot auttavat selvittämään hermostorappeuma-sairauksien taustaa sekä mahdollisesti ke- hittämään uusia hoitomuotoja sairauksiin, kuten Parkinsonin tautiin, Hirschsprungin tautiin ja sen komplikaatioihin sekä mu- nuaisten ja lisääntymiselinten sairauksiin.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri, 8000 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Osalle geenimuunneltujen hiirten poikasista voi aiheutua hait- taa perimästä, jolloin kannalla voi olla munuaisten toimintahäi- riö tai vaginan aukon umpeuma. Kahden geenimuunnellun kan- nan poikasilla on etenevää ummetusta ja suoliston laajene- mista sen takia. Tutkimuksessa olevilla aikuisilla eläimillä ei ole perinnöllistä haittaa. Aivotutkimuksessa eläimille aiheutuu haittaa stereotaktisesta leikkauksesta aivoihin, käyttäytymiskokeiden suorittamisesta sekä Parkinsonin taudin indusoinnista. Parkinsonin taudin malli	

	tehdään eri eläimille kuin sivuvaikutuksia mittaavat käyttäytymiskokeet. Suoliston tutkimuksessa haittaa aiheutuu tutkittavien aineiden annosteluista. Suoliston ummetus ja laajeneminen voi aiheuttaa huomattavaa haittaa ja toimia eläimen lopetuskriteerinä. Immuunijärjestelmän tutkimuksessa aiheutetusta lievästä tulehduksesta aiheutuu eläimille lyhytaikaisesti lievä tai kohtalainen haitta. Eläimet lopetetaan kunkin kokeen päätyttyä. Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Eläinsolu- ja kudosisviljelmät eivät korvaa eläinmalleja koska niillä ei ole mahdollista tutkia kudosisvuorovaikutuksia. Olemme tehneet paljon korvaavia kokeita in vitro solulinjoilla, kudosis- ja primäärisoluviljelmissä.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Tutkimme GDNF-hermokasvutekijäperhettä myös esimerkiksi eri solulinjoilla, kudosis- ja primäärisoluviljelmissä. Jokaista osakoetta varten määritetään mahdollisimman pieni tarvittava eläinmäärä.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Eläinkokeissamme käytämme muuntogeenisiä eläimiä, jolloin hiiri on ensisijainen vaihtoehto. b) Hiiren hermoston kehitys on hyvin tunnettu ja tutkimamme proteiinit ovat hyvin samankaltaisia hiirellä ja ihmisellä. c) Eläinten määrä pidetään mahdollisimman vähäisenä. Eläinten hyvinvointia seurataan tiiviisti ja eläintenhoitajat saavat ohjeet lopettaa eläimen, jos hyvinvointiongelmia ilmenee.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 24.2.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Lautakunnan toive luvan käsittelyssä: Takautuvassa arvoinnissa tulee erityisesti kiinnittää huomiota suolistotutkimuksen eläinten vointiin: kuinka moni eläin jouduttiin lopettamaan ennenaikaisesti ja miten monelle eläimestä kehittyi vakavia suolisto-oireita (esim vatsan turvotusta, joka johti lopetukseen).

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Mitä tavoitteita hankkeella oli? Miten näiden saavuttamisessa onnistuttiin? Onko käytetty eläinmalli soveltuva tähän tutkimukseen? Anna tiedot tarvittaessa osahankkeittain tai toimenpiteittäin.

Hermokasvutekijät ovat pieniä erittyviä proteiineja, jotka edistävät hermosolujen eloonjäämistä, erilaistumista, toimintaa ja ylläpitoa kehittyvässä ja aikuisessa hermostossa. Siksi hermokasvutekijöitä pidetään lupaavana hoitomuotona parantumattomiin neurologisiin sairauksiin, kuten Parkinsonin tautiin, jossa tietynlaiset hermosolut kuolevat. Gliasolulinjaperäinen hermokasvutekijä (GDNF) ja sen reseptorit Gfra1 ja Ret ovat tärkeitä keskushermoston lisäksi useiden eri elinjärjestelmien tai kudosten kehityksessä ja ylläpidossa (esimerkiksi ruuansulatuskanavan hermosto, munuaiset ja immuunijärjestelmä).

Aivotutkimus.

Tarkoituksena oli tutkia geenimuunneltuja hiiriä käyttämällä hermokasvutekijä GDNF:n ja sen reseptorin vaikutuksia hermosolujen kehitykseen, toimintaan ja hermostorapheimatautien (kuten Parkinsonin tauti) syntymiseen.

Ensimmäisenä tavoitteena oli määritellä Parkinsonin taudin mallissa, vaikuttaako GDNF:n konditionaalinen poistaminen kuolevien hermosolujen määrään. Sekä eläimillä, joilla GDNF poistetaan konditionaalisesti, että GDNF-hypermorfisilla eläimillä dopamiinitransportterin aktiivisuus on suurentunut, jolloin Parkinsonin tautia ei voida mallintaa 6-hydroksidopamiinin eikä MPTP:n avulla. Siksi käytimme laktakystiini, jonka toksisuus välittyy toisella mekanismilla. Tutkimme laktakystiinillä indusoitua Parkinsonin mallia vanhoilla (noin 15 kk) GDNF cKO x Nestin-Cre -ja GDNF cKO x Esr1-Cre -hiirillä, koska hypotesimme oli, että pitkittynyt alhainen GDNF-taso olisi haitallista dopaminergisille hermosoluille. Käytimme pientä laktakystiiniannosta (2-3 µg/hiiri) havaitaksemme toksiiniherkkyyden lisääntymisen GDNF:n poistamisen jälkeen. Tämä annos aiheutti 20-30 % dopaminergisten hermosolujen kuoleman leesiopuolelta. Koe onnistui teknisesti, mutta eläimet, joilta GDNF oli poistettu konditionaalisesti, eivät olleet herkempiä laktakystiinin vaikutuksille, jolloin GDNF:n vähentynyt taso ei todennäköisesti ole merkityksellinen Parkinsonin taudin patogeenisissä. Nämä tulokset tullaan julkaisemaan lähitulevaisuudessa.

Toisena tavoitteena oli pyrkiä selvittämään, onko luonnollisen GDNF-tason lisääminen hyvä lääkevaikutuskohde sekä tuottaa menetelmiä, joilla luonnollista GDNF-tasoa voidaan nostaa aikuisen aivoissa. Käytimme kehittämäämme uutta hiirikantaa: konditionaalinen GDNF-hypermorfinen hiiri (GDNF3'UTR-cr). GDNF 3'UTR-cr-hiirillä GDNF ekspression nousu voidaan rajata sitä normaalisti tuottaviin soluihin eri aivoalueilla. GDNF:n lisääminen tehtiin aikuisuudessa välttääksemme kompensatorisia mekanismeja, mitkä kehityksen aikana saattavat reagoida GDNF:n ylimäärään.

Ensin tutkimme, miten aikuisuudessa lisätty endogeenisen striataalisen GDNF:n määrä vaikuttaa eläimiin käyttäytymiskokeissa. Hiirille injisoitiin AAV-Cre:tä striatumiin, ja niitä seurattiin neljän kuukauden ajan eri käyttäytymiskokeiden avulla. Osa eläimistä lopetettiin eri aikapisteissä GDNF- ja dopamiinitasojen määrittämiseksi sekä dopaminergisen järjestelmän toiminnan tutkimiseksi syklisen voltammetrian avulla. Havaitimme, että GDNF-taso nousee jo neljän viikon kuluttua AAV-Cre-injektiosta. Lisätty GDNF parantaa tiettyjä аспектеja dopaminergisen järjestelmän toiminnassa. Lisäksi havaitsimme, ettei suurimmassa osassa käyttäytymiskokeita eikä esimerkiksi eläinten painossa ole eroja GDNF:n lisäämisen jälkeen. Näistä voimme päätellä, että kuten GDNF-hypermorfisilla eläimillä, GDNF:n lisääminen konditionaalisesti ei aiheuta merkittäviä sivuvaikutuksia. Eläinmäärän pitämiseksi vähäisenä osa eläimistä käytettiin käyttäytymiskokeiden lisäksi laktakystiini-indusoituu Parkinsonin taudin malliin. Niille injisoitiin 4 µg laktakystiinia substantia nigraan 4,5 kuukautta AAV-Cre-injektion jälkeen. Hiiret lopetettiin 6 viikkoa laktakystiini-injektion jälkeen. Emme havainneet leikkauksenjälkeistä kuolleisuutta ja laktakystiiniannos aiheutti noin 40 % kuoleman dopaminergisissa hermosoluissa leesiopuolella. Solukuolemien määrä oli sama villintyyppin ja GDNF 3'UTR-cr-hiirillä, joten päätelimme, ettei lisääntynyt GDNF:n määrä suojaa dopaminergisia hermosoluja laktakystiinimallissa. Koska GDNF ilmentyy aivoissa striatumissa, johon dopaminergisten hermosolujen neuroiitit projisoivat, tutkimme kuitenkin seuraavaksi, miten GDNF vaikuttaa neurorestoraatiomallissa. Tässä koesarjassa annoimme hiirille samanaikaisesti AAV-Cre-injektion striatumiin ja 5 µg:n laktakystiini-injektion substantia nigran yläpuolelle. Seurasimme eläinten toipumista leikkauksesta neljän kuukauden ajan injektioista. Laktakystiiniannosta suurennettiin edellisten kokeiden perusteella, koska arvelimme nuorempien eläinten kestävänsä paremmin laktakystiinin toksisuutta ja epäilimme, että liian pieni leesio voi estää erojen näkemisen ryhmien välillä. Havaitimme lisätyn endogeenisen GDNF:n neurorestoratiivisen vaikutuksen yhdessä koe-eläinryhmässä, mutta emme toisessa koe-eläinryhmässä. Siksi päätelmien tekemiseksi tarvitaan vielä lisäkokeita.

Käytetyt eläinmallit soveltuivat hyvin päätelmien tekemiseen molempien tavoitteiden suhteen.

Suoliston tutkimus

Suoliston tutkimuksen tavoitteena oli Gfra1-hypomorfista hiirikantaa tutkimalla saada tietoa Hirschsprungin taudin kehityksestä ja kokeilla uusia parannuskeinoja. Tässä keskityimme Hirschsprungin taudin ja siihen liittyvän enterokoliitin patogeneesiin. Kudosnäytteiden histopatologiaa, geenien ilmentymistä ja muita näytteitä tutkimalla saimme selville, että näillä eläimillä paksusuolen epiteelissä, pikarisolujen määrässä ja lima-aineiden koostumuksessa tapahtuu muutoksia, jotka liittyvät enterisen hermoston puuttumiseen. Bakteerien pääseminen kudoksiin tapahtuu loppuvaiheessa eikä bakteeri-invaasiota voida pitää enterokoliitin aiheuttajana. Nämä tulokset tulevat julkaisemaan pian.

Toisena suolistotutkimuksen tavoitteena oli tutkia, miten GDNF ja Gfra1 vaikuttavat kantasolujen toimintaan ja suoliston uusiutumiseen tutkimissamme hiirikannoissa. 5-fluorourasiililla aiheutetun mukosiitin avulla saimme selville, että eläimillä, joilta poistetaan kantasoluista GDNF, 5-fluorourasiilin aiheuttamat oireet vaikuttavat lievemmillä kuin kontrollieläimillä. Ja vastaavasti GDNF-hypermorfisten eläinten oireet vaikuttavat hieman vakavammilta kuin villityypin eläimillä. Molempiin näistä tarvitaan kuitenkin lisäkokeita esimerkiksi sen takia, että GDNF-hypermorfisten eläinten ulosteissa on jo valmiiksi enemmän vettä kuin villityypin eläimillä, jonka havaitsimme näiden kokeiden jälkeen.

Käytetyt eläinmallit soveltuivat hyvin päätelmien tekemiseen molempien tavoitteiden suhteen.

Immuunijärjestelmän tutkimus

Emme suorittaneet kokeita tähän osatutkimukseen liittyen.

2. Millaista haittaa?

Aivotutkimus

Aikaisemmin kuvatussa kokeessa, jossa tutkimme aikuisuudessa lisättyä endogeenista GDNF:ää Parkinsonin taudin mallissa, havaitsimme, että 4-5 µg:n laktakystiiniannos aiheuttaa eläimissä spontaania pyörimiskäyttäytymistä akuutisti injektion jälkeen. Pyörimistä tapahtuu etenkin 1-3 päivää injektion jälkeen ja vähenee sitten. Vaikka pyöriminen ei aiheuta haittaa suurimmalle osalle eläimistä, joitakin eläimiä jäi kiinni pesämateriaaleihin ja tukehtui tai jouduttiin lopettamaan. Tukehtumisten ja lopetusten välttämiseksi laktakystiini-injektion saaneiden eläinten pesämateriaali vaihdettiin puuvillaiseksi seuraavissa kokeissa. Laktakystiinin annostasolla 5 µg/hiiri havaittiin myös odottamatonta ja selittämätöntä leikkauksen jälkeistä kuolleisuutta (10-15 % eläimistä 2-3 viikon sisällä injektioista. Joillakin eläimillä oli myös vaikeuksia syömisessä ja juomisessa. Keskiarvoisesti käsittely ei kuitenkaan vaikuttanut eläinten painoon.

Luvassa laktakystiinin vakavuusluokka oli arvioitu lyhytaikaisesti kohtalaiseksi, mutta osalla eläimistä se oli tosiasiallisesti vakava. Jatkossa laktakystiiniannosta on pienennetty ja ongelmien toistumisen välttämiseksi.

Stereotaktisiin leikkauksiin, käyttäytymiskokeisiin eikä muihin toimenpiteisiin ja kokeisiin ei liittynyt ongelmia. Näiden kokeiden toteutunut haitta oli samalla tasolla kuin lupaan oli arvioitu.

Suoliston tutkimus

Vakavampia toimenpiteitä tässä luvassa olivat Gfra1-hypomorfisten homotsygoottisten poikasten Hirschsprungin taudin fenotyypin seuraaminen niin pitkään, että oireet kehittyivät merkittäviksi. Pieni määrä näitä eläimiä oli tarpeen Hirschsprungin tautiin liittyvän enterokoliitin patogeneesin tutkimiseksi. Näille eläimille sekä arvioitu että toteutunut haitta oli SV4. Tyypillisesti pyrimme lopettamaan hiiret ennen kuin niillä on vaikeita oireita. SV4-eläimiä laskettiin suoliston tutkimuksessa käytetyksi 11 kappaletta, joista osa suurin osa lopetettiin ja osa kuoli, joko oireisiin tai emon hoidonpuutteen takia.

Muissa suolistotutkimuksen toimenpiteissä haitta oli arvioitu tai vähäisempi.

3. 3R-mahdollisuudet

Hankkeen aikana olemme vähentäneet eläinmäärää käyttämällä lopetetuista eläimistä mahdollisimman paljon eri kudoksia kerralla ja tutkimalla rinnalla esimerkiksi GDNF:n lisäämistä solulinjoissa.

Eläinten hyvinvointia on parannettu laktakystiinikokeissa vaihtamalla pesämateriaali paremmin pyörimiskäyttäytymiseen sopivaksi.

Seuraavan luvan aikana kokeilemme, voimmeko annostella tamoksifeenin vaihtoehtoista antoreittiä (i.g./p.o.) i.p.-injektioiden asemesta.

Gfra1-hypomorfisten poikasten lopetuspistettä on aikaistettu seuraavaa lupaa varten, koska tällä hetkellä meillä ei ole tarpeen tutkia päätepisteen eläimiä.

Eläinmääriä ei voida muuttaa pienemmiksi, koska ne on lupia haettaessa suunniteltu sopivan kokoisiksi tulosten tulkinnan kannalta. Jos eläinmäärä on liian pieni, eroja ei voida saada esiin.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen (SV1: ei toipumista, SV2: lievä, SV3: kohtalainen, SV4: vakava)
Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Aivotutkimus	Hiiri	+	Arvioitu luvassa 2780 Tosiasiallinen SV1 1172 SV2 447 SV3 518 SV4 81 Yhteensä 2218	SV1, SV2-SV3 / SV2-SV3 SV4 osalle eläimistä, jotka saivat laktakystiini-injektion	19 hiirtä kuoli tai lopetettiin kokeisiin tai geneettiseen taustaan liittyvien seikkojen takia. 62 hiirtä kuoli tai lopetettiin satunnaisten syiden takia (vanhat eläimet, emon huonosti hoitamat poikaset, häkkitapellut, hammasongelmat jne.)	Laktakystiinikokeissa pienennetään toksiiniannosta, siten että eläimille koituu vähemmän haittaa. Lisäksi näille eläimille käytetään paremmin soveltuvaa pesämateriaalia.
Suoliston tutkimus	Hiiri	+	1570 / SV4 / 19 kpl SV3 / 54 kpl SV2 / 146 kpl SV1 / 132 kpl Yhteensä 351	SV4 SV3 SV2 SV1 / tosiasiallinen SV4-SV1, SV4-eläimiä 19 kpl	Vakavin haitta suoliston tutkimuksessa syntyi tarpeesta tutkia Hirschsprungin tautia mallintavia hiiriä, joten haitta oli mallista johtuva.	Pyrimme käyttämään sairaista poikasista mahdollisimman paljon kudoksia samalla kertaa, että niiden määrä voitaisiin pitää vähäisenä. Pyrimme myös pitämään loppuvaiheeseen asti sairastuvien poikasten määrän vähäisenä tutkimalla aikaisempia ajankohtia, jolloin poikasten oireet ovat vähäisemmät. Poikueita, joissa voi olla sairastuvia poikasita tarkkailtiin päivittäin.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

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	X
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	X
Totuttaminen	X	X	-	-

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, [ks. EU-komission ohje ja esimerkki](#). Vastaa vain esitettyihin kysymyksiin. Tarkista, että vastauksesi ovat ymmärrettäviä myös lukijalle, jolla ei ole taustatietoja asiasta.

Hankkeen nimi	Lääkeaihiot hermostovaurion parantamiseksi	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	lääkeaiho; aivotrauma; selkäydintrauma; soluväliaine; re-generaatio	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope-tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä
Hankkeen tavoitteet (esim. tie-teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Traumaattinen aivovaurio ja selkäydinvaurio aiheuttavat valta-via inhimillisiä tragedioita ja kustannuksia yhteiskunnille. Yksis-tään USA:ssa arvioidaan olevan noin 5 000 000 aivovauriosta kärsivää potilasta ja noin 260 000 selkäydinvauriosta kärsivää potilasta. Vauriot syntyvät tyypillisesti erilaisissa tapaturmissa, kuten liikenneonnettomuuksissa. Pelkästään USA:ssa aivovauri-oiden arvioidaan aiheuttavan yhteiskunnalle noin 60 miljardin dollarin kustannukset vuodessa, ja selkäydinvaurioiden aiheut-tamiksi kustannuksiksi arvioidaan noin 14.5 miljardia dollaria vuodessa. Keskushermostovaurion kokeneet potilaat voivat joutua elämään rullatuolin varassa lopun elämäänsä ja tarvitse-vat siten monen tyyppistä hoitoa ja tukea, mikä selittää suuria kustannuksia. Hermosoluyhteydet regeneroituvat huonosti aivovaurion ja sel-käydinvaurion jälkeen. Yhtään varsinaisesti parantavaa hoitoa ei ole tällä hetkellä käytettävissä; ainoastaan oireita lievittäviä hoitoja, kuten turvotuksen ja kivun hallinta, käytetään lääkkeel-lisinä hoitoina. Lääketieteellinen tarve uusien hoitostrategioi-den kehittämiseen on siten ilmeinen ("unmet medical need"). Terapia jonka seurauksena yksilö pystyisi liikkumaan ja selviä-mään omatoimisesti halvauksen aiheuttavan aivovaurion tai selkäydinvaurion jälkeen, olisi todellinen lääketieteellinen läpi-murto. Hankkeessa selvitetään olennaisesti kahden lääkeaihion re-generaatiota edistävää vaikutusta aivotrauman ja selkäydin-trauman malleissa. HB-GAM on fysiologisesti keskushermos-tossa korkeina pitoisuuksina esiintyvä erilaistumistekijä joka tarttuu soluväliaineeseen. Kokemuksemme mukaan sillä ei ole mitään haitallisia vaikutuksia aivoihin injisoituna vaan päinvas-toin alustavien tulosten mukaan paranemista edistävä vaikutus.	

	Protamiini taas on ihmisen lääkkeeksi hepariini-vaikutuksen py- sättämiseksi hyväksytty proteiini, joskin sillä alustavien tulos- temme mukaan on jonkin verran toksisia vaikutuksia jotka hä- viävät käytettäessä protamiinin fragmenttia kokopitkän mole- kyylin sijaan. Lääkeaihioiden valinta perustuu suorittamiimme tutkimuksiin hermosoluviljelmillä, joissa todetaan regeneraa- tiota edistävä vaikutus soluissa jotka viljellään hermoston solu- väliainetta muistuttavalla matriksilla.
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Hanke edistää uusien hoitostrategioiden kehittämistä ja par- haassa tapauksessa johtaa keskushermoston plastisuutta ja re- generaatiota edistävän biologisen lääkkeen käyttöön. Par- haassa 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 ensisijai- sesti selkäydinvaurion hoitoon.
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri, 3835; rotta, 700 eläintä.
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Hankkeessa eläimille aiheutuu haittaa kirurgisesta selkäydin- vaurion indusoinnista, lääkkeiden annostelusta sekä käyttäyty- mistutkimuksista. Eläimet lopetetaan kokeen päätyttyä. Vakavuusluokka: vakava
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Soluviljelymallien perusteella tapahtuva lääkeaihioiden seu- lonta vähentää huomattavasti koe-eläinten käyttöä. Työssä on tähän mennessä selvitetty laajasti lääkeaihioiden regeneraa- tiota edistävää vaikutusta käyttämällä keskushermoston soluja viljelmässä. Menetelmässä seurataan lääkeaihioiden kykyä edistää hermosoluverkoston kehittymistä viljelmässä. Kudok- sen hermosoluverkostot ovat kuitenkin monimutkaisia raken- teita, eikä niiden kaikkia ominaisuuksia voida todentaa soluvil- jelmässä. Siksi lupaavimmat lääkeaihiot on tutkittava lisäksi elä- vässä eläimessä.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?	Käytettävät menetelmät ovat tieteellisen kirjallisuuden perus- teella validoituja, mikä odotettavasti vähentää turhia toistoja ja siten käytettäviä eläinmääriä.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on pa- ras tieteellisten tavoitteiden kan- nalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a, b) Hiirimallien käytöllä on regeneraatiotutkimuksessa kes- keinen asema, ja käytettävät koeasetelmat ovat hyvin tes- tattuja nimenomaan hiirillä. Transgeeniset eläinmallit, joita regeneraatiotutkimus käyttää, ovat nimenomaan saatavissa hiirinä ja mahdollisesti tulevaisuudessa tarvittavat transgee- niset mallit tulevat mitä todennäköisimmin edelleen perus- tumaan hiiren käyttöön koe-eläimenä. c) Kirurgisten toimenpiteiden yhteydessä ilmenevää kipua ja turvotusta lievitetään kipulääkityksellä ja steroidilääkityksellä, tarvittaessa jo ennen kirurgiaan ryhtymistä. Lisäksi eläinten toipumista edistetään käyttämällä pehmeää ja lämmittävää pesämateriaalia, lämmittävää alustaa ja nestemäistä ruokaa.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 8.2.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Olenaisena tavoitteena oli parantaa mahdollisuuksia keskushermoston regeneraatioon vaurion jälkeen. Pääasiallisena lääkeaihiona oli HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule; pleiotrophin). Työssä osoitettiin HB-GAM:in edistävän aksonien regeneraatiota selkäytimen transektioaurion jälkeen kuvattamistutkimuksiin perustuen, mikä on sopusoinnussa jo ryhmän aikaisemmin suorittamien, hermosoluvielijelmillä tehtyjen kokeiden kanssa. Lääkekehittelyn jatkoon kannalta mekanistiset löydökset ovat lisäksi merkittäviä: HB-GAM tarttuu regeneraatiota estäviin kondroitiinisulfaattirakenteisiin kumoten niiden estävän vaikutuksen. Löydökset on julkaistu kahdessa artikkelissa.

Julkaisujen lisäksi olemme osoittaneet motorisia funktioita tutkivilla käyttäytymistesteillä HB-GAM:in edistävän toipumista sekä transektiomallissa että kontuusiomallissa. Käytetyt eläinmallit sopivat käsillä olevan prekliinisen tutkimusvaiheen problematiikkaan.

2. Millaista haittaa?

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.

Muutama eläin lopetettiin haavainfektion tai huomattavan ihon raapimisen vuoksi. Infektio-ongelmaa pohdittiin vakavasti ja pyrittiin mahdollisimman steriileihin olosuhteisiin: toimenpidealue pudistettiin huolellisesti, kirurgiset instrumentit steriloitiin (tulevissa kokeissa tullaan käyttämään kussakin kokeessa erillisiä steriilejä instrumenttisarjoja) ja käytettiin tarvittaessa antibiootteja. Ihon raapiminen on tyyppillinen ongelma C57B16-hiirilinjalla ja sitä esiintyy myös kontrollieläimissä ("sham operation") ja kokeen ulkopuolella olevissa eläimissä. Raapimisongelmaan ei ole tällä hetkellä tehokasta hoitoa ja ongelman esiintyminen vaihtelee huomattavasti eri hiirierien välillä.

Muutama eläin kuoli kirurgian aikana (ei selviämistä, SV1). Huolellinen selvittely paljasti että useimmat kuolemat aiheutuivat hengitysongelmista jotka johtuivat syvän anestesian ja kaularangan alueen trauman kombinaatista. Huomasimme että käyttämämme kirurgian yhteydessä isofluraanianestesia on turvallisempi kuin ketamiini/xylatsiini. Lisäksi näyttää siltä että opioidien hengitystä lamaava vaikutus lisää kuoleman riskiä yhdistettynä syvään anestesiaan ja kaularangan alueen traumaan. Senvuoksi suunniteltuna on käyttää ei-steroidi-anti-inflammatorisia lääkkeitä kivun hallintaan 15 minuuttia ennen kirurgiaa, kun taas opioideja käytetään vain sen jälkeen kun eläimet on poistettu isofluraanianestesiasta.

Useimmissa tapauksissa eläimillä on voimakasta kipua 3-4 päivää, minkä jälkeen niiden paino alkaa nousta. Useimmiten on mahdollista tehdä yksinkertaisia käyttäytymistestejä (avokenttätesti, sylinteritesti) 1 viikon jälkeen kun eläimet kykenevät liikkumaan vapaasti. Vaikeammat testit jotka vaativat eläimiltä enemmän fyysistä ponnistelua, kuten pyörivällä tangolla pysyminen, kiipeämistesti ja tarttumislujustesti, aloitetaan lihaksen ja ihon haavojen parannuttua 2 viikkoa kirurgian jälkeen. Yleensä traumatoitujen eläinten funktiot ovat alentuneet eturaajan tarttumislujustestissä, vertikaalisessa kiipeämisno-

peudessa ja taipumuksessa käyttää vaurioitettua puolta (sylinteritesti), kun taas lokomotorinen aktiivisuus (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 tehdään 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. Senvuoksi uskomme että käyttäytymiskokeissa käytettyjen eläinten stressitaso ei ole huomattava. Eläimet joilla on komplikaatioita kirurgiasta ja jotka kokevat vakavaa stressiä, suljetaan pois käyttäytymiskokeista ja lopetetaan heti ongelmien paljastuttua.

3. 3R-mahdollisuudet

korvaavat menetelmät: Soluviljelymallien perusteella tapahtuva lääkeaihioiden seulonta vähentää 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 viljelmässä. Kudoksen hermosoluverkostot ovat kuitenkin monimutkaisia rakenteita, eikä niiden kaikkia ominaisuuksia voida todentaa soluviljelmässä. Siksi lupaavimmat lääkeaihiot on tutkittava lisäksi elävässä eläimessä.

eläinten määrän vähentäminen: 1) Käytettävät menetelmät ovat tieteellisen kirjallisuuden perusteella validoituja, mikä odotettavasti vähentää turhia toistoja ja siten käytettäviä eläinmääriä. 2) Olemme käyttäneet in vivo -kuvantamismenetelmää jossa samaa eläintä seurataan eri aikapisteissä regeneraation aikana, mikä vähentää huomattavasti eläinmääriä jotka tarvitaan tilastollisesti merkittävien tulosten saamiseksi. 3) Olemme pyrkineet välttämään eläinten käyttöä pelkästään histologisiin analyyseihin. Aina kun se on ollut mahdollista, olemme käyttäneet käyttäytymiskokeista tulevia eläimiä histologisiin analyyseihin. Olemme käyttäneet suunniteltua vähemmän eläimiä, osin yllämainitusta syistä johtuen, osin taloudellisista syistä. Tulevissa kokeissa käytännön kokemuksemme auttaa varautumaan mahdollisiin komplikaatioihin mikä edistää eläinmäärien vähentämistä.

hyvinvoinnin parantaminen: 1) Kirurgisten toimenpiteiden yhteydessä ilmenevää kipua ja turvotusta lievitetään kipulääkityksellä ja steroidilääkityksellä, tarvittaessa jo ennen kirurgiaan ryhtymistä. Lisäksi eläinten toipumista edistetään käyttämällä pehmeää ja lämmittävää pesämateriaalia, lämmittävää alustaa ja nestemäistä ruokaa. 2) Olemme selvittäneet huolellisesti kirurgisten toimenpiteiden komplikaatioita; sen seurauksena olemme panostaneet steriileihin olosuhteisiin kirurgian yhteydessä, selvittäneet parhaiten soveltuvan anestesiamenetelmän ja mahdollisen opioidien aiheuttaman riskin anestesian ja kaularangan kirurgian yhteydessä. 3) 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. Käytämme näitä tietoja tulevien kokeiden suunnittelussa. 4) Kirjallisuuden mukaan eläinten pitäminen ryhmissä ja sosiaalinen vuorovaikutus edistävät paranemista eri taudissa. Aina kun se on mahdollista, pyrimme käyttämään ryhminä naarashiiriä pitkäaikaisissa kokeissa joihin liittyy kivuliasta kirurgiaa minkä jälkeen seuraa useita käyttäytymistestejä. Ryhminä pidetyt naarashiirit tappelevat harvoin, mikä on hyvin tärkeää kirurgiasta toipumisen ja käyttäytymistestien tulkinnan kannalta.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen. Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
1.b.1 Rose-Bengal aivo-halvausmalli, selkädin-injektiot, käyttäytymistestit	-	-	420/29	SV4/SV3	Rose-Bengal mallin mukaisen kirurgian jälkeen eläimillä oli kipua 1 päivän ajan ja varsin vähän motorisia ongelmia (sylinteritesti, pyörivällä tangolla pysyminen). Selkädininjektio aiheutti kipua lihashaavaan 1-2 päivää.	Kirurgian jälkeen toipuminen lämpimässä paikassa, nesteytettyä ruokaa, kipulääke ennen kirurgiaa ja 1-2 päivää sen jälkeen.
2.b.1 Kalloikkunan asentaminen ja selkädin-trauma	-	-	150/37	SV4/SV3	Kalloikkunan asentaminen aiheuttaa lyhytkestoisen, 1 päivän kestävä kivun; 10 eläimelle tehtiin selkädintrauma tai kontrollikirurgia ("sham surgery") mikä aiheutti kivun lihashaavaan 3-4 päivän ajan ja jossain määrin pysyvää toimintahäiriötä toiseen eturaajaan.	Kalloikkunan asentamisen jälkeen toipuminen lämpimässä paikassa, kostutettua ruokaa, kipulääke ennen kirurgiaa ja 1 päivä sen jälkeen. Traumakirurgian jälkeen toipuminen lämpimässä paikassa, kostutettua ruokaa, kipulääkkeitä, antibiootteja ja anti-inflammatorisia lääkkeitä 3-4 päivää kunnes paino alkaa nousta. Paino ja rakon toiminta tarkastettiin päivittäin viikon ajan.

2.a.1 Sel- käytimen hemisektio	-	-	525/28	SV4/SV3	Kipua 3-4 päivää ja pysyviä motorisia häiriöitä toisessa eturaajassa.	Traumakirurgian jälkeen toipuminen lämpimässä paikassa, kostutettua ruokaa, kipulääkkeitä, antibiootteja ja anti-inflammatorisia lääkkeitä 3-4 päivää kunnes paino alkaa nousta. Paino ja rakon toiminta tarkastettiin päivittäin viikon ajan.
2.a.3. Sel- käytimen hemisektio, intratekkaaliset lääke- aine- injektiot, käyttäytymistestit	-	-	525/206	SV4/SV4(21 hiirtä), SV1(7 hiirtä), SV3(178 hiirtä)	Tavallisesti eläimillä oli kipua 3-4 päivää ja pysyviä motorisia häiriöitä toisessa eturaajassa. Joillakin eläimillä oli liikkumisen estäviä motorisia häiriöitä molemmissa eturaajoissa, infektio tai hankalaa ihon raapimista, jolloin eläimet lopetettiin.	Traumakirurgian jälkeen toipuminen lämpimässä paikassa, kostutettua ruokaa, kipulääkkeitä, antibiootteja ja anti-inflammatorisia lääkkeitä 3-4 päivää kunnes paino alkaa nousta. Paino ja rakon toiminta tarkastettiin päivittäin viikon ajan. Eläimet joilla oli vakavia terveysongelmia lopetettiin.
2.a.3. Sel- käytimen hemi- kontuusio, intratekkaaliset lääke- aine- injektiot, käyttäytymistestit	-	-	3835/60	SV4/SV4(5 hiirtä), SV1(13 hiirtä), SV3(42 hiirtä)	Tavallisesti eläimillä oli kipua 3-4 päivää ja pysyviä motorisia häiriöitä toisessa eturaajassa. Joillakin eläimillä oli liikkumisen estäviä motorisia häiriöitä molemmissa eturaajoissa tai infektio, jolloin eläimet lopetettiin.	Traumakirurgian jälkeen toipuminen lämpimässä paikassa, kostutettua ruokaa, kipulääkkeitä, antibiootteja ja anti-inflammatorisia lääkkeitä 3-4 päivää kunnes paino alkaa nousta. Paino ja rakon toiminta tarkastettiin päivittäin viikon ajan. Eläimet joilla oli vakavia terveysongelmia lopetettiin eettisistä syistä.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Pesämateriaali	X	X	X	X
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	X
Totuttaminen	X	X	-	-
Kasvatus ryhmissä	-	X	-	-
Kipulääkkeet	X	X	-	X

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, [ks. EU-komission ohje ja esimerkki](#). Vastaa vain esitettyihin kysymyksiin. Tarkista, että vastauksesi ovat ymmärrettäviä myös lukijalle, jolla ei ole taustatietoja asiasta.

Hankkeen nimi	Ikääntymisen ja ko-morbiditeettien vaikutus aivohalvaukseen	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	aivohalvaus, Alzheimerin tauti, liitännäissairaus, lääkehoidot	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Tämän tutkimuksen tarkoitus on selvittää, miten ikä ja erilaiset liitännäissairaudet vaikuttavat aivohalvauksen lopputulemaan. Lisäksi tavoitteenamme on testata uusia novelleja hoitomuotoja aivohalvaukseen.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Aivoiskemia eli aivohalvaus on toiseksi yleisin kuolinsyy länsimaissa ja väestön ikääntyessä aivohalvausten lukumäärä kasvaa koko ajan. Yleisimmin ihmisillä aivohalvaus johtuu joko aivo- tai kaulavaltimoiden ahtautumisesta tai tukkeutumisesta. Tällä hetkellä ainoa saatavilla oleva hoito aivohalvaukseen on liuotushoito, joka on aloitettava alle 3h oireiden alkamisesta. Liuotushoidosta saatavat hyödyt ovat tutkimusten mukaan ristiriitaisia, entsyymaattinen trombolyysihoito ei sovellu kaikille ja voi aiheuttaa lisääntyneitä riskejä saada aivoverenvuoto. 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 tulehdusvasteen 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.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri, 6800; rotta 696 eläintä	

Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Kokeessa käytetyille eläimille aiheutetaan ihmisen aivohalvausta vastaava haitta ja patologiset muutokset. Tästä aiheutuu eläimille ihmisen aivohalvausta vastaava haitta. Tämä tarkoittaa aivovauriota sekä siitä johtuvia heikentyneitä motorisia toimintoja. Eläimet kykenevät kuitenkin syömään, juomaan ja liikkumaan leikkauksen jälkeen. Eläimet lopetetaan kokeen loppuun tai ennen kokeen loppua heti jos ne täyttävät lopetuskriteerit. Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Meillä on käytössämme useita erilaisia aivohalvauksen soluviljelmällejä, joissa testaamme 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 kudosleikkeistä saatavia tutkimustuloksia.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Ryhmällämme on käytössä vaihtoehtoisia in vitro -malleja, kuten kortikaalneuronien viljelmät, 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 merkitävät ryhmien väliset erot vielä saadaan näkyviin.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Hiiri koe-eläimeksi on valittu siksi, että käytettävissä olevat 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 aivohalvausleikkauksen jälkeen kahdesti päivässä ja niiden hoito on tehostettua. Hiiriä nesteytetään tarvittaessa sekä niille annetaan tarvittaessa jauhattua ruokaa. Eläimet, jotka eivät näytä toipumista, lopetetaan.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 30.1.2018, 2 versio 6.2.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

2. Millaista haittaa?

3. 3R-mahdollisuudet

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen.

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
1.Lääkeainehoitosten testaamisen aivohalvausmallissa	Hiiri Rotta	Tarkoitus oli tutkia uusien lääkeaineiden toimivuutta aivohalvauksessa sekä villityypin hiirissä/rotissa että joissain siirtogeenisissä/poistogeenisissä hiirissä. Lääkeaineita testattiin useassa eri aivohalvausmallissa. Näin löydettiin lääkkeitä, jotka toimivat eri malleissa ja siis todennäköisimmin myös kliinisessä käytössä. Käytetyt mallit toimivat oletetusti ja antoivat luotettavia tuloksia.	Hiiri 1986/1330 (luvulle siirretyt eläimet) Rotta 646/146	Arvioitu 4/ tosiasiallinen: Hiiri SV1 159 SV2 61 SV3 299 SV4 204 Rotta SV1 15 SV2 5 SV3 100 SV4 6 Edellämäinnotut eläimet löytyvät eläintietokannan tilastoista eli ovat lopetettuja	Osahankkeen vakavin haitta aiheutui iskemialeikkauksista ja riippuen käytettävästä mallista se oli joko kohtalainen (permanentti malli 3) tai vakava (transientti malli vakavuus 3 tai 4 riippuen ajasta, jonka suoni on ollut tukossa). Permanentissa mallissa leesio oli vain kortikaalinen ja se aiheutti eläimelle tunnottomuutta kontralateraalipuolen raajoihin. Eläimet alkoivat liikkua lähes normaalisti heti nukutuksesta herättyään ja pystyivät syömään ja juomaan heti, josta johtuen eläinten paino ei tippunut leikkauksen jälkeen. Vammat voitiin havaita lähinnä käyttäytymiskokeissa ja ne hävisivät 5-7 päivän kuluttua kokonaan.	Eläimet selvisivät leikkauksista keskimäärin hyvin. Kussakin mallissa tärkeää on, että operoiva henkilö osaa leikkaustekniikan hyvin, jolloin harjoitteluhiiret, joita ei herätetä anestesiasta, ovat tärkeässä osassa. Kun tekniikka osataan, kuolleisuus vähenee. Oikea leikkaustekniikka mahdollistaa myös kokeiden mahdollisimman hyvän toistettavuuden ja luotettavat tulokset. Permanentissa mallissa kuolleisuus on harjoittelun alussa yli 50 % mutta tekniikan kehittyessä päästään 0-10 %:iin. Eläimet eivät yleensä kuole, jos leikkausta tekevä ihminen ei tee virhettä. Kuolleisuus leikkauksen jälkeen on siis käytännössä 0%. Transientissa mallissa kuolleisuus on suurempi (10-20 %) ja toisinaan eläimiä kuolee myös leikkauksen jälkeisiin komplikaatioihin tai eläimiä joudutaan

			eläimiä. Loput edellisen sarakkeen eläimet ovat edelleen elossa.	Transientissa mallissa leesio ulottui striatumiin ja myös korteksiin, sitä laajemmalle mitä kauemmin iskemia kesti. Leikkaus aiheutti häiriöitä eläimen kontralateraali-puolen raajojen toiminnassa. Heti leikkauksen jälkeen eläimet saattoivat olla sen verran huonokuntoisia, että niille laitettiin veteen hienonnettua rehua ja juomavettä häkin pohjalle, jotta ne pystyisivät helpommin syömään. Eläimet eivät saaneet menettää yli 15 % painostaan tai ne lopetettiin. Niitä pidettiin myös lämpimässä heti leikkauksen jälkeen, sillä lämmönsäätely ei aina toiminut normaalisti. Transientissa mallissa haitat näkyvät jopa viikkojen-kuukausien ajan joissain käyttäytymisteissä. Haitta aiheutettiin kullekin eläimelle vain kerran ja eläimet toipuivat siitä vähitellen parempaan kuntoon, osassa malleista jopa lähes entiselleen. Osalle eläimistä injisoitiin lääkeaine suoraan aivoihin, mikä vaati toisen leikkauksen. Monesti se tehtiin kuitenkin iskemialeikkauksen yhteydessä. Eläimet toipuivat myös kahdesta leikkauksesta odotetun kaltaisesti, emmekä huomanneet merkitsevästi lisääntyntä kuolleisuutta.	lopettamaan lopetuskriteereiden mukaisesti. Postoperatiivisella hoidolla (lisälämpö ja hienonnettu rehu häkin pohjalla + eläinten tiheä seuranta) varmistettiin, että eläimet saivat parhaat mahdolliset eväät toipua leikkauksesta. Koska nämä toimenpiteet tehtiin rutini- nisti aina leikkauksen jälkeen, on vaikea esittää arviota miten paljon kuolleisuus olisi lisääntynyt ilman niitä. Kaikki mallit osataan nyt tehdä erinomaisesti ja leikkaukset on optimoitu niin, että saamme erot hyvin näkymään hakemuksessa lasketulla eläinmäärällä ja kokeisiin voidaan varata vain tarvittava määrä eläimiä. Johtuen ryhmän henkilökunnan vaihtuvuudesta /vaihtovuosista ulkomaille /valmistumisista ym. syistä uusille henkilöille joudutaan opettamaan leikkauksia, joten harjoituseläimiä tarvitaan myös uuteen lupaan. Suuresta osasta eläimiä otettiin talteen myös perifeerisiä kudoksia joko eri protokollien optimointiin tai toisten tutkimusten tarpeisiin ja näin saatiin hyödynnettyä eläimiä paremmin.
--	--	--	---	---	---

2.Lää- keahoito- jen testaami- nen uusissa, paremmin ih- misen taudin- kuvaa mallin- tavissa aivo- halvausmal- leissa ja aivo- halvauksen liitännäissai- rausmalleissa	Hiiri	Tavoitteena oli kehittää paremmin ihmisen aivohalvausta vastaavia eläinmalleja käyttämällä vanhoja hiiriä ja ottamalla mukaan komorbiditeetteja, kuten systeeminen inflammatio, korkeakolesterolinen ruokavalio, diabetes tai AD-patologia ja tekemällä eläimille iskemialeikkaus. Kukin näistä hiirimalleista vastaa todellisuutta paremmin, kuin pelkille nuorille hiirille tehty aivoiskemia.	Hiiri 2632/17 64	Arvioitu 4/ tosiasialli- nen: Hiiri SV1 213 SV2 82 SV3 392 SV4 271 Jäljellejää- neet eläi- met ovat edelleen elossa.	Jälleen vakavin haitta oli iskemialeikkaus. Nuoret eläimet selvisivät leikkauksista hyvin (ks. Osa-hanke 1) mutta vanhoilla eläimillä kuolleisuus lisääntyi merkittävästi. Myös toipuminen oli hitaampaa ja huonompaa kuin nuorilla eläimillä, mikä saatiin näkymään myös käyttäytymistes-teissä. Permanentissa mallissa kuolleisuus nousi 10-20%:iin ja transien-tissa 10-30%:iin. Eläimiä kuoli enemmän sekä leikkauksen ai-kana, että sen jälkeen. Todennä-köisesti näiden mallien avulla saa-daan aikaan paremmin ihmisten aivohalvausta vastaava tilanne ja tämä voi parantaa tulosten sovel-lettavuutta kliinisiin tutkimuksiin, mikä osaltaan saattaa tulevaisuu- dessa vähentää tarvittavien eläin-kokeiden määrää.	Vanhoja hiiriä käytettäessä täytyy mu- kaan laskea hiirten mahdollinen lisään- tynyt kuolleisuus jo ennen leikkausta. Lisäksi hiirten toipuminen oli huomatta- vasti hitaampaa ja osa ei selvinnyt leik- kauksista ollenkaan. Toisaalta tulokset todennäköisesti vastaavat paremmin ihmisten aivohalvauksen tilannetta, jol- loin tuloksiin esim. lääkaineen vaiku- tuksesta voi luottaa paremmin kuin nuorilla terveillä hiirillä tehdyistä ko- keista saatuihin tuloksiin. Näiden tulos- ten perusteella voidaan tulevaisuu- dessa valita toimivin malli, jolloin huoli- matta hieman suuremmasta kuolleisuu- desta, tutkimukset tehostuvat.
3. Aivojen in- flammaatio- vasteen mer- kitys lää- keahoitoi- doissa.	Hiiri Rotta	Tavoitteena oli selvittää eri lääkeaineiden aiheuttamaa neuroin- flammaatiota ilman varsinaista aivohal- vausta. Tavoitteet ovat onnistuneet ilman suu- rempia ongelmia.	220/147 100/23	Arvioitu 3/ tosiasialli- nen: Hiiri SV1 17 SV2 6 SV3 32 Rotta SV1 2 SV2 1 SV3 20	Suurin haitta tuli i.c.v.-annoste- lusta, jossa lääkeaine injisointiin aivoihin kalloon poratun reiän kautta. Tämä ei aiheuttanut eläi- mille pysyvää haittaa ja ne toipui- vat nopeasti. Kuolleisuutta ei ol- lut.	-

4. Tulehdusreaktiosolujen rooli aivohalvauksessa	Hiiri	Tavoitteena oli selvittää eri solujen rooli aivohalvauksen tulehdusreaktiossa joko poistamalla perna, mikrogliasolut tai käyttämällä ki-meerahiiriä, jotka ekspressoivat GFP:tä luuytimen soluissa.	914/613	Arvioitu 4/tosiasiallinen: Hiiri SV1 72 SV2 27 SV3 135 SV4 86	Suurin haitta tuli jälleen aivohalvausleikkauksista käytetystä mallista riippuen. Hiiret, joilta poistettiin perna, joutuivat käymään läpi kaksi leikkausta mutta leikkauksien välillä hiiret saivat rauhassa toipua. Hiiret olivat nuoria ja terveitä joten yllätyksiä kuolleisuudessa ei tullut (ks. osahanke 1).	Ks. osahanke 1.
5. Soluvälitteinen terapia aivohalvauksessa	Hiiri	Tavoitteena oli selvittää mahdollisuuksia käyttäen ihmisen kantasoluja hoitona aivohalvauksessa immunosuppressoituilla hiirillä joko ilman lääkettä tai sen kanssa.	448/300	Arvioitu 4/tosiasiallinen: Hiiri SV1 38 SV2 14 SV3 74 SV4 46	Suurin haitta tuli jälleen aivohalvausleikkauksista käytetystä mallista riippuen. Lääkkeen anto/kantasolujen injisointi tehtiin suoraan aivoihin mutta hiiret toipuivat ilman yllätyksiä kuolleisuudessa (Ks. osahanke 1).	Ks. osahanke 1.
6. Aivojen kuvannus kaksoisfotonilaitteistolla	Hiiri	Tavoitteena oli kuvata elävän hiiren aivoja kaksoisfotonimikroskoopilla aivohalvauksen jälkeen. Olemme saaneet kraniaali-ikkunaleikkaukset onnistumaan mutta emme ole vielä päässeet tilanteeseen, jossa samoille hiirille aiheutettaisiin myös aivohalvaus.	370/248	Arvioitu 4/tosiasiallinen: Hiiri SV2 17 SV3 53 SV4 33	Vakavin haitta tuli kraniaali-ikkunaleikkauksesta, jossa joudutaan poraamaan kalloon reikä. Leikkauksen onnistuessa hiiret toipuvat siitä hyvin ja varsinainen kuvannus, tehdään vasta viikkojen päästä leikkauksesta.	Myös tässä osahankkeessa oikea leikkaustekniikka on tärkeä, jotta eläimelle aiheutuisi mahdollisimman vähän kipua ja jotta ikkuna pysyisi läpinäkyvänä. Joskus kaikesta huolimatta ikkuna jää sameaksi, joten hiiriä pitää leikata jonkin verran ylimääräisiä. Oikean tekniikan harjoitteluun täytyy varata eläimiä. Koska tässä mallissa hiirille annetaan aikaa toipua useita viikkoja ennen varsinaisia kokeita, kipulääkitystä voidaan käyttää. Hiirille, joilla on kraniaali-ikkuna ja pidike, jolla hiiri kiinnitetään mikroskooppiin, täytyy pesämateriaaliksi laittaa silppua, jottei pidike tartu siihen.

7.Lääkeaineiden kulkeutuminen aivoihin	Hiiri	Tavoitteena oli tutkia lääkeaineiden kulkeutusta veriaivoesteen läpi.	230/154	Arvioitu 4/tosiasiallinen: Hiiri SV1 46 SV2 7 SV3 37 SV4 23	Ks. Osahankkeet 1 ja 2. Osalla eläimistä tutkittiin vain lääkeaineen kulkeutumista terminaalianestesiassa. Osalle aiheutettiin aivohalvaus ja tämän jälkeen terminaalianestesiassa katsottiin lääkeaineiden kulkeutumista.	Ks. Osahankkeet 1 ja 2
--	-------	---	---------	--	--	------------------------

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Hyvät leikkaustekniikat	X	X	X	X
Pesämateriaali	X	X	X	X
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	X
Totuttaminen	X	X	X	X

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, [ks. EU-komission ohje ja esimerkki](#). Vastaa vain esitettyihin kysymyksiin. Tarkista, että vastauksesi ovat ymmärrettäviä myös lukijalle, jolla ei ole taustatietoja asiasta.

Hankkeen nimi	Lääkeaineen tehon testaaminen Alzheimerin taudin transgeenissä hiirimallissa	
Hankeluvan kesto	Kolme vuotta	
Avainsanat	Alzheimerin tauti, transgeeninen hiiri, prekliininen lääkeaine-tutkimus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope-tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie-teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Alzheimerini taudin hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lääkehoitoja. Alzheimerin taudista aiheutuu potilaille hyvin vakavia oireita ja kärsimystä sekä yhteiskunnalle huomattavia kustan-nuksia. Yritys tarjoaa lääkekehitysteollisuudelle in vivo -eläin-malleja lupaavien lääkeaineiden prekliiniseen testaukseen sai-rauksissa, joihin ei ole olemassa hoitomuotoja. Tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä klinisiin kokeisiin.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi-vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja Al-zheimerin tautiin. Tutkimusmallien käyttö edistää myös geeni-virheiden mekanismien ja vaikutusten ymmärtämistä eri sai-rauksissa, mikä edesauttaa uusien lääkkeiden ja lääkehoito-muotojen kehittämistä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin-määrät	Hiiri, 3600 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi-oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Tutkimuksessa käytetään kolmea eri Alzheimerin taudin trans-geenistä hiirikantaa joille kehittyy ikääntymisen aikana muisti- ja oppimisvaikeuksia sekä Alzheimerin taudin kaltaisia patologi-sia muutoksia aivoissa. Tutkimuksessa eläinten annetaan van-hentua siten, että osalle voi kehittyä halvaantumisoireita. Hait-taa aiheutuu myös käyttäytymistesteistä, toistuvasta tutkitta-vien lääkeaineiden annosta ja kuvantamisista. Vakavuusluokat: vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	In vitro -mallit ovat hyvin rajalliset johtuen koko eliön elimistön fysiologisten ja anatomisten ulottuvuuksien puuttumisesta mal-linnettaessa kutakin sairautta in vitro olosuhteissa. Uusien lääk-keiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen klinisiä 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 tutkimusten suunnittelussa ja ennustamisessa.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Koeasetelmat on standardoituja ja niiden käytön pohjana on perusteellinen mallien validointityö. Kunkin geneettisen mallin taustalla on ihmissairautta oleellisin osin mallintava eläinmallin ilmiä, jonka tulee olla perinnöllisesti relevantti ja oireistoltaan /patologialtaan ihmissairautta kuvaava. Perusteellisella validointityöllä varmistetaan että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ja antaa oikeanlaisen taudinkuvan. Koeasetelmissa ryhmän sisäinen variaatio minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määrittelee tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi) ja joka määrittää koe-eläinten käytön määrän kussakin koeasetelmassa.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Suuri osa keskushermostollisten kehityssairauksien eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille lääkkeille (jos on) ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Alemmilla selkärangaisilla 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.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 4.5.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja Alzheimerin tautiin. Tutkimusmallien käyttö edistää myös geenivirheiden mekanismien ja vaikutusten ymmärtämistä eri sairauksissa, mikä edesauttaa uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.

Tehotutkimuksissa selvitettiin lääkeaineiden vaikutusta eläinten käyttäytymiseen ja motorisiin toimintoihin sekä aivojen rakenteisiin ja niiden toimintaan. Tehotutkimusten lisäksi tutkittiin lääkeaineiden pitouksia lääkehoidon jälkeen eläimiltä otetuista veri- ja kudospäätteistä.

- Toimenpiteet: lääkintä, käyttäytymistestit, aivojen kuvantaminen, lopetus ja näytteenkeruu

2. Millaista haittaa?

Tutkimuksessa käytettiin kolmea eri transgeenistä hiirikantaa. Ainoastaan yhdellä kolmesta kannasta havaittiin itse kantaan liittyviä hyvinvointiongelmia (halvaantumisoireet). Muuten haitat liittyivät tutkimusten toimenpiteisiin kuten lääkintään, testauksiin ja kuvantamismittauksiin. Sen lisäksi yhdessä tutkimuk-

sessä eläimiä käsiteltiin muutosluvassa esitetyllä neurotoksiinilla. Nämä eläimet kuuluivat vakavuusluokkaan vakava. Kokonaisuutena eläimistä suurimman osan vakavuusluokka ei kuitenkaan sijoittunut luokkaan vakava, kuten oli esitetty lupapäätöksessä lautakunnan arviossa vakavuusluokasta.

Hankkeessa käytettiin yhteensä 1498 hiirtä. Eläimiä jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella 32 kpl ja kuolleena löydettiin 31 kpl. Suurin osa lopetetuista tai kuolleena löydettyistä hiiristä (17 kpl) oli juuri tutkimuksesta, jossa käytettiin muutosluvassa käytettyä neurotoksiinia. Seuraavaksi suurin ryhmä ennen aikaisesti lopetetuista hiiristä olivat halvaantumisoireiden perusteella lopetetut hiiret (10 kpl), jotka olivat kaikki yhdestä tutkimuksesta

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Erityistä aiheutettuun haittaan liittyen: esim. satunnainen / toistuva, saatu vähenemään/ loppumaan 3R-keinoin	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa?
Tehokokeet	Hiiri	Tutkimusmalli soveltuu tähän tutkimukseen (+). Validaatiotutkimuksissa saatu uusi malli validoitua ja tulosten pohjalta otettu malli asiakastutkimuskäyttöön (+). Tutkimuksen tavoitteet palveluntarjoajan näkökulmasta saavutettiin: Asiakastutkimus suoritettu protokollan mukaisesti (+). Tutkimustulokset lähetetty asiakkaalle protokollan mukaisesti (+).	arvioitu 3600 / käytetty 1494 hiirtä	Vakava-146, Kohtalainen-962, Lievä-354, Ei toipumista-32	Yhdellä kolmesta käytetystä transgeenisestä kannasta havaittiin kirjallisuuden perusteella raportoituja halvaantumisoireita; osa eläimistä piti lopettaa näiden oireiden perusteella. Hankkeessa suoritettiin yksi tutkimus, jossa osalle eläimistä annosteltiin neurotoksiinia pitkäaikaisessa seurannassa. Tässä kohteessa havaittiin ennen aikaista kuolleisuutta neurotoksiiniryhmässä erityisesti lääkettä saaneissa eläimissä.	Halvaantumisoireiden perusteella eläin lopetettu aikaisessa vaiheessa.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	X	X	X	-
Riittävä koulutus ja perehdytys	X	X	X	-
Validaatiot ja pilotointi	X	X	-	-

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ : Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, ks. EU-komission ohje ja esimerkki. Vastaa vain esitettyihin kysymyksiin. Tarkista, että vastauksesi ovat ymmärrettäviä myös lukijalle, jolla ei ole taustatietoja asiasta.

Hankkeen nimi	Proteaasi furin immuunivasteen säätelijänä	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	hiiri, immunitaatti, T-solu, myeloinen solu	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Immuunijärjestelmän solujen toiminnan säätelyn häiriytyminen saa aikaan esimerkiksi allergian, immuunipuutoksen tai autoim- muuni-taudin kaltaisia tautitiloja. Proteaasi furin säätelee T-so- lujen aktivaatiota ja sytokiinituotantoa, joten sen toiminnan häiriöt voivat vaikuttaa näiden tautitilojen syntyyn. Furinilla saattaa olla merkitystä myös immuunijärjestelmän solujen ke- hityksessä. Hankkeen tavoite on saada arvokasta lisätietoa puo- lustusjärjestelmän solujen toiminnan ja kehityksen säätelystä ja luoda siten pohjaa uusien diagnostisten markkereiden ja lääk- keiden kehitystyölle.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Kokeista saatavat tulokset auttavat ymmärtämään immuu- nivasteen toimintaa ja immunologisia häiriöitä. Furinin merki- tyksen selvittäminen immuunijärjestelmässä on tärkeää, kun arvioidaan furin-inhibiittorien mahdollista käyttöä syöpä- ja tu- lehduslääkkeinä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri 6350 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Furin-T-solupuutteiset hiiret sairastuvat autoimmunitaettiin ja suolistotulehdukseen noin puolen vuoden iässä. Suolistotuleh- dus ilmenee hiirten painonlaskuna sekä ripulina. Immuunijär- jestelmän aktivaatiokokeessa kemiallinen tulehduksen in- dusointi voi aiheuttaa vakavaa huonovointisuutta, joka johtaa eläimen lopettamiseen. Kokeen jälkeen eläimet lopetetaan. Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Puolustusjärjestelmän solut muodostavat kehittyessään ja toi- minnassaan eliössä verkoston, jossa eri solutyypit säätelevät toistensa toimintaa eritettävien kasvutekijöiden ja solujen välis- ten kontaktien avulla. Yksittäisen immuunivasteen solutyypin tutkiminen soluviljelmissä ei siten täydellisesti vastaa kokonai- sen eliön immuunihomeostaasin tilannetta. Immuunivasteen	

	tutkiminen luonnollisessa ympäristössä on välttämätöntä, jotta ymmärtäisimme paremmin puolustusjärjestelmän toimintaa esimerkiksi autoimmuunitautien tai immuunipuutostilojen synnyssä ja immuunipuolustuksessa patogeeneja vastaan.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	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 banaanikärpäsiä siltä osin kuin se on mahdollista.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a 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 autoimmuuniteettiin. Toimenpiteiden määrä rajoitetaan minimiin, suurin osa käytettävistä eläimistä ainoastaan lopetetaan kudosten talteenottoa varten. Toimenpiteet tehdään niin että niistä aiheutuu mahdollisimman vähän haittaa eläimille.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN
Saapumispvm: 12.2.2018, tarkennukset 29.5.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

- Hankkeen tavoitteena on saada arvokasta lisätietoa puolustusjärjestelmän solujen toiminnan ja kehityksen säätelystä ja luoda pohjaa uusien diagnostisten markkereiden ja lääkkeiden kehitystyölle. Tässä hankkeessa keskityttiin erityisesti proteaasi FURINin toiminnan selvittämiseen T solujen (Cd4cre) sekä makrofaagien ja neutrofiilien (Lysmcree) toiminnassa.
- kyseessä on pitkäjänteinen työ, joka on Suomessa aloitettu 2009. Työ jatkuu edelleen, useita osatavoitteita on jo saavutettu, mistä osoituksena tieteelliset julkaisut.
- Kaikkia hankeluvassa kuvattuja osatöitä ei ole päästy aloittamaan yliopiston lähes 2v jatkuneen eläintilaremontin vuoksi.
- käytetyt eläinmallit soveltuvat tähän tutkimukseen erinomaisesti. Sekä cd4cre furin KO että lysmcree furin KO hiirissä kohdemolekyylä (furin) on deletoitunut tehokkaasti toivotuissa soluissa, eikä hiirillä ole genotyyppistä johtuvia hyvinvointiongelmia ensimmäisten elinkautensa aikana.
- Koska hiiri on nisäkä ja paljon käytetty koe-eläinmalli (tietämys, reagenssit), saadaan sen immunologian tutkimisesta parhaiten tietoa myös ihmisen immuunivasteesta koko organismin tasolla
- Hankeaikana ei tehty luvassa kuvattuja in vivo -kokeita.

Yksityiskohtaisempi tavoitteiden arviointi osahankkeittain:

Osahanke 1:

Olemme kuvanneet mm. FURINin säätelevän auttaja T solujen polarisaatio tapahtumia ja T soluaktivaatiota, ja siihen liittyvää geeniekspressiota. Jatkamme edelleen eri T solualatyyppeiden (mm. CD8+ CTL solut, erilaiset muistisolut) analysointia.

Osahanke 2:

Osoitimme, että makrofaagien FURIN entsyymi hillitsee tulehdusta kiihdyttävien sytokiinin tuotantoa, ja parantaa selviytymistä LPS-indusoidussa sepsis mallissa tulehduksen akuutissa vaiheessa (eläinkoe toteutettiin edellisen luvan aikana). Jatkossa selvitämme FURINin merkitystä makrofaagien polarisaatio tapahtumissa sekä neutrofiilien toiminnassa.

2. Millaista haittaa?

Osahanke 1 (CD4cre-furin KO hiiret)

-hiiriä käytettiin ainoastaan kantojen ylläpitoon ja lopetetuilta hiiriltä kerättiin kudoksia *in vitro* -kokeisiin, eikä mitään hankeluvassa kuvatuista *in vivo* -kokeista ole tehty. Syy: eläintilojen toimintakatkos.

-ikääntyneillä T-solu furin KO hiirillä ilmeni toisinaan genotyypistä johtuvia hyvinvointiongelmia (systeeminen autoimmuunitauti, mm. laihtuminen, ripuli) aikaisemmin kuin hankeluvassa oli arvioitu (4 kk). Kaikki sairastuneet hiiret lopetettiin hankeluvassa kuvattujen kriteerien täytyttyä. Kts. taulukosta hiirimäärät ja hyvinvointiongelmien.

Osahanke 2 (LysMCre-furin KO hiiret)

-Hiiriä käytettiin ainoastaan kantojen ylläpitoon ja lopetetuilta hiiriltä kerättiin kudoksia *in vitro* -kokeisiin, eikä mitään hankeluvassa kuvatuista *in vivo* -kokeista ole tehty. Syy: eläintilojen toimintakatkos, osa *in vivo* kokeista on tehty ennen nykyisen hankeluvan alkua, aikaisemman luvan puitteissa.

-Subletaali LPS injektiot on tehty edellisten eläinkoelupiemme aikana. Zymosania ei ole vielä milloinkaan hiiriin pistetty (ei letaali tai subletaaliannoksia).

-sisällytämme letaalikokeen ja subletaalikokeen myös uuteen hakemukseen, koska niitä ei olla tehty zymosan-käsittelyllä, eikä kaikkia solutyyppisiä ole vielä pystytty analysoimaan edellisissä kokeissa.

-tämän hankeluvan aikana ei tehty kohdassa 6.3. esiin otettua letaalikoetta. Ainoat letaalikokeet lysmcre hiirillä (LPS-injektio) on tehty edellisten hankelupien aikana vuonna 2012. Näiden kokeiden arvio on kuvattu nyt yksityiskohtaisesti kohdassa "muuta".

3. 3R-mahdollisuudet

-olemme kehittäneet uusia furin puutteisia t solu ja makrofagi-solumalleja, joilla on voitu osin korvata osa (*in vitro*, *ex vivo*) eläinkokeista (replacement&reduction).

-Olemme käyttäneet kemiallisia furin-inhibiittoreita soluviljelyolosuhteissa vähentääksemme eläinkokeiden (*in vitro*, *ex vivo*) tarvetta (replacement&reduction).

-olemme käyttäneet banaani-kärsämallia korvataksemme vähentääksemme hiirieläinkoetarvetta (refinement, replacement)

-olemme lopettaneet furin T solu hiiret pääsääntöisesti ennen autoimmuunitietin kehittymistä (alle 4kk, refinement)

-lopetetuista eläimistä on kerätty talteen useita eri kudoksia, seerumia, ulostenäytteitä ja nämä on pakastettu jatkoanalyysia varten, tämä saattaa vähentää tulevaisuuden eläinmääriä (reduction)

- olemme aikaistaneet inhimillisiä lopetuspisteitä letaalikokeessa (refinement, vuonna 2012, kts muuta kohta)
- käytetyt eläinmäärät ovat olleet huomattavasti suunniteltua alemmat, pääasiassa eläinkoetilan remontin ja vaihtoehtoisten mallien käytön vuoksi (reduction).
- uudessa eläinkoeluvassa on haettu käytettäväksi samaa eläinmäärää kuin v. 2015 luvassa. Tämä siksi, koska suurin osa suunnitelluissa koejärjestelyistä on edelleen tekemättä eläintilan remontin vuoksi.
- hiiren immuunijärjestelmä on hyvin karakterisoitu ja lisäksi se nisäkkäänä muistuttaa ihmisen immuunijärjestelmää. Hiirissä furin-geenin toiminta voidaan estää kudosspesifisesti cre-loxp teknologian avulla. Em. seikkojen vuoksi hiiressä tehtäviä eläinkokeita ei voida täysin koskaan korvata vaihtoehtoisilla malleilla.
- Lukuun ottamatta uusia FURIN-puutteisia solulinjoja, emme ole keksineet uusia 3R-keinoja joilla voisi olla laajempaa hyödynnettävyyttä.

Muuta

Kohdassa 6.3 pyydetyn letaaliyksperimentin (osahanke 2) arvio vuonna 2012 tehtyjen kokeiden perusteella:

The experiment was performed twice on 10.9.2012 (pilot) and 13.11.2012. For the second experiment, Eight WT and Eight KO (6-8 weeks) male mice were weighed. Next, they were anesthetized using gaseous anesthetic (ether) inside of a chemical fume hood. Finally the mice were one time intraperitoneally injected with 25 mg/kg dose of LPS (0111:B4) (the diluent used for the injection was NaCl 0.9%). The mice were monitored for three days for the following symptoms: lethargy, diarrhea, tachypnea, piloerection, and conjunctivitis. The symptoms were classified in Low, Moderate and High according to the number and intensity of the symptoms observed in the mice. Only the mice displaying low and moderate symptoms were kept until the end of the experiment. Five KO mice and two WT mice died during the first 24h (acute phase). Two KO mice and three WT mice classified as High were euthanized (CO2 euthanasia chamber) before the end of the experiment. After three days the mice that survived were euthanized in a CO2 euthanasia chamber.

Note: All the mice deceased before 24 h were dissected to exclude internal bleeding as cause of death due to injection failure. None of the animal displayed signs of internal bleeding.

Johtopäätös: kaikki vakavaa haittaa kokeneet hiiret lopetettiin välittömästi kriteerien täytyttyä, vakavan haitan kesto korkeintaan tunteja (tarkkailu ensimmäisen 24h aikana 2h välein, sen jälkeen 12h välein). Kohtalaisen haitan kesto korkeintaan 3 vuorokautta. Kokeessa ei tullut odottamattomia haittoja esiin.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
1	hiiri	+	5150/689	Arvioitu: Kohtalainen, lievä. Tosiasiallinen (15 kpl): 2kpl vakava, 2kpl lievä, 11 ei haittaa.	Hiirille ei tehty luvassa kuvattuja <i>in vivo</i> toimenpiteitä. Todennäköisesti hiirten oireiden taustalla ovat olleet ympäristötekijät ja genotyypistä aiheutuva autoimmuuniteetti ikääntyessä. Oireet tyypillisesti eri asteinen laihtuminen, ripuli, kuivuminen.	Tehostamme hiirten seuranta saadessamme ne yliopistolle: mikäli autoimmuuniteettiä kehittyy toistuvasti aikaisemmin kuin oletettu (4kk), aikaisamme lopetusajankohtaa. 3R: luomme uusia furin puutteisia solulinjoja ja käytämme inhibiittoreita soluviljelyssä, käytämme tarvittaessa kokeissa banaani-kärpäsiä, pidämme eksperimenttien koot mahdollisimman pienenä, seuraamme hiirten hyvinvointia.
2	hiiri	+	1200/805	Arvioitu: kohtalainen, vakava. Tosiasiallinen (7 kpl) 4kpl vakava, 3 kpl ei haittaa.	Hiirille ei tehty luvassa kuvattuja <i>in vivo</i> toimenpiteitä. Genotyypistä ei ole osoitettu aiheutuvan hyvinvointiongelmia, todennäköisesti hyvinvointi ongelmien taustalla ovat olleet ympäristötekijät.	Tehostamme hiirten seuranta saadessamme ne yliopistolle. Mikäli hiirillä esiintyy toistuvasti hyvinvointiongelmia, pyrimme selvittämään niiden syyt. 3R: luomme uusia furin puutteisia solulinjoja ja käytämme inhibiittoreita soluviljelyssä, käytämme tarvittaessa kokeissa banaani-kärpäsiä, pidämme eksperimenttien koot mahdollisimman pienenä, seuraamme hiirten hyvinvointia

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoidessa
Aikaisempi päätepiste	X	X	-	-
Lyhyempi seuranta-aika	X	X	-	-
Pesämateriaali	X	X	X	X
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	X
Totuttaminen	X	X	-	-
Uudet furin-puutteiset solumallit	X	X	X	X

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, [ks. EU-komission ohje ja esimerkki](#). Vastaa vain esitettyihin kysymyksiin. Tarkista, että vastauksesi ovat ymmärrettäviä myös lukijalle, jolla ei ole taustatietoja asiasta.

Hankkeen nimi	Autoimmuunitaudin geenihoito herpesvirusvektoreilla	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	EAE, herpes simplex-virus, geenihoito, autoimmunitaetti	
Hankkeen tarkoitus	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
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Hanke kehittää geenihoitoa MS-taudin mallina tunnettuun EAE-autoimmuunitautiin. Käytämme herpes simplex-virukseen (HSV) pohjautuvia, heikennettyjä vektoreita viemään keskus-hermostoon EAE-tautia parantavia tai lieventäviä immunologisia molekyylejä (mm. Th2-sytokiinit ja kasvutekijät). Tässä hake- muksessa sana virus tarkoittaa heikennettyä geenivektoria, joka on luokiteltavissa biologiseksi lääkkeeksi. Elimistön vas- teita virusvektoreille selvitetään geenihoidon yhteydessä. Tut- kimuksessa kehitetään myös perifeeristä hoitovirusannostelua (nenän kautta annostelu) invasiivisten annostelujen sijasta. Työssä selvitetään HSV-tera- piavirusten vaikutusmekanismeja sekä niiden herättämiä im- muunivasteita, mikä edistää MS-taudin hoitojen kehitystä.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	MS-taudin ja sen hoidon tutkimukselle hankkeesta on hyötyä kokonaisuudessaan. Työssä saadaan myös tietoa geenihoidon virusvektorien pysyvyydestä ja niiden herättämistä immuunivasteista hermostossa, edistään geenihoidotutkimusten tur- vallisuutta.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri, 300 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu haittaa taudin indusointiin liittyvistä annos- teluista, virusvektoreiden annosta sekä kuvantamisista. Taka- raajahalvauksena ilmenevä EAE-tautimuoto korjaantuu hoita- mattomanakin asteittaisesti käytettävässä tautimallissa. Taudin enimmäisvaihe kestää n 1 viikon ajan, minkä jälkeen alkaa as- teittainen paraneminen myös hoitamattomilla eläimillä. Haitta kohdistuu etenkin geenihoitamattomiin EAE-vertailueläimiin. Eläimet lopetetaan kunkin kokeen päättyessä. Vakavuusluokat: vakava	

3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Immunologista sairautta ja sen immunologisesti vaikuttavaa hoitoa ei voida mallintaa riittävästi soluviljelmissä ja immunologista EAE-tautia ja sen hoitoa voidaan tutkia vain eläimessä. Työssä käyttämämme hiirikannat sopivat edustamaan immunologisesti eri tavoin reagoivia MS-potilaita. Organotyyppiset viljelymallit ja soluviljelyt ovat käytössämme geenihoidovirusten kehittämisessä jo siinä määrin kuin suinkin mahdollista. Virusvektorien biologiset ominaisuudet, mm. transgeenien toiminta ja vektorien replikaatio-ominaisuudet, on jo tutkittu soluviljelmissä. Varsinaisen EAE-hoitomallin tutkimusta ganglioviljelymalli ei korvaa.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Virusvektorien leviämisen dokumentaatioissa käytetään IVIS-in vivo-lusiferaasikuvantamista, jolloin tutkittavien eläinten määrää on voitu entisestään vähentää. Tilastollisten arviointien edellyttämät eläinmäärät on voitu rajata pienimpään mahdolliseen, perustuen aiempaan kokemukseen tällaisista hoitotutkimuksista.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Vaihtoehtoisina eläinmalleina tulisi kyseeseen korkeampien eläinlajien käyttö, jota pyrimme välttämään. Hiirtä alemmalla lajilla ei voida EAE-tautimallia saada aikaan. b) Hiirimallilla voidaan saavuttaa tilastollisen merkittävyyden edellyttämä riittävä rinnakkaisten havaintojen lukumäärä. EAE-hiirimalli edustaa ihmisen MS-tautia ja toimii MS-hoitotutkimusten kokeellisena mallina. c) Toimenpiteiden yhteydessä käytetään anestesiaa ja kipulääkitystä. Geenihoidamattomia EAE-vertailuhiiriä käytetään pienin riittävä määrä. EAE-taudin aikana hiirille annetaan kostutettua ravintoa ja niitä seurataan tiheästi, juomisen ja ravitsemuksen varmistamiseksi. Odottamattomassa vakavassa tautitilassa eläin lopetetaan heti.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 9.11.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeessa voitiin toteuttaa tavoitteista hankkeen alkuvaiheen tavoitteet, mutta ulkopuolisen hankerahoituksen vähennyttyä ja päätyttyä alkuvaiheen jälkeen, tutkimus jäi pienimuotoiseksi ja vain alkuvaihe voitiin toteuttaa. Alkuperäisiä kokonaistavoitteita ei voitu tavoitella eikä saavuttaa, eikä niitä varten myöskään käytetty eläimiä tai tehty eläinkokeita.

Hankkeen alkuvaiheen tavoitteet täyttyivät varsin hyvin, sillä kokeessa pystyttiin ottamaan käyttöön ja validoimaan tarkoituksenmukainen EAE-tautimalli-induktio käyttäen kaupallista, standardoitua antigeenituotetta (Hooke Laboratories, PLP-antigeenikitti). Tällä indusoidussa EAE-tautimallissa tapahtuneet immunologiset ilmiöt eläinten kudoksissa tutkittiin ja todennettiin lopetettujen hiirten kudoksenäytteistä laboratorioanalyysillä, mm. PCR- ja flowsytometriatesteillä.

Havainto edistää korvaamisen, vähentämisen ja parantamisen periaatetta, sillä nyt on tiedossa standardoitu menettely EAE-induktiolle kyseisessä hiirikannassa, ja taudin profiili sekä vakavuusaste ovat nyt täysin ennakoitavissa, eikä EAE-induktion optimoimiseen tarvitse käyttää eläimiä.

2. Millaista haittaa?

Hankelupapäätöksen mukaan takautuvassa arvioinnissa tulee kertoa, kuinka moni eläin lopetettiin ko-
keessa lopetuskriteerien perusteella, kuinka monelle eläimelle kehittyi astetta 3.5 oleva halvaus ja miten
nopeasti siitä toivuttiin.

Hankkeessa käytettiin hiiriä, SJL-kanta CrHSD, naaraita. Lukumäärä 30 kpl.

Tutkimuksessa käytetyn EAE-tautimallin vakavuusasteet:

Yhdellekään eläimelle ei kehittynyt vakavuusastetta 3.5 tai korkeampiasteista halvausta.

Lopetuskriteerien perusteella yhtäkään eläintä ei tullut lopetettavaksi, vaan lopetukset tapahtuivat ko-
keeseen suunniteltujen ajankohtien mukaisesti.

Vakavuusastetta 3 esiintyi 4 eri hiirellä, kestoaltaan kahdella 1 pv ajan ja kahdella 2 pv ajan.

Vakavuusastetta 2.75 esiintyi 3 eri hiirellä; kullakin 1 pv ajan.

Muilla vakavuusasteet olivat välillä 1-2.5, viisiportaisella asteikolla. Astetta 2.5 esiintyi enintään 2-3 päi-
vän ajan kullakin yksilöllä.

Toipuminen tapahtui tyypillisesti hyvin nopeasti, niin että astetta 2.75-3 olevan hiiret toipuivat 1-2 vuoro-
kaudessa ja viiden vuorokauden kuluessa taudinaste oli alle 2 eli enintään hännän velttoutta voitiin ha-
vaita.

3. 3R-mahdollisuudet

Havainto edisti korvaamisen, vähentämisen ja parantamisen periaatetta, sillä nyt on tiedossa standar-
doitu menettely EAE-induktiolle kyseisessä hiirikannassa, ja taudin profiili sekä vakavuusaste ovat nyt täy-
sin ennakoitavissa, eikä EAE-induktion optimoimiseen tarvitse käyttää eläimiä. Kaikki mahdolliset immu-
nologisesti relevantit kudosnäytteet oli otettu lopetuksen jälkeen laboratorioanalyysia varten, joten
enempien tietojen saaminen ei ole todennäköistä. Tutkimuksesta on vireillä tieteellisen julkaisun käsikir-
joitus, joka voidaan saattaa valmiiksi viimeistenkin laboratorioanalyysien valmistuttua, ja julkaistuna EAE-
induktion tiedot ovat jatkossa tiedeyhteisön käytettävissä.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
	Hiiri	+/- (ks edellä)	arvioitu 300, käytetty 30	Arvioitu: vakava tosiasiallinen: ks edellä ja alla; yksikään eläin ei saavuttanut vakavuusastetta 3.5 (asteikolla 0-5). Lopetuskriteerit eivät realisoituneet, vaan lopetukset suoritettiin koesuunnitelman mukaisesti. 564/2013 Liite 3:n mukaisesti vakavuus vertautui lähinnä kohdalaiseen asteeseen, ja kyseessä ei ollut kroonisen toistuvan hermotulehduksen malli.	Mallista aiheutunut, ohimenevä asteen 3 lievä takaraajahalvaus, kesto 1-2 vrk, esiintyi 4 hiirellä 30:stä.	Jatkossa ei tarvitse tutkia sopivaa EAE-induktiomallia, vaan validi malli tunnetaan nyt.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoidessa
Aikaisempi päätepiste	-	-	-	-
Lyhyempi seuranta-aika	-	-	-	-
Pesämateriaali	-	-	-	-
Lisälämpö operoinnin jälkeen	-	-	-	-
Totuttaminen	-	-	-	-
Validi menettely EAE:n induktioon	X	X	X	X

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen, ks. EU-komission ohje ja esimerkki. Vastaa vain esitettyihin kysymyksiin. Tarkista, että vastauksesi ovat ymmärrettäviä myös lukijalle, jolla ei ole taustatietoja asiasta.

Hankkeen nimi	Transgeenisten hiirilinjojen karakterisointi ja lääkeaihioiden tehon testaaminen tarkkaavaisuus-, oppimis- ja muistitoiminoissa kosketusnäyttöön perustuvissa testeissä	
Hankeluvan kesto	Kolme vuotta	
Avainsanat	kognitio, hiiri, prekliininen lääkeainetutkimus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Useissa sairauksissa kuten esim. Alzheimerin ja Parkinsonin tau- dissa ja skitsofreniassa käytössä olevat hoidot tehoavat huo- nosti tarkkaavaisuus-, muisti- ja oppimishäiriöihin. Prekliinisten eläinkokeiden tarkoituksena on edesauttaa mahdollisen ihmis- käyttöön soveltuvan lääkeaineen löytymistä ja sitä kautta hel- pottaa yksilön hyvinvointia ja tuoda yhteiskunnallista hyötyä.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Eläinkokeet ovat välttämättömiä uusien lääkeaineiden kehitys- työssä. Mahdolliset positiiviset tulokset edesauttavat tutkitta- van lääkeaineen etenemistä lääkekehitystyössä kliinisiin kokei- siin ja myöhemmin lääkkeeksi. Tutkimukset tuottavat myös uutta tietoa kosketusnäyttöön perustuvien tutkimusmenetel- mien soveltuvuudesta kognition testaamisessa hiirillä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri, 2 400 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Tutkimuksessa käytettävistä geenimuunnoksista aiheutuu vaka- via motorisia haittoja. Eläimet suorittavat kosketusnäyttöön pe- rustuvassa laitteistossa (TouchScreen apparatus) oppimis- ja muistitestejä. Testeistä ei aiheudu kipua tai merkittävää muuta haittaa eläimille. Käytettävät lääkeaihiot annetaan eläimille yleensä injektioina, mistä aiheutuu vain lievää lyhytaikaista ki- pua tai haittaa. Eläinten motivaatiota tehtävien suorittamiseen lisätään rajoitetulla ruokinnalla ja ruokapalkinnolla. Käyttäyty- mistestien lisäksi eläimille voidaan suorittaa kuvantamismet- tauksia ja niiltä voidaan ottaa verinäytteitä. Eläimet lopetetaan tutkimusten loputtua. Vakavuusluokat: vakava	

3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Uusien lääkeaihioiden tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen klinisiä kokeita. In vitro ja in silico mallit tukevat ja voivat auttaa koe-eläin tutkimusten suunnittelussa ja ennustamisessa, mutta korkeampien aivotointojen häiriöitä ei pystytä mallintamaan korvaavilla menetelmillä.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Koeasetelmissa ryhmän sisäinen variaatio minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määrittelee tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi) ja joka määrittää koe-eläinten käytön määrän kussakin koeasetelmassa. Uusinta teknologiaa edustava kosketusnäyttölaitteisto mahdollistaa usean kognitiota mittaavan testin opettamisen eläimelle (eläintä voidaan käyttää useassa testissä), mikä vähentää merkittävästi hankkeessa tarvittavien eläinten määrää.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Suuri osa keskushermostollisten kehityssairauksien eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä. Jyrsijöissä havaitut taudin mekaniemit, vasteet nykyisille lääkkeille (jos on) ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaihion tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Alemmilla selkärangaisilla tai in vitro -menetelmin ei voida saada samanlaista tietoa uusien lääkeaihion tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole riittävästi tutkittuja, eivätkä yleisesti hyväksyttyjä ja käytettyjä.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumis pvm: 27.11.2018.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli karakterisoida eri transgeenisia hiirikantoja kosketusnäyttöön perustuvassa opimista ja muistia mittaavissa testimenetelmässä ja kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja eri neurodegeneratiivisiin ja psykiatrisiin tauteihin eli edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä klinisiin kokeisiin. Hiirikantojen karakterisoinnista saatiin merkittävää uutta tietoa kantojen soveltuvuudesta kosketusnäyttöpohjaisiin testeihin. Tutkimusmallit toimivat odotetusti ja niiden avulla voitiin arvioida luotettavasti testattujen lääkeainekandidaattien tehoa.

Oman validaatiotyön osalta saavutettiin myös tavoitteet: kehitettyjä menetelmiä ja tutkimusmalleja voidaan käyttää varsinaisessa lääkekehitystyössä yhdessä asiakkaiden kanssa. Käytettävät eläin- ja tutkimusmallit soveltuvat tähän tutkimukseen.

2. Millaista haittaa?

Hanke oli arvioitu vakavuusluokaltaan vakavaksi. Kokonaisuudessa hankkeessa käytettiin suunniteltuun nähden vähän eläimiä (267/2400 hiirtä).

Eläimille suoritettiin seuraavia toimenpiteitä: eläinten paastotus kosketusnäyttötestin ajan (85-95% normaalipainosta), eläinten lääkintä systeemisesti (kirurgisia menetelmiä vaativia lääkintätekniikoita ei käytetty), kosketusnäyttöttestaus testijakson ajan (maksimissaan n. 2 kk pituinen aika riippuen protokollasta), kuvantamismittaukset anestesiassa, verinäytteiden otto ja muut non-invasiiviset käyttäytymistestit. Tutkimuksessa ei käytetty transgeenisia hiirilinjoja, joilla esiintyy hyvinvointiongelmia tai motorisia haittoja. Kaikki toimenpiteet onnistuivat suunnitellusti eikä yllätyksiä havaittu. Eläimiä ei jouduttu lopettamaan lopetuskriteerien perusteella eikä eläimiä löydetty kuolleena. Koska tutkimuksessa ei käytetty hyvinvointiongelmia omaavia hiirikantoja, eläimille koituva tosiasiallinen haitta jäi vähäisemmäksi. Paaston takia tosiasiallinen vakavuusluokka arvioitu kaikille eläimille kohtalaiseksi.

3. 3R-mahdollisuudet

Hankkeiden suunnittelussa on otettu huomioon tutkimusmalleihin liittyvä aikaisempi tuotekehitystyö. Tuotekehitystyön pohjalta testiryhmien koko on pyritty minimoimaan samalla kuitenkin turvaten riittävä ryhmäkoko tilastollisen merkitsevyyden saamiseksi.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Osahanke 1	Hiiri	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja kokeista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lääkeainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti. Tutkimusmenetelmät kosketusnäyttöön perustuvalla laitteistolla käyttäen erilaisia hiirilinjoja pystytetty onnistuneesti.	Arvio: 2400 hiirtä Tosiasiallinen: 267 hiirtä	Arvio: vakava / tosiasiallinen: kohtalainen	Haitta odotettu vähäisempi, koska tutkimuksessa ei käytetty transgeenisia hiirilinjoja, joilla esiintyy motorisia ongelmia tai muita hyvinvointiongelmia. Vakavin haitta eläimille muodostui pitkästä seuranta-ajasta rajoitetulla ruokinnalla. Muut haitat odotusten mukaisia: lääkeaineen annostelu, kuvantamismittaukset, muut käyttäytymistestit, verinäytteet, lopetus.	Tutkimuksia suoritettu lupakaudella hyvin vähän. Testiryhmien koko pyritty minimoimaan aikaisempien tutkimustulosten pohjalta. Hankkeessa ei käytössä transgeenisia hiirilinjoja, joilla esiintyy motorisia ongelmia tai muita hyvinvointiongelmia. Hankkeessa ei käytetty kirurgisia menetelmiä vaativia lääkeaineiden annostelumenetelmiä. Eläinten huolellinen ja jatkuva painonseuranta.

Lautakunta pyysi selvittämään kuinka moni eläin jouduttiin lopettamaan ennenaikaisesti lopetuskriteerien perusteella. Näitä eläimiä ei hankkeessa ollut yhtään.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää.
ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportointaessa
Mallivalidaatio ryhmäkokoonalyysiä varten	x	x	x	-
Eläinten huolellinen ja jatkuva painonseuranta rajoitetun ruokinnan aikana.	x	x	x	x