

2019 – YLEISTAJUISET TIIVISTELMÄT JA TAKAUTUVAT ARVIOINNIT TUTKIMUS-HANKKEISTA, JOISTA LAUTAKUNTA ON MÄÄRÄNNYT TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TEHTÄVÄKSI HANKKEEN PÄÄTTYTTYÄ.

Hankkeet on hyväksytty vuosina 2014 – 2017. Hanke voi saada voimassaolon jatkoluvan perustelluista syistä, jolloin takautuva arviointi siirtyy jatkoluvan päättymisen ajankohtaan.

1

3. YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Täytettynä korkeintaan 1-2 sivun mittainen		
Hankkeen nimi	Tutkimus BLL-syndrooman patogeneesistä GM-hiirillä	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	geenivirhe, monielinsairaus, gm-hiiri	
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)	Tutkimuksessa pyritään selvittämään äskettäin Pohjois-Suo- mesta löytämämme aikaisemmin tuntemattoman taudin synty- misen syytä ehkäisyä (työnimi ”BLL-syndrooma”). Kyseessä on yhden geenin mutaation aiheuttama tauti, jonka olemme löytä- neet kolmelta lapselta. Oireet alkavat muutaman kuukauden iässä aikaisemmin terveellä, imeväisikäisellä lapsella. Lapsen ke- hitys taantuu, ja lapsi saa vakavia keskushermosto-oireita. Tä- män lisäksi lapselle kehittyy hengitysvaikeuksia ja muiden elin- ten toiminnan häiriöitä. Huolimatta aktiivisesta hoidosta, kaikki kolme lasta, jotka syntyivät kahteen perheeseen, menehtyivät kahden vuoden ikään mennessä. Ruumiinavausnäytteissä todet- tiin aivoja, keuhkoja, maksaa, suolistoa, aistinelimiä ja muita eli- miä vahingoittavia vaikea-asteisia muutoksia. Olemme tutkineet näiden kahden perheen sairaiden ja terveiden lasten ja terveiden vanhempien perimää yksityiskohtaisesti. Tutkimuksen pe- rusteella on löytynyt yhdestä erittäin huonosti tunnetusta gee- nistä kaksi geenimuutosta (mutaatio). Toinen periytyessään isältä ja toinen äidiltä on ilmeisesti aiheuttanut tämän vakavan taudin. Meillä on vahva syy epäillä että kyseessä on uusi, suoma- laiseen tautiperintöön kuuluva, piilevästi periytyvä tauti. Tutki- mukset ovat edelleen kesken (J. Uusimaa, et al. käsikirjoitus).	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Koska löytämämme tauti vaikuttaa dramaattisesti sitä sairasta- vien lasten ja perheiden elämänlaatuun ja koska tautia ei nyky- tiedon valossa voida ehkäistä, on tärkeää että sitä koskevat, tau- din syntyyn ja ehkäisyyn tähtäävät tutkimukset tehdään viipy- mättä. Eläinkokeen tarkoituksena on selvittää BLL-syndrooman syntymismekanismeja, ehkäisyä ja ennakointia. Tällä on suuri	

	merkitys perheille, joissa tautia esiintyy. Saatujen tulosten avulla pyritään vähentämään kuolleisuutta ja parantamaan elämän laatua. Tutkimusprojekti tuottaa perustietoa geenistä, jonka elintoiminnoille välttämätöntä merkitystä ei vielä tunneta ja joka voi altistaa muille, yleisemmille sairauksille.
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 1500 eläintä
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Siirtogeeniset hiiret, joilta puuttuu vastingeenin toiminta ja vaskulotomiosomissa oleva toinen geeni toimii normaalisti, ovat ihmisiltä saadun tiedon perusteella oireettomia. On todennäköistä että molempien geenikopioiden puuttuminen aiheuttaa syntymän jälkeen etenevän ja kuolemaan johtavan aivo-keuhkomaksa-sairauden. Tutkimuksen ensimmäisessä vaiheessa eläimiä seurataan syntymän jälkeen ja hiiret lopetetaan välittömästi, mikäli todetaan vakavia haittoja (hengitysvaikeus, sisäänvetäymät rintakehällä, nopeutunut hengitys, sinertuminen, kouristukset, poikkeava käyttäytyminen tai asento). Kokeen toisessa vaiheessa eläimet lopetetaan tietyn ikäisinä, ja korkeintaan juuri siinä iässä jolloin oireita ei vielä todettu. Kudokset näytteet tutkimuksia varten kerätään lopetetuilta eläimiltä. 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 Kummassakin vastingeenissä mutaatiota kantavat lapset sairastuivat tautiin, joka aiheutti useiden elinten toiminnan häiriötä ja kuoleman. Vain yhden mutaation kantajat ovat terveitä. Eläinkokeiden avulla voimme käyttää monipuolisia koejärjestelyjä mukaan lukien mahdollisesti hoitokokeita, joilla pyritään ehkäisemään oireiden ilmaantumista. Vastaavat kokeet eivät ole mahdollisia ihmisillä. Soluviljelytekniikat ja niistä kehittyneimmät, nanoteknologiaan perustuvat elinmallit vaativat lisäkehittelyä. Edelleen kantasoluteknologia on hoito joka näyttää tehoavan muutamaa tuhansista yhden geenin sairauksista.
2. Vähentäminen Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	2. Reduction Käytettävien koe-eläinten määrä on niin pieni kuin mahdollista tulosten tilastollisen luotettavuuden saavuttamiseksi. Rinnalla käytetään ei-korvaavia, potilaista eristetyillä ja viljellyillä soluilla tehtyjä tutkimuksia. Edelleen pyrkimyksenä on tehdä geenideleetiokokeita alemmilla eläinlajeilla (banaanikärpänen, seeprakala).
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 Hiiri on paljon käytetty eläin, koska sen lisääntymisbiologia ja erityisesti käytettävissä oleva biologinen hiiriteknologia tekevät siitä käytännössä ainoan mahdollisen tähän tutkimukseen soveltuvan eläinmallin. Nisäkäsmallin lisäksi seeprakala tai banaanikärpänen ovat käyttökelpoisia tutkimusmalleja, mutta niistä saatava informaatio on heikommin sovellettavissa ihmisellä esiintyvän taudin ehkäisyyn. Jos eläimellä havaitaan elinaikanaan tai kokeen kuluessa kipua tai tuskaa (epänormaali asento ja liikkuminen, epänormaali

	käyttäytyminen, levottomuus, liikkumattomuus, hengityksen tihentyminen, kouristukset), se lopetetaan pian oireiden alkamisesta ja tutkimukset suunnataan nuorempiin eläimiin, joilla ei havaita kliinisiä oireita. Verinäyte otetaan nukutetulta eläimeltä ja varsinaiset analyysit tehdään lopetetuilta eläimiltä kerätyistä kudospäätteistä.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 14.11.2019. Arviointi ESAVI 19.11.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Tutkimuksessa pyritään selvittämään äskettäin Pohjois-Suomesta löytämämme aikaisemmin tuntemattoman taudin syntymismekanismeja, ehkäisyä ja ennakointia (työnimi "BLL-syndrooma", uudelleen nimetty Finca-tauti). Saatujen tulosten avulla pyritään vähentämään kuolleisuutta ja parantamaan elämän laatua. Tutkimusprojekti tuottaa perustietoa geenistä, jonka elintoiminnoille välttämätöntä merkitystä ei vielä tunneta ja joka voi altistaa muille, yleisemmille sairauksille. Kokeissa käytetty poistogeeninen hiirilinja oli letaali jo varhaiskehityksen aikana, ennen 2,5 dpc, mahdollisesti jo aiemmin. Heterotsygoottiset hiiret olivat oireettomia koko seuranta-ajan. Samoin kuin ovat heterotsygoottiset ihmiset. TG-hiiressä mukana olevan LacZ-reportterigeenin avulla saimme tärkeää tietoa geenin translaatiosta. Linjaa tutkimalla in vitro fertilisaation avulla voimme selvittää missä vaiheessa hedelmöitystä Nhlrc2 vaaditaan.

2. Millaista haittaa?

Koska poistogeenin homotsygootti johti varhaiseen kehityksen pysähtymiseen ja heterotsygootit olivat oireettomia, hiiret eivät kokeneet kipua tai haittaa.

3. 3R-mahdollisuudet

Kokeen eläinten määrää pystyttiin vähentämään huomattavasti fenotyyppin puuttumisen takia. Nhlrc2 proteiinin toimintaa voidaan selvittää solulinjoilla ja IVF kokeilla tutkia varhaiskehitystä/hedelmöitystä. Solujen välisiä ja kudospäätteisiä kokeita varten hiirikokeille ei kuitenkaan ole korvaavia kokeita. Tätä varten on luotu uusi TG-linja, jossa on pistemutaatio (eri luvalla), jonka johdosta noin 10% normaalista proteiinin määrästä tuhoutuu.

Muuta

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?
Tutkimus BLL-syndrooman patogeenisistä GM-hiirillä	Hiiri	-	2100/532	vakava/ ei haittaa	poistogeeniset eivät kehittyneet 2,5dpc asti ja heterotsygooteilla ei ollut fenotyyppiä	kokeiden hiiri määrät vähenivät, koska tarvittavat tulokset saatiin pienemmällä hiiri määrällä.

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
Aikaisempi päätepiste	X	X	X	-
eläin määrän vähentäminen	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	Suolistotulehduksen mekanismit ja lieventäminen	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	suolitulehdus, tulehduksellisten suolistosairauksien malli,	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Kyllä,Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Kyllä,Ei
	Lajien säilyttäminen	Kyllä,Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Kyllä,Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Kyllä,Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä,Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Tämän projektin tarkoitus on tutkia, miten ravintotekijöillä, lääkkeillä ja kantasoluhoidoilla voidaan estää tai korjata suoliston tulehdusta ja suoliston limakalvoesteen häiriötä, voidaanko suolistovauriota ennustaa läpäisevyysmittauksilla ja selvittää tarkemmin tulehduksen mekanismeja.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Kokeiden tuloksia voidaan soveltaa ihmisten suolistotulehduksen oireiden lievittämiseksi. Kokeissa on tarkoitus käyttää suolistotulehduksen malleja, joiden avulla saadaan tietoa tulehduksen mekanismeista. Mallien avulla voidaan etsiä uusia hoitomuotoja tulehduksien lievittämiseksi. Hanke on prekliinistä tutkimusta, jonka tulosten tavoitteena on löytää tulehdusta lievittäviä aineita, joita voisi soveltaa kliiniseen käyttöön.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri 1250, rotta 1250	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Verinäytteiden otot, verenpaineen mittaaminen ja injektiot aiheuttavat eläimille lievää, lyhytaikaista haittaa. Suolitulehdus aiheuttaa eläimille kohtalaista haittaa, joka pyritään pitämään mahdollisimman lyhyenä. Kaikki kokeessa käytetyt eläimet lopetetaan, ja niiltä kerätään kudokset.	
	Vakavuusluokat: kohtalainen	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Kokeet ovat soveltavia ja prekliinisiä kokeita. Suolisto on monimutkainen elinjärjestelmä, jonka toimintaa ei voida jäljitellä kattavasti esim. solumalleissa. Hiiret ja rotat nisäkkäinä soveltuvat kokeisiin hyvin ja niille on olemassa useita tulehdusmalleja.	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Ryhmäkoko on valittu kokemuksen mukaan mahdollisimman pieneksi. Yhden osahankkeen materiaalia voidaan käyttää monessa tutkimuksessa, mikä vähentää käytettyjen eläinten kokonaismäärää lisäämättä toimenpiteitä eläimille.	

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) Hiiren ja rotan fysiologia vastaa riittävässä määrin ihmisen fysiologiaa, jotta hankkeen prekliiniset tavoitteet täyttyvät. Hiiret ja rotat soveltuvat kokeisiin hyvin ja niille on olemassa useita tulehdusmalleja. b) Mallit on valittu niin, että hankkeen tuloksia voidaan hyödyntää mahdollisimman hyvin kliinisessä tutkimuksessa. c) Kokeet pidetään mahdollisimman lyhyinä ja limakalvotulehdusta indusoivien aineiden annostelu mahdollisimman pienenä ja eläinten tilaa seurataan jatkuvasti.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN
Saapumispvm: 8.4.2019, arviointi ESAVI 12.9.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Osahanke 1: Syövän sytostaattihoidon aikaisen suolistotoksisuuden mekanismit ja estäminen

Hankkeen päätavoitteena oli tutkia sytostaattien aiheuttamia suolistovaikutuksia ja löytää niiden vakavuuteen vaikuttavia mekanismeja. Tässä tavoitteessa onnistuimme hyvin ja käyttämämme eläinmallit olivat tähän sopivia.

Osahanke 2: Suolitulehduksen mekanismit ja hoito tulehduksellisten suolistosairauksien mallissa

Hankkeen tavoitteina oli tutkia suolitulehduksen vaikutuksia paikalliseen reniini-angiotensiinijärjestelmää ja selvittää siihen kuuluvan ACE-entsyymien eston sekä kantasoluhoidon sopivuutta ja tehoa suolistotulehduksen hillitsevinä tekijöinä. Hankkeessa BALB/C-hiirille aiheutettiin suolistotulehdus dekstraanisulfaatilla (DSS). Malli sopi näihin tutkimuksiin hyvin ja asetetut tavoitteet pystyttiin saavuttamaan.

2. Millaista haittaa?

Osahanke 1: Syövän sytostaattihoidon aikaisen suolistotoksisuuden mekanismit ja estäminen

Sytostaattien aiheuttama haitta riippui hyvin paljon annetusta sytostaatista sekä sen annoksesta. Vatsaonteloon pistetty 5-Fluorourasiili annoksella 150 mg/kg aiheutti selkeää painon laskua (noin 5 % kolmantena päivänä pistoksesta) sekä lievää ripulia, mutta ei muita merkittäviä haittoja. Tämä annos vaikuttaa siis varsin hyvin siedetyltä. Irinotekaani aiheutti selkeästi vakavamman haitan, mutta sen siihen vaikutti käytetty annos. Vatsaonteloon pistetty irinotekaani annoksella 100 mg/kg aiheutti 24 h 5 % painon laskun ja ripulia, mutta paino ei laskenut enää tästä, vaan lähti jopa nousun kolmantena päivänä. Tällä annoksella näyttäisi siis aiheutuvan lyhytkestoinen haitta, josta eläin toipuu kahdessa päivässä. Vatsaonteloon pistetty irinotekaani annoksella 200 mg/kg aiheutti pienemmän annokseen verrattuna samanlaisen päiväkohtaisen painonpudotuksen (noin 5 %), mutta eläimet eivät osoittaneet merkkejä toipumisesta, vaan 72 h kuluttua eläimet olivat menettäneet noin 15 % lähtöpainostaan. Eläimissä oli myös havaittavissa selkeitä stressin merkkejä (esim. punasilmäisyys). Tätä annosta tulisikin mielestämme käyttää harkiten ja kokeen kesto pistoksen jälkeen on syytä rajata maksimissaan 72 h, jolloin eläimen kokema haitta jää suhteellisen lyhytkestoiseksi.

Kokonaisuudessaan arvioimme 66 eläimen kokeneen kohtalaista haittaa ja 44 eläimen kokeneen lievää haittaa tässä osahankkeessa. Tämä vastaa mielestämme hankeluvassa kuvattua vakavuusluokkaa. Yhtään eläintä ei tarvinnut lopettaa ennenaikaisesti lopetuskriteereiden perusteella.

Osahanke 2: Suolitulehduksen mekanismit ja hoito tulehduksellisten suolistosairauksien mallissa

(DSS aiheutti kuuden (n=24) tai seitsemän päivän (n=32) annostelun aikana lievää tai kohtalaista (0 - 11,4%) painon laskua, ripulia ja veriulosteita. Viimeisen vuorokauden aikana osalla eläimistä esiintyi kipua tai stressiä, mikä ilmeni karvan pörrööntymisenä, mutta muuten normaalina käyttäytymisenä (ei silmien siristystä tai kumaraa asentoa). Arvioimme näiden eläinten haitan olleen kokonaisuudessaan kohtalainen.

Kuuden vuorokauden DSS-annostelu ja sitä seuraava seitsemän vuorokauden toipumisjakso (n=30) aiheutti osalle eläimistä voimakkaampaa painon laskua (0 – yli 20%) toipumisjakson aikana, mutta muuten suolistotulehduksen aiheuttamat oireet olivat kuten edellä. Suurimmalla osalla eläimistä paino alkoi toipumiskauden aikana nousta. Eläimille annettiin kaksi laskimonsisäistä injektiota kaa-suanestesian aikana, mistä arvoimme eläimille aiheutuneen lievää haittaa. Kolme eläintä jouduttiin lopettamaan ennen kokeen päättymistä voimakkaan painon laskun ja selkeän kivuliaisuuden (kyyristynyt asento, hidas liikkuminen, siristyneet silmät) seurauksena. Näiden kolmen eläimen haitan arvioimme olleen vakava ja muiden osalta kohtalainen. Mallissa, jossa eläinten annetaan toipua tulehduksesta, DSS-annostelun aikaa tulisi lyhentää arviomme mukaan vuorokaudella (5 vuorokautta DSS-annostelua).

Läpäisevyysmittauksia, metaboliahäkityksiä, verenpaineen mittauksia tai verinäytteiden ottoa ei suoritettu samoille eläimille, joille oli aiheutettu suolistotulehdus.

3. 3R-mahdollisuudet

Osahanke 1: Syövän sytostaattihoidon aikaisen suolistotoksisuuden mekanismit ja estäminen

Sytostaattien suolistotoksisuuden näyttäisi vaikuttavan metaboliset muutokset sekä suolistomikrobiston muutokset, joten sen tutkiminen muilla malleilla on hankalaa. Sytostaatteja käytettäessä on kiinnitettävä erityistä huomiota lääkkeen annokseen sekä kokeen keston. Malli näyttäisi olevan kuitenkin suhteellisen toistettava, jolloin eläinmäärää voidaan joissakin tapauksissa vähentää, koska vaste on samanlainen kaikissa eläimissä.

Osahanke 2: Suolitulehduksen mekanismit ja hoito tulehduksellisten suolistosairauksien mallissa

Prekliinisiä kokeita suolistotulehduksesta lievittävästä hoidosta ei pystytäkään tekemään korvaavilla menetelmillä, mutta yhdistimme mekanistiset kokeet prekliinisiin kokeisiin vähentäen näin käytettävien eläinten määrää. Vaikka DSS-mallia pidetään hyvin toistettavana, kokemuksemme mukaan eläinten välillä on kuitenkin eroja tulehdusmuutosten voimakkuudessa, mikä asettaa rajoja eläinten vähimmäismäärälle ryhmää kohden ja jopa lisää painetta pienelle lisäykselle tulevilla kokeilla (n=10-12 per ryhmä). Läpäisevyysmittauksia, metaboliahäkityksiä, verenpaineen mittauksia ja verinäytteiden ottoa ei katsottu välttämättömäksi eläimille, joille oli aiheutettu suolistotulehdus, joten niitä ei myöskään kyseisille eläimille suoritettu, mikä vähensi eläinten kokemaa kokonaishaittaa. Lopetuspisteitä ei kokemuksemme perusteella kyseisellä hiirikannalla voi aikaistaa, koska suolistotulehduksen kehittymiseen menee aikaa. Eläimien oireiden ilmestymistä kannattaakin seurata ja mahdollisuuksien mukaan jatkaa DSS-annostelua, kunnes riittävät oireet havaitaan.

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: Irinotekaani 200 mg/kg	rotta	+	300 / 50	kohtalainen / kohtalainen	Mallista aiheutui selkeää painonlaskua (5 % / päivä), ripulia ja stressikäyttäytymistä.	Haittaa voidaan vähentää lyhentämällä pistoksen jälkeistä aikaa kolmesta päivästä esimerkiksi kahteen päivään
1: irinotekaani 100 mg/kg	rotta	+	300 / 10	lievä / kohtalainen	Mallista aiheutui painonlaskua (5 % / päivä), mutta 72 h pistoksesta eläinten paino lähti nousuun.	Pienempi annos aiheutti selkeästi vähemmän haittoja ja sitä voidaan ehkäpä soveltaa toksisuuden paranemisen tutkimiseen.
1: irinotekaani 100 mg/kg + 5-fluorourasiili 150 mg/kg	rotta	+	300 / 16	kohtalainen / kohtalainen	Mallista aiheutui selkeää painonlaskua (10 % 72 h jälkeen) ja lievää ripulia. Haitat näyttivät aiheutuvan 100 mg/kg irinotekaanista ja eläinten kunto parani jo kolmantena päivänä.	-
1: 5-fluorourasiili 150 mg/kg	rotta	+	300 / 8	lievä / kohtalainen	Mallista aiheutui painonlaskua (5 % 72 h pistoksesta) sekä lievää ripulia.	-
1: biologiset lääkkeet	rotta	+	300 / 8	lievä / kohtalainen	Ei havaittavissa olevia haittoja.	-
1: metaboliahäkitys 24 h	rotta	+	600 / 110	lievä / kohtalainen	Yksilöllistä vaihtelua haitoissa, osa näyttää reagoivan metaboliahäkkiin voimakkaammin kuin toiset, haitat lähinnä stressikäyttäytymistä ja lievää painonlaskua.	Kehittämällä metodeja siten, että metaboliahäkitys voidaan korvata muilla metodeilla. Eläimet myös osoittivat totuvansa häkitykseen, koska yleisesti ottaen stressimerkit hävisivät toisella kerralla.

2: 3% DSS 6-7 vrk	hiiri	+	112/56	kohtalainen/kohtalainen	Mallista johtuva veriripuli ja karvan pörhistymien	Lopetuspisteen arviointi koekohtaisesti. Turhien toimenpiteiden välttäminen.
2: 3% DSS 6 vrk + vesi 7 vrk	hiiri	+	96/30	kohtalainen/kohtalainen	3/30 mallista johtuva kivuliaisuus, josta aiheutunut vakava haitta, muilla kohtalainen	Koeasetelmaa ei toistettu, mutta annostelu-aikaa kannattaa lyhentää.
2: Laskimon-sisäinen injektio kaa-suansesestian aikana	hiiri	+	96/40	lievä/lievä	Osalle hiiristä jouduttiin aiheuttamaan useampi pistoskohta	Hiiriä pidettiin lämpökaapissa häntälas-kimoiden laajentamiseksi ennen anestesiasia. Hiirien injektioipaikallakin kannattaa pitää lämpömattoa suoneen osumista helpottamaan.

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	x
Lyhyempi seuranta-aika	x	x	x	x
Totuttaminen	x	x	-	-
Lyhyempi annostelu	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	Bakteerien taudinaiheutuskykyyn vaikuttavat tekijät kalanviljelyssä	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Kalanviljely, tauti, kala	
	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 selvittää kalanviljelyssä esiintyvien tautien leviämiseen ja taudinpurkauksien esiintymiseen vaikuttavia tekijöitä, sekä taudintorjuntamenetelmien soveltuvuutta eri olosuhteissa.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tutkimuksen avulla voidaan ymmärtää kuinka taudit leviävät ka- lanviljelyssä ja kuinka eri taudinaiheuttajien esiintyminen ja ympäristötekijät vaikuttaa taudinkuvaan. Nämä tutkimusaiheet tuovat uutta tietoa tautiepidemioiden puhkeamisesta ja tuloksia voidaan käyttää ennustamaan tautien esiintymistä tuotan- toeläimissä ja muissa tiheissä populaatioissa. Lisäksi, tutkimus- tuloksien avulla voidaan kehittää taudinaiheuttajien spesifistä torjuntaa.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Kirjolohi 10 000, seeprakala 6 000 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Infektioiden oireet ilmenevät kaloilla nopeasti aiheuttaen lyhyt- kestoista haittaa, ja kalan oirehtiessa (ihohaavaumat, kidustu- lehdus) se lopetetaan. Kalat lopetetaan kokeen päätyttyä. 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?	Tautien ilmenemistä, leviämistä ja torjuntaa ei voida täysin tut- kia käyttämättä eläimiä. Kokeissa käytetään kaloja, jotka ovat tutkittavien tautien luontaisia isäntiä kalanviljelyssä.	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?	Arviot käytettävistä eläimistä ovat mahdollisia maksimimääriä. Osatutkimukset tehdään laboratorio-olosuhteissa niin pitkälle kuin mahdollista, ja eläinmäärän vähentämiseksi kokeet suun- nitellaan tarkasti.	
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle.	a) Taudinaiheuttajat tarttuvat yleensä useisiin isäntälajeihin. Tautien haitallisuuden ja leviämisen ymmärtämiseksi on tär- keää	

b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	selvittää mekanismeja useissa isäntälajeissa. b) Tutkimus kohdistuu kalanviljelyssä esiintyviin kalojen tauteihin. Kirjolohi on tutkittavien taudinaiheuttajien pääasiallinen isäntä kalanviljelyssä, seeprakala yleisesti käytetty ja hyvin tunnettu tautimalli. c) Kalojen hyvinvointia seurataan kokeiden aikana huolellisesti ja oirehtivat kalat lopetetaan. Infektioannosten määrät suunnitellaan esikokeiden avulla siten, että eläimille aiheutuva haitta minimoituu.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 20.12.2018, arviointi ESAVI 11.9.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeessa selvitettiin kalanviljelyssä esiintyvien tautien leviämiseen ja taudinpurkauksien esiintymiseen vaikuttavia tekijöitä, sekä taudintorjuntamenetelmien soveltuvuutta eri olosuhteissa. Koe-eläiminä käytettiin tautien luontaisia isäntiä (kirjolohi, lohi ja taimen), ja osa kokeista tehtiin kalanviljelyolosuhteissa. Näin saatiin luotettavaa uutta tietoa tautiepidemioiden syntyyn johtavista tekijöistä kalanviljely-ympäristössä. Hankkeen tavoitteet siis saavutettiin, vaikka jatkotutkimuksiakin vielä tarvitaan.

2. Millaista haittaa?

Luvassa haitta arvioitiin luokkaa vakava (4), mutta toteutunut haitta on kohtalainen (3). Kohtalaiseen haittaan päädyttiin, koska koeasetelmissa pyrittiin minimoimaan yksilöiden kokema haitta tarkkailemalla kaloja koeasetelmasta riippuen tunnin – 4 tunnin välein. Kirjolohilla tehdyissä altistuskokeissa kalojen tilaa seurattiin vähintään tunnin välein, ja koko kokeen kesto oli yleensä 22-28 tuntia. Näin ollen kalat voitiin nopeasti poistaa kokeesta ja lopettaa heti bakteeritaudin oireiden ilmaantuessa, ja kaloille aiheutui vain lyhytkestoista haittaa. Lohilla ja taimenilla bakteerialtistuskokeet tehtiin kalanviljely-ympäristössä alhaisemmassa lämpötilassa, jossa taudin eteneminen on hitaampaa. Näissä kokeissa kalojen tila tarkistettiin 4 tunnin välein, jolloin koettu haitta on ollut lyhytkestoista.

3. 3R-mahdollisuudet

Kokeissa käytetyt eläinmäärät on tarkkaan harkittuja. Vaihtoehtoisia luotettavia menetelmiä kalojen bakteeri- ja loisinfektioiden tutkimukseen ei ole. Pyrimme keräämään aineistoa laboratoriokokeilla ja genomisekvensoinneilla, mutta kalaisännän läsnäolo muokkaa bakteerien toimintaa niin voimakkaasti että taudinaiheutuskykyä voidaan ymmärtää vain virulenssikokeiden avulla. Joissakin kokeissa on kaloilla käytetty altaissa myös virikkeitä, kuten kiviä.

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.

Osa-hanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, malista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Bakteeri- ja loisaltistus	Kirjolohi	+	10000/2389	Vakava/kohtalainen	bakteeritaudin oireet	-
Bakteeritaltistus	lohi	+	13500/610	Vakava/kohtalainen	bakteeritaudin oireet	-
Bakteeritaltistus	taimen	+	13500/3798	Vakava/kohtalainen	bakteeritaudin oireet	-

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 hanke-lupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

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

3. POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING: Högst 1–2 sidor lång, se [EU-kommissionens anvisning och exempel](#). Besvara enbart det som efterfrågas. Sträva till att också en person utan bakgrundsinformation ska kunna förstå svaren.

Projektets namn	Utveckling och betydelse av neuronpopulationer i nervsystemets funktion och sjukdomar	
Projektgodkännandet är i kraft	3 år	
Nyckelord	Aminer, neuroner, beteende, neurodegeneration, sebrafisk	
Syfte med projektet	Grundforskning	Ja
	Translationell eller tillämpad forskning	Nej
	Lagstadgad användning och rutinproduktion	Nej
	Skydd av miljön för att bevara människors eller djurs hälsa eller välbefinnande	Nej
	Artskydd	Nej
	Högre utbildning eller utbildning för att förvärva yrkesfärdigheter	Ja
	Rättsmedicinska undersökningar	Nej
	Upprätthållande av en koloni av genetiskt modifierade djur	Ja
Projektets syften (t.ex. vetenskaplig information som eftersträvas eller vetenskapliga eller terapeutiska behov)	I detta projekt strävar vi till att förstå neuronala populationers funktion både under normal tillstånd och i olika neuronala sjukdomar. Ultimata målet är att kunna tillfredsställa terapeutiska behov. Projektets syfte är att utreda 1) hur neurotransmittorer påverkar varandra under utvecklingen och under patologiska tillstånd när ett transmittorsystem lider av degenerativa tillstånd, 2) hur genetiska och toxiska mekanismer tillsammans förorsakar neurodegeneration, 3) vilka faktorer och mekanismer som skyddar nervceller vid toxiska och excitatoriska anfall som också är viktiga under hjärnans utveckling.	
Nyttan med projektet (hur det främjar vetenskapen, hur människor eller djur kan dra nytta av resultaten av projektet)	Vi vill förstå neuronpopulationernas dynamik för att i slutändan kunna behandla neurodegenerativa och neurologiska sjukdomar som för tillfället inte går att bota, och vars nutida behandlingar endast kan lindra symptom.	
Djurarter och djurantal som används	Sebrafisk, 32 570 st och Guppy, 240 st	
Negativ inverkan på djuren, försökens svårhetsgrader, vad som händer med djuren efter försöket	Modifiering av genom och behandling med kemikalier kan ha en negativ inverkan på djur. De djur som har tydliga negativa symptom avlivs genast. Det är svårt att utvärdera vilka effekter olika mutationer kan ha, eftersom de är olika, och därmed är även försökens svårighetsgrad svår att förutse. Efter beteendetesten avlivs använda djur och effekten från försöket evalueras. Svårhetsgrader: ringa, måttliga och avsevärda	
Tillämpande av 3R-metoderna - Application of the 3Rs		
1. Ersättande - Replacement Varför måste djur användas i projektet och varför kan inte en ersättande metod användas?	Neuronpopulationers utveckling och funktion kan endast studeras i en intakt organism, in vivo, eftersom beteendetest som bl.a. minne och inlärning inte kan studeras annat än i intakta djur.	

2. Begränsning - Reduction Hur har man säkerställt att så få djur som möjligt används?	Främst används sebrafiskyngel som är maximalt sju dagar gamla i experimenten, och därmed begränsas användningen av vuxna djur. Vuxna djur används främst till att upprätthålla stammar av genmodifierade och vildtyps djur. För mekanismer som är enbart aktiva i vuxna hjärnor, och för experiment där åldrandet är viktigt, används vuxna fiskar.
3. Förfining - Refinement a) Motivering till val av djurart. b) Varför är den valda djurmodellen bäst för att uppnå de vetenskapliga målen? c) Hur tänker man minimera den skada som djuren orsakas?	Sebrafiskens genom kan lätt modifieras med olika metoder och tillåter därför effektiv analys av diverse hypoteser. Dessutom är sebrafiskens hjärna transparent och liten vilket tillåter 3D mikroskopering av intakta neurotransmittersystem, vilka därtill kan kvantifieras. Djuren uppföljs dagligen och de djur som lider av genmodifiering/behandling kommer att avlivas genast, och endast djur som inte har mycket stora fenotypiska avvikelser från vildtypens djur kommer att användas i experimenten.
Utvärderas projektet i efterhand?Ja/Nej	JA

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 21.12.2018, arviointi ESAVI 11.9.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

DP 1: Hankkeessa selvitettiin välittäjäainejärjestelmiin vaikuttavien kemiallisten aineiden vaikutusta kalojen käyttäytymiseen, aivojen rakenteeseen, ja neurokemiaan. Lisäksi tutkittiin ionisten liuosten vaikutusta kalojen käyttäytymiseen ja kehitykseen. Osahankkeen tavoitteet saavutettiin erittäin hyvin. Tutkimuksessa voitiin tehdä johtopäätöksiä paljon jo varhaisilla kehitysvaiheilla tehtävillä kokeilla, jolloin aikusten kalojen määrää voitiin supistaa. Seeparakalamalli oli erittäin sopiva tähän tutkimukseen. Ionisten liuosten vaikutusten selvittämiseksi malli on paras mahdollinen, sillä tavoitteena oli juuri veteen joutuvien mahdollisesti haitallisten aineiden vaikutusten selvittäminen. Erityisesti varhaisilla kehitysvaiheilla tehtyjen kokeiden perusteella voitiin päätellä, että eräitä näistä aineista ei tule käyttää avoimissa järjestelmissä, joista kemikaaleja sisältävä vesi voi vaikuttaa luonnossa eläviin vesieläimiin. Eräitä hakemuksessa ja luvassa mainittuja aineita ei käytetty, koska niiden tilalle oli tullut parempia ja eläimiä vähemmän haittaavia menetelmiä.

DP2: Valikoitujen geenien mutaatioiden tutkimus tuotti odotetusti hyviä tuloksia. Koska tarkoituksena oli selvittää tutkittavien geenien merkitystä pitkän ajan kuluessa, ja eräiden kalakantojen tuottamiseksi tarvitaan useita sukupolvia, kaikkia tuloksia ei vielä pystytä arvioimaan. Tutkimuksessa oli tarkoitus melko laajalti käyttää morfolino-oligonukleotideja lähetti-RNA:n translaation estämiseksi. Tämän menetelmän käyttö oli suunniteltua vähäisempää, koska mutaatioiden tuottamiseksi kehitetty CRISPR/Cas menetelmä osoittautui tehokkaammaksi ja spesifisemmäksi menetelmäksi. Samasta syystä suunniteltua ENU-altistusta mutanttikantojen tuottamiseksi ei käytetty lainkaan. Muutoshakemuksessa mainitut leesiokokeet tehtiin suunnitelman mukaisesti ja ne onnistuivat hyvin.

DP3: Kalakantoja ylläpidettiin suunnitelman mukaisesti kudosnäytteiden ottamiseksi ja käyttäytymiskokeiden suorittamiseksi. Kantojen ylläpidossa ei ollut ongelmia.

DP4: Aivojen koon kehittymisen tutkimiseksi suunnitellut kokeet tehtiin koesuunnitelman mukaisesti seeprakaloilla. Seeprakalalle suunnitellut kokeet ovat edelleen käynnissä uuden luvan piirissä. Tämän koeluvan aikana tehdyt kokeet onnistuivat suunnitelman mukaisesti. Muilla lajeilla suunniteltuja kokeita ei tarvinnut tehdä, koska seeprakalamallilla saadut tulokset olivat riittäviä.

DP5: Dominanssin mekanismin määrittelemiseksi tehtävät kokeet onnistuivat kaikilta osin hyvin. Seeprakala on sosiaalisena parvikalana ja yksittäisten yksilöiden dominanssisuhteiden vuoksi erittäin hyvä laji ilmiön tutkimiseksi.

2. Millaista haittaa?

Toimenpiteet onnistuivat eläinten hyvinvoinnin kannalta erittäin hyvin. Tosiasiallinen haitta oli odotettua vähäisempi monilta osin seuraavista syistä:

-ENU-mutageneesia ei tarvinnut käyttää lainkaan, sillä muut paremmat menetelmät korvasivat sen täysin. Vakavaa haittaa ei näin seurannut mistään kokeesta.

-monet altistuskokeet sellaisilla aineilla, joiden toiminta ja vaikutukset olivat osittain huonosti tunnettuja, voitiin toteuttaa alusta loppuun alle 5 pv ikäisillä kaloilla, jolloin ei tarvinnut altistaa kaloja, jotka olisivat kehitysvaiheensa perusteella olleet tämän luvan piirissä.

Vakavaa haittaa ei siis aiheutunut mistään suunnitellusta kokeesta. Mitään yllättäviä haittoja ei todettu. Loppupäätelmänä voidaan todeta, että tutkimusta suunniteltaessa on ennakoitu haitat tavalla, joka ennakoi kohtalaista tai vakavaakin haittaa. Näin ei jouduta tilanteeseen, jossa tuotettaisiin eläimille vakavampaa haittaa kuin luvassa on ilmoitettu. Haitan arviointi on vaikeaa tilanteissa, joissa tutkitaan aineita, joiden vaikutuksista ei ole ennalta tietoa.

3. 3R-mahdollisuudet

Sekä korvaavana menetelmänä että eläinten määrän vähentämisenä toimi hyvin varhaisten kehitysvaiheiden käyttäminen tutkimuksessa. Samoin eräiden haitallisten aineiden käytöstä voitiin kokonaan luopua siitä huolimatta, että niiden käytölle oli lupa. Tämän mahdollisti parempien ja spesifisempien menetelmien käyttö. Samalla käytettyjen aikuisten eläinten määrä väheni selvästi. Tämä ei merkitse sitä, että jatkossa aikuisten eläinten tutkimuksesta voitaisiin luopua, koska monet fenotyyppit manifestoituvat vasta myöhäisessä aikuisiässä.

Koska tutkimme eläinten käyttäytymisen neuraalista perustaa, eläinkokeista ei voida näiden kysymysten ratkaisemiseksi luopua. Tutkittavana on oltava koko elimistö, joka toteuttaa käyttäytymistä luotettavasti.

Toimenpiteiden toteuttamistapaa on tämän luvan mahdollistamien kokeiden aikana jo kehitetty. Tämä kehittäminen jatkuu edelleen.

Käytössä on jo lopettamispisteet, jotka ovat mahdollisia luotettavien tulosten saamiseksi. Näissä kokeissa ei myöskään syntynyt lainkaan vakavaa haittaa, joka edellyttäisi hyvin nopeaa lopettamista.

Monista kokeista on alkuperäiset materiaalit (esim. videot) edelleen olemassa, ja niistä voidaan analysoida uusia parametreja.

Saavutettuja 3R-keinoja käytetään jo laajasti alalla. Niiden käyttökelpoisuus on usein koe- ja mallikohtaista, joten esimerkiksi varhaisten kehitysvaiheiden käyttö aikuisten kalojen asemesta voi olla mahdollista joissakin mutta ei välttämättä kaikissa kokeissa. Esimerkiksi sosiaalisen käyttäytymisen ja aggression tutkiminen on relevanttia vasta aikuisilla kaloilla.

Muuta

Kokeet onnistuivat erittäin hyvin ja niissä tuotettiin arvioitua vähemmän haittaa eläimille.

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	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?
DP1 altistukset	seeprakala	+	9540/257	vakava/lievä	lievä: 257 kpl	Altistuskokeet tehtiin pääasiassa kalojen varhaisilla kehitysvaiheilla.
DP2 MO, ENU, Crispr-Cas9	seeprakala	+	22640/1975	kohtalainen/lievä	lievä:1887 kpl kohtalainen:88 kpl mallista aiheutuva	Morfoliino-injisoituja alkioita ei kasvatettu yli varhaiskehitysvaiheen, ENU käsittelyä ei suoritettu kaloille lainkaan, parempi menetelmä korvasi tämän.
DP3 kantojen ylläpito	seeprakala	+	2250/1301	kohtalainen/lievä	lievä:1301 kpl mallista aiheutuva	-
DP4 Aivojen koko	seeprakala	+	600/351	lievä/lievä	lievä: 351 kpl mallista aiheutuva	-
DP4 Aivojen koko	miljoonakala		240/0	-	-	kokeita ei suoritettu miljoonakaloilla. Tarvittava tieto saatiin seeprakaloista.
DP5 Hierarkia	seeprakala	+	480/120	lievä/lievä	lievä: 120 kpl mallista aiheutuva, lajille ominainen käyttäytymisen	lyhyempi seuranta-aika

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 raportoitessa
Aikaisempi päätepiste	X	x	-	-
Lyhyempi seuranta-aika	X	X	-	-
Toksisen menetelmän korvaaminen	x	x	x	x
Varhaisten kehitysasteiden käyttö	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	Lääke- ja kantasoluhoidot selkäydinvamman eläinmallissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	selkäydinvaurio, kantasolu, siirtogeeninen hiiri	
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 kehittää uusia lääke- sekä kantasoluhoidoja selkäydinvaurioon.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Selkäydinvaurio on yksi yleisimmistä halvaantumisen syistä varsinkin nuorilla miehillä. Vammaan ei ole hoitoa ja se vakavimmillaan johtaa kuolemaan tai elintärkeiden sisäelintoimintojen säätelymekanismien toimintahäiriöihin. Selkäydinvamma lyhentää elinikää ja aiheuttaa huomattavan elämänlaadun huononemisen, sillä raajojen halvaantumisen lisäksi vamma aiheuttaa usein mm. kroonista kipua, tunnottomuutta, spastisuutta, virtsarakon ja suolen toiminnan sekä seksuaalitoimintojen lamaantumista. Tämän vuoksi on erittäin tärkeää kehittää jatkuvasti uusia hoitomuotoja potilaiden elämisen laadun parantamiseksi.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri 1350 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Kokeessa käytetyille eläimille aiheutetaan ihmisen selkäydinvauriota vastaava haitta ja ihmisen selkäydinvauriota vastaavat patologiset muutokset. Näistä yleisin on halvaus, mikä johtaa alaraajojen toimintahäiriöihin sekä virtsaamisvaikeuksiin. Eläimet lopetetaan kokeen lopussa. 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?	Meillä on käytössämme useita erilaisia selkäydinvaurion soluviljelymalleja, joissa testaamme tutkittavia hoitomuotoja ennen niiden viemistä eläinkokeisiin. Soluviljelykokeilla on kuitenkin mahdotonta mallintaa kaikkia selkäydinvaurion aiheuttamia patologisia muutoksia. Lisäksi soluviljelymalleilla ei voida mallintaa vamman aiheuttamia motorisia vaurioita. Kokeessa käytettävällä traumamallilla saadaan koe-eläimeen ihmisen	

	selkäydinvamman 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 selkäydin viljelmät sekä selkäydin leikeviljelämä. Soluviljely- ja muulla in vitro -tutkimuksella ei pystytty luomaan kokonaisvaltaista selkäydinvamman patologiaa paranemisprosessineen. Meillä on tiedossa kokeessa käytetyn selkäydinvauriomallin biologinen hajonta, jota käyttäen olemme laskeneet ryhmäkoot siten, että ne ovat pienimmät mahdolliset, joilla tilastollisesti merkittävät 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 traumamallilla saadaan koe-eläimeen ihmisen selkäydinvamman 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. Lisäksi olemme optimoineet mallin siten, että sen aiheuttama vamma on keskisuuri verrattuna useisiin aikaisemmin julkaistuihin malleihin mutta se tuottaa toistettavan vaurion, jolla on mahdollista nähdä lääkehoitojen vaikutus luotettavasti. Pienintä vauriota käyttämällä hiiret kuntoutuvat lähestulkoon kokonaan jo alle viikossa, keskisuurta vauriota käyttämällä parantuminen on hitaampaa, mutta esimerkiksi niiden virtsaamiskyky palautuu suhteellisen nopeasti. Lievimmällä vauriolla on mahdollista tutkia esimerkiksi sitä, mitkä geenituotteet ovat kuntoutumisen kannalta välttämättömiä. Lääkeaineiden parantava vaikutus on puolestaan vaikeaa nähdä lievimmällä vauriolla, sillä hiiret kuntoutuvat jo muutoinkin nopeasti, niin että mahdollinen protektio saatetaan hävittää hiirten luonnolliseen "recovery"-kykyyn. Näin ollen koeasetelmasta ja tutkimuksesta riippuen on tärkeää valita juuri oikean laatuinen vaurio (joko lievä tai keskisuuri). Eläimiä tarkkaillaan vaurion jälkeen kahdesti päivässä ja niiden hoito on tehostettua. Hiirille suoritetaan virtsarakon tyhjennys kahdesti vuorokaudessa, niitä nesteytetään sekä niille annetaan jauhettua ruokaa. Eläimet, jotka eivät näytä toipumista, lopetetaan.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 24.1.2019, arviointi ESAVI 12.9.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

On arvioitu, että maailmassa elää 2,5 miljoonaa selkäydinvammaa sairastavaa ihmistä ja vuosittain uusia tapauksia syntyy n. 130 000. Tavallisimmin vaurio tapahtuu liikenne- ja putoamistapaturmissa, joissa selkäydin ruhjoutuu, venyy ja/tai puristuu. Vakavimmillaan vamma johtaa kuolemaan tai elintärkeiden sisäelintoimintojen säätelymekanismien toimintahäiriöihin. Selkäydinvamma lyhentää elinikää ja aiheuttaa huomattavan elämänlaadun huononemisen, sillä raajojen halvaantumisen lisäksi vamma aiheuttaa usein mm. kroonista kipua, tunnottomuutta, spastisuutta, virtsarakon ja suolen toiminnan sekä seksuaalitoimintojen lamaantumista. Tällä hetkellä selkäydinvammaan ei ole saatavilla täysin parantavaa hoitoa mutta pienimmätkin edistysaskeleet hoidon kehittämisessä kohentavat potilaiden elämänlaatua sekä vähentävät sairaala- ja kuntoutushoidon kustannuksia. Ryhmämme on tutkinut kantasoluhoitoja ja uusia lääkeainehoitoja muissa keskushermoston sairauksissa, kuten aivohalvauksessa. Koska eri keskushermoston sairauksissa aktivoituu usein samankaltaisia, esimerkiksi tulehdusreaktioon liittyviä mekanismeja, pystymme hyödyntämään muissa tutkimuksissa saamiamme lupaavia tuloksia myös selkäydinvaurion tutkimisessa.

Lisäksi olemme osoittaneet kantasoluhoitojen parantavan hiirten toipumista aivohalvauksesta. Tämän vuoksi onkin erittäin tärkeää testata näitä potentiaalisia hoitomuotoja myös selkäydinvauriomallissamme. Tässä tutkimuksessa oli tarkoitus tutkia ja kehittää sekä farmakologisia että kantasoluterapeuttisia hoitomuotoja selkäydinsolujen toiminnan parantamiseen painevamman jälkeen.

Osahanke 1: Tässä osahankkeessa testattiin uusia potentiaalisia lääkeainehoitojen selkäydinvauriomallissa hiirellä. Selkäydinvaurioon ei ole olemassa hoitomuotoja, mikä aiheuttaa valtavan tarpeen uusien lääkehoitojen kehittämiselle. Eläimille aiheutettiin selkäydinvaurio, jonka jälkeen eläimille annosteltiin tutkittavaa lääkeainetta ja sen tehoa testattiin käyttäytymistestien avulla. Kokeen jälkeen eläimistä kerättiin tutkittavat näytteet terminaalianestesiassa.

Osahanke 2 (pilottivaihe): Tässä osahankkeessa testattiin solusiirteiden elinvoimaisuutta hiiren selkäydinvauriomallissa. Ihmisperäiset kantasolut ovat erittäin potentiaalisia hoitomuotoja selkäydinvaurioon, mutta niiden selviytyminen vaurioituneessa selkäytimessä on ongelmallista. Osahankkeessa ei aiheutettu eläimille selkäydinvauriota, vaan solut annosteltiin terveeseen selkäytimeen ja niiden elinvoimaisuutta tutkittiin eri aikapisteissä, jolloin eläimistä kerättiin tutkittavat näytteet terminaalianestesiassa.

Käytetty eläinmalli oli sopiva tähän tutkimukseen, sillä olemme optimoineet mallin siten, että sen aiheuttama vamma on keski-suuri verrattuna useisiin aikaisemmin julkaistuihin malleihin mutta se tuottaa toistettavan vaurion, jolla on mahdollista nähdä lääkehoitojen vaikutus luotettavasti.

2. Millaista haittaa?

Osahanke 1: Eläinten takaraajat olivat täysin halvaantuneet selkäydinvaurioleikkauksen jälkeen ja alkoivat spontaanisti kuntoutua noin viikon kuluttua. Kroonisessa vaiheessa (päivät 7+) eläimet eivät kyenneet tyhjentämään virtsarakkooaan, mutta pystyivät tyhjentämään itse virtsarakkooaan jo viimeistään 2 viikon kuluttua leikkauksesta. Hiirten kykyä tyhjentää itse virtsarakkonsa tarkkailtiin

ja varmistettiin intensiivisesti myös tämänkin ajanjakson jälkeen. Eläimiä tarkkailtiin intensiivisesti kahdesti päivässä. Niille annettiin jauherehua. Lisäksi eläin punnittiin ja nesteytettiin (2 ml keitto-suolaa sc) kerran päivässä. Kroonisessa vaiheessa (päivät 7+) eläimen kunto (iho, haava) tarkistettiin päivittäin, virtsarakko tyhjennettiin 2 x pv:ssä, kunnes eläin kykeni virtsaamaan itse.

Tässä osahankkeessa käytettiin yhteensä 50 eläintä, joista 10% (5 eläintä) jouduttiin lopettamaan lopetuskriteereiden perusteella. Tämä luku on pienempi, kuin luvassa ilmoitettu operaatioihin liittyvä kuolleisuus (15-25%).

Eläimille aiheutunut tosiasiallinen haitta on ollut suurta ja vakavuusluokka on ollut vakava. Nämä ovat linjassa etukäteisodotusten kanssa.

Osahanke 2 (pilottivaihe): Tässä osahankkeessa ei aiheutettu selkäytimen painevauriota, eikä eläimille näin ollen aiheutunut halvausta. Eläimille suoritettiin kuitenkin luvassa kuvattu sham-leikkaus, jonka aikana solut injisoitiin selkäytimeen. Tämän osahankkeen ensimmäisessä vaiheessa käytettiin 14 hiirtä ja toisessa vaiheessa 60 hiirtä. Toisessa vaiheessa käytetyistä eläimistä 2 (3%) jouduttiin lopettamaan operaatiossa tapahtuneen ongelman takia. Tämä on linjassa luvassa ilmoitetun operaation aiheuttama kuolleisuus (2-5%) kanssa.

Eläimille aiheutunut tosiasiallinen haitta ja vakavuusluokka on ollut kohtalainen. Nämä ovat lievempiä kuin luvassa ilmoitetut etukäteisodotukset, sillä eläimille ei tehty selkäytimen painevauriota.

3. 3R-mahdollisuudet

Onko käytettävänä uusia vaihtoehtoisia menetelmiä eläinten käytön tilalle?

Soluviljelykokeilla on mahdollonta mallintaa kaikkia selkäydinvaurion aiheuttamia patologisia muutoksia. Soluviljelymalleilla ei myöskään voida mallintaa vamman aiheuttamia motorisia vaurioita. Kokeessa käytettävällä traumamallilla saadaan koe-eläimeen ihmisen selkäydinvamman patologiset muutokset. Käyttäytymistestit puolestaan täydentävät kudosleikkeistä saatavia tutkimustuloksia.

Voisiko toimenpiteiden toteuttamistapaa ja/tai hoitomenetelmiä edelleen kehittää?

Eläimille annetaan kipulääkitystä leikkauksen jälkeen. Lisäksi olemme optimoineet mallin siten, että sen aiheuttama vamma on keskisuuri verrattuna useisiin aikaisemmin julkaistuihin malleihin mutta se tuottaa toistettavan vaurion, jolla on mahdollista nähdä lääkehoitojen vaikutus luotettavasti. Pienintä vauriota käyttämällä hiiret kuntoutuvat lähestulkoon kokonaan jo alle viikossa, keskisuurta vauriota käyttämällä parantuminen on hitaampaa, mutta esimerkiksi niiden virtsaamiskyky palautuu suhteellisen nopeasti. Valitsemme joko pienen tai keskisuuren vaurion koeasetelmasta riippuen. Lievimmällä vauriolla on mahdollista tutkia esimerkiksi sitä, mitkä geenituotteet ovat kuntoutumisen kannalta välttämättömiä: nrf2 geenin poistaminen aiheuttaa sen, että hiiret kuntoutuvat huominkin kuin tavalliset villityypin hiiret, ja koska kuntoutuminen on huonompaa, on ero mahdollista nähdä myös lievintä vauriota käyttämällä. Lääkeaineiden parantava vaikutus on puolestaan vaikeaa nähdä lievimmällä vauriolla, sillä hiiret kuntoutuvat jo muutoinkin nopeasti, niin että mahdollinen protektio saatetaan hävittää hiirten luonnolliseen "recovery"-kykyyn. Näin ollen koeasetelmasta ja tutkimuksesta riippuen on tärkeää valita juuri oikean laatuinen vaurio (joko lievä tai keskisuuri).

Voisiko inhimillisiä lopetuspisteitä aikaistaa?

Määritellyt inhimillisen lopetuspisteet ovat: Syömättömyys, juomattomuus, voimakas painon lasku (20 %), hengitysvaikeudet, virtsaamattomuus, ulostamattomuus, vakavat infektiot leikkausalueella. Näiden nähdään toimivan hyvin inhimillisiä lopetuspisteinä.

Pitäisikö eläinmääriä muuttaa?

Kuolleisuudesta johtuen hiiriä varataan tutkimuksessa 20 per ryhmä, jos niille indusoidaan selkäydinvaurio ja 16 per ryhmä jos ne kuuluvat sham operoituihin hiiriin. Jotta käyttäytymistesteistä saadaan luotettava ja tilastollisesti merkittävä lopputulos, tulee hiiriä olla 15 kpl per ryhmä. Nämä ryhmäkoot ovat pienimmät mahdolliset, jotta voidaan saada tilastollisesti merkittävä lopputulos.

Voisiko käytetyistä eläimistä saada enemmän tietoa hyödynnettäväksi?

Eläimien käyttäytymistä seurataan kokeen aikana ja siitä kerätään dataa. Kokeen jälkeen eläimistä kerätään tutkittavat näytteet terminaalianestesiassa. Emme näe muita mahdollisia tiedonkeräys tapoja.

Olisiko keksityillä 3R-keinoilla laajempaa hyödynnettävyyttä?

Olemme optimoineet mallin siten, että sen aiheuttama vamma on keskisuuri verrattuna useisiin aikaisemmin julkaistuihin malleihin mutta se tuottaa toistettavan vaurion, jolla on mahdollista nähdä lääkehoitojen vaikutus luotettavasti. Tällä ja hyvillä leikkaustekniikoilla on varmastikin laajempaa hyödynnettävyyttä.

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	+	528/50	4/4	Mallista aiheutuva selkäytimen painevauriosta johtuva ohimenevä takajalkojen halvaus ja operatiivien aiheuttama kipu.	<u>Korvaaminen</u> : Soluviljelykokeilla on mahdollonta mallintaa kaikkia selkäydinvaurion aiheuttamia patologisia muutoksia. Soluviljelymalleilla ei myöskään voida mallintaa vamman aiheuttamia motorisia vaurioita. Kokeessa käytettävällä traumamallilla saadaan koe-eläimeen ihmisen selkäydinvamman patologiset muutokset. Käyttäytymistestit täydentävät kudosleikkeistä saatavia tutkimustuloksia. <u>Vähentäminen</u> : Kokeiden ryhmäkoot on tarkoin harkittu pienimmiksi mahdollisiksi, jotta tilastollisesti merkittävät ryhmien väliset erot vielä saadaan näkyviin. <u>Parantaminen</u> : Eläimille annetaan kipulääkitystä leikkauksen jälkeen. Lisäksi olemme optimoineet mallin siten, että sen aiheuttama vamma on keskisuuri verrattuna useisiin aikaisemmin julkaistuihin malleihin mutta se tuottaa toistettavan vaurion, jolla on mahdollista nähdä lääkehoitojen vaikutus luotettavasti.

Osahanke 2 (pilotti- vaihe)	hiiri	+	50/74, koko osahank- keelle arvi- oitu määrä 230, josta käytetty 74	4/3	Selän leikkausoperaatiosta aiheutuva kipu.	Ks. osahanke 1.
-----------------------------------	-------	---	--	-----	---	-----------------

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
Pesämateriaali	X	X	X	X
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	X
Hyvät leikkaustekniikat	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	Lääkeaineiden tehon testaaminen lihasdystrofian prekliinisissä malleissa	
Hankeluvan kesto	Kolme vuotta	
Avainsanat	Lääkeainetestaus, lihasdystrofia, prekliiniset tautimallit	
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)	Lihasdystrofiasairauksien hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lääkehoitoja. Sairauksista aiheutuu potilaille hyvin vakavia oi- reita ja kärsimystä sekä yhteiskunnalle huomattavia kustannuk- sia. Yritys tarjoaa lääkekehitysteollisuudelle in vivo -eläinmalleja lupaavien lääkeaineiden prekliiniseen testaukseen sairauksissa, joihin ei ole olemassa hoitomuotoja. Tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä kliinisiin kokeisiin.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja lihasdys- trofiasairauksiin. Tutkimusmallien käyttö edistää myös geenivir- heiden mekanismien ja vaikutusten ymmärtämistä eri sairauk- sissa, mikä edesauttaa uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri, 2 400 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Tutkimuksessa käytettävillä hiirikannoille kehittyy geenivirheen vuoksi lihasdystrofia, jota voidaan vahvistaa kardiotoksiini-an- nostelulla. Eläimelle aiheutuu haittaa toistuvista tutkittavan ai- neen annosteluista, lihaskuntoa mittaavista käyttäytymistes- teistä, verinäytteiden otosta ja toistuvista 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 lää- kkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä ko- keita, tällä hetkellä mikään in vitro tai in silico lähestymistapa ei pysty ennustamaan lääkeaineen tehoa ja/tai turvallisuutta. In vitro ja in silico mallit tukevat ja voivat auttaa koe-eläin tutki- musten suunnittelussa ja ennustamisessa.	

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 ilmiäisy (fenotyyppi) jonka tulee olla sekä perinnöllisesti relevantti että oireistoltaan/patologialtaan ihmissairautta kuvaava. 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 ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Kokeesta aiheutuvaa haittaa vähennetään huolellisella seurannalla ja aikaisilla lopetuskriteereillä. Toistuvissa injisoinneissa kiinnitetään erityistä huomiota eläimen reagointiin ja mahdollisiin reaktioihin pistoalueella.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 30.11.2018. Arviointi ESAVI 13.9.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli testata uusien kehitettävien lääkeaihioiden tehoa lihasdystrofiasairauksien kokeellisissa eläinmalleissa hiirillä. Tavoitteena oli edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä klinisiin kokeisiin potilailla. Käytetyt mallit ovat tieteellisessä yhteisössä ja kirjallisuudessa laajasti hyväksytyjä ja käytettyjä toistettavuutensa ja ennustettavuutensa vuoksi.

Tutkimusmallit toimivat odotetusti ja niiden avulla voitiin arvioida luotettavasti testattujen lääkeainekandidaattien tehoa. Tutkimusmallit soveltuvat hyvin tähän tutkimukseen.

2. Millaista haittaa?

Hankkeessa eläimiä lääkittiin kirurgisia annostelutekniikoita käyttäen ainoastaan yhdessä tutkimuksessa (annostelumäärä: i.c.v.: 8 kpl). Muissa kokeissa eläimiä lääkittiin systeemisesti (annostelumäärät maksimissaan: s.c.: 88 kpl, i.p.: 93 kpl, i.v.: 18 kpl). Eläimille suoritettiin käyttäytymistestejä, kuvantamismittauksia niitä otettiin verinäytteitä kokeen aikana. Kokeen loputtua eläimet lopetettiin ja niitä otettiin kudos- ja verinäytteitä. Juoksumattotestiä käytettiin yhdessä tutkimuksessa (48 hiirtä). Hiiriä testattiin juoksumattotestissä yhden mittauksen aikana n. 30 min ajan. Testissä hiiriä aktivoitiin sähköshokeilla. Tutkimuksessa käytetyistä hiiristä n. 70-80% sai testin aikana maksimaalisen sähköshokkilukumäärän. Sinänsä sähköshokeilla ei ollut silminnäkävää vaikutusta eläinten hyvinvointiin. Itse tutkimusmalleista (transgeenisen kannan fenotyyppi) tai muista käytetyistä menetelmistä (lääkintä, käyttäytymistestit, kuvantamismittaukset, näytteenotto) aiheutui eläimille

tyypillisesti korkeintaan lievää-kohtalaista haittaa. Ainoastaan juoksumattotestissä voidaan arvioida eläimille aiheutuneen vakavaa haittaa sähköshokkien korkeasta lukumäärästä johtuen. Testin jälkeen eläinten hyvinvoinnissa ei kuitenkaan havaittu ongelmia. Eläimiä ei jouduttu lopettamaan varsinaiseen eläinmalliin (transgeenisen kannan fenotyyppi) liittyvien hyvinvointiongelmien takia.

Vakavimmat haitat olivat tyypillisesti tutkimuslääkkeiden sivuvaikutuksista johtuvia. Lääkinnän seurauksena eläimiä löydettiin kuolleena tai ne jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella. Haitallisia sivuvaikutuksia (eläin liikkumaton, eläimellä hengitysvaikeuksia, häntävaurio i.v.-lääkinnässä) pyrittiin vähentämään pienentämällä tutkittavan lääkkeen annosta tai lääkeaineen konsentraatiota ja tarvittaessa keskeyttämällä lääkkeen annostelu kokonaan. Hankkeessa löytyi kuolleena eri syistä johtuen 99 eläintä.

Hiiriä menetettiin myös tapaturmaisesti teknisesti epäonnistuneen lääkinnän seurauksena, kuvantamismittauksissa anestesian aikana ja päähän kiinnitettyjen kanyylien irtoamisen takia, mistä syystä eläimiä jouduttiin lopettamaan. Yhteensä hankkeessa lopetettiin lopetuskriteerien perusteella.

3. 3R-mahdollisuudet

Lupakauden aikana suoritettiin yksi tutkimus, jossa annostelun suorittamiseen tarvittiin kirurgisia menetelmiä infuusiokanyylien kiinnittämiseksi kallon pintaan dentaalisementillä. Tutkimuksen aikana kanyyli/dentaalisementtielementtejä irtosi useilta hiiriltä ja eläimiä jouduttiin tämän takia lopettamaan. Pähän kiinnitettyjen infusointikanyylien irtoamista pyritään tulevaisuudessa projekteissa vähentämään kuivaamalla ja karhentamalla kallon pintaan ennen dentaalisementin laittamista.

Käytetyt eläinmäärät ovat pitkälti koeasetelmasta 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 ja niiden pohjalta tehtyihin voima-analyysihin tarvittavasta ryhmäkoosta.

Joillakin tutkittavilla lääkeaineilla havaittiin kokeessa haitallisia sivuvaikutuksia ja kuolleisuutta. Tutkimuksen aikana lääkeaineen annosta laskettiin ja annosteltavan lääkeaineineen konsentraatiota laskettiin sivuvaikutusten vähentämiseksi. Tutkimuslääkkeen annostelu lopetettiin tarvittaessa kokonaan, jos sivuvaikutukset eivät muilla toimenpiteillä hävinneet. Varsinaista tutkimusta ei kokonaisuudessaan kuitenkaan jouduttu lopettamaan.

Sähköshokkien käytöstä juoksumattotestissä on luovuttu seuraavassa hankeluvassa. Sen sijaan eläimiä aktivoidaan jatkossa tarvittaessa kevyillä maalauspensselin kosketuksilla.

Kokeissa työskentelevä henkilökunta on koulutettua. Ennen pääsyä eläintyöhön työntekijät perehdytetään yrityksen toimintatapoihin. Jokainen operaation tekijä on suorittanut näytön kustakin tekniikasta harjoittelujakson päätteeksi. Vain hyväksytysti näytön suorittaneet voivat suorittaa toimenpiteitä eläimille. Kullekin tekniikalle on määrätty oma vastuulaboranttinsa. Lisäksi kaikki eläintyötä tekevät teknikot ja tutkijat osallistuvat vuosittain yrityksen järjestämään eläinten hyvinvointikoulutukseen, jonka teema vaihtelee vuosittain.

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?
Koko hanke	Hiiri	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja koikeista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lääkeainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	Arvioitu 2400 / Tosiasiallinen 2044	Vakava 291*/ Kohtalainen 1557/ Lievä 191/ Ei toipumista 5	Vakava: Vakavimmat haitat olivat tyypillisesti tutkimuslääkkeiden sivuvaikutuksista johtuvia. Lääkinnän seurauksena eläimiä löydettiin kuolleina tai ne jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella. Hiiriä löydettiin kuolleena yhteensä 99 kpl. Hiiriä menehtyi tapaturmaisesti teknisesti epäonnistuneen lääkinnän seurauksena (7 kpl*), kuvantamismittauksissa anestesian aikana (15 kpl) ja lääkeaineiden sivuvaikutusten takia (73 kpl*). Kaikkien hiirten kuolinsyytä ei pystytty varmuudella selvittämään (4 kpl). Hiiriä jouduttiin lopettamaan yhteensä 183 kpl. Hiiriä lopetettiin johtuen lääkintään liittyvistä häntävaurioista (28 kpl i.v.-lääkityillä hiirillä*), päähän kiinnitettyjen kanyylien irtoamisen takia (20 kpl) ja lääkeaineen sivuvaikutusten takia (104 kpl*).	Lupakauden aikana suoritettiin vain yksi tutkimus, jossa annostelun suorittamiseen tarvittiin kirurgisia menetelmiä. Päähän kiinnitettyjen infusointikanyylien irtoamista pyritään vähentämään kuivaamalla ja karhentamalla kallon pintaan ennen dentaalisementin laittamista. Testiryhmien koko pyritty minimoimaan aikaisempien tutkimusten tulosten ja voima-analyyysien perusteella. Lääkeaineiden turvallisuuteen liittyen pyritään asiakkaalta saamaan kaikki mahdollinen tieto, jolla voidaan vähentää lääkkeen annosteluun liittyviä

				Osa hiiristä jouduttiin lopettamaan (31 kpl*) muiden syiden johdosta (lääkintävirheet, ihovauriot, huonokuntoisuus) lopetuskriteerien täyttyessä. Itse tutkimusmalleista tai muista käytetyistä menetelmistä aiheutui eläimille tyyppisesti kohtalaista haittaa. Yhdessä kokeessa (48 hiirtä*) eläimiä testataan juoksumattotestissä, jossa eläinten aktivoimiseksi käytettiin mietoja sähköshokkeja. Näiden eläinten kohdalla haitan taso voidaan arvioida vakavaksi. Eläimiä ei jouduttu lopettamaan varsinaiseen eläinmalliin (fenotyyppi) liittyvien hyvinvointiongelmien takia. *vakava haitta	mahdollisia eläimen hyvinvointia vaarantavia tekijöitä. Tutkimuksen aikana lääkeaineen annosta laskettiin ja annosteltavan lääkeaineineen konsentraatiota laskettiin sivuvaikutusten vähentämiseksi. Tutkimuslääkkeen annostelu tarvittaessa lopetettu, jos sivuvaikutukset eivät ole muilla toimenpiteillä hävinneet. Sähkösockkien käytöstä juoksumattotestissä on luovuttu seuraavassa hankeluvassa. Sen sijaan eläimiä aktivoidaan jatkossa tarvittaessa kevyillä maalauspensselin kosketuksilla.
--	--	--	--	--	--

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
Kirurgisten tekniikoiden validointi infuusiokanyylien irtoamisen vähentämiseksi	x	x	x	-
Lääkeaineen annostelun muuttaminen (annoksen vähentäminen, lääkeaineen laimentaminen)	x	x	x	-
Sähköshokin korvaaminen esim. maalipensselillä kosketuksella	x	x	x	-
Riittävä koulutus ja perehdytys	x	x	x	-
Validaatiot, pilotointi ja voima-analyysien tekeminen	x	x	x	-

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

Hankkeen nimi	Lääkeaineiden farmakodynamiikan ja farmakokinetiikan tutkiminen kirurgisesti indusoiduissa neonataali hypoksia/iskemian prekliinisissä tautimalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Aivoverenkiertohäiriöt, hypoksia, hypotermia, 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)	Vastasyntyneiden ja kehittyvien aivojen verenkiertohäiriöiden ja siitä aiheutuviin vaikeavammaisuuden hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lääkeaineita ja tällaisista taudeista koituu sekä yksilölle että yhteiskunnalle huomattavaa haittaa ja kustannuksia. Vastasyntyneiden tai lapsivuodeikästen aivosairauksien mallintaminen jyrsijöillä on ensisijainen keino uuden lääkeaineen tehon, mekanismien ja turvallisuuden tutkimiseen ennen ihmisillä tehtäviä kliinisiä kokeita. Tässä tutkimuksessa käytetään in vivo eläinmalleja lupaavien lääkeaineiden prekliiniseen testaukseen Tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä kliinisiin kokeisiin. Käytettävät prekliiniset tautimallit ovat tieteellisessä kirjallisuudessa laajasti kuvattuja ja käytettyjä toistettavuutensa ja ennustettavuutensa vuoksi. Tästä johtuen mallit ovat myös lääketeollisuudessa laajalti käytettyjä malleja arvioitaessa kehitteillä olevien lääkeaineiden tai terapioiden tehoa aivosairauksia ja perifeerisiä verenkiertohäiriöitä vastaan.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja vastasyntyneen/lapsivuodeikäisen (neonataali) aivojen hapenpuutteen ja verenkiertohäiriöiden aiheuttamiin keskushermoston sairauksiin.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Rotta, 1080	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille koituu kipua kirurgisesta toispuoleisen aivovaurion indusoimisesta, hypotermiahoidosta, tutkittavien lääkeaineiden annosteluista aivoihin ja systeemisesti sekä kuvantamisista. Poikaset kärsivät motorisista ja sensorisista häiriöistä aivovaurion seurauksena. Tutkimuksen 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 aivojen hapenpuutteen ja verenkiertohäiriöiden, tutkimiseksi ovat hyvin rajalliset johtuen monimuotoisuudesta ihmispopulaatioissa. Tästä johtuen sairauden mallintaminen luotettavasti vaatii useita malleja eri lajeissa ja niiden kan-noissa. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä tur-vallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä kokeita. In vitro kokeet ovat hyvin rajallisia joh-tuen tutkimusmenetelmien yksinkertaisuudesta verrattuna ni-säkkään koko fysiologiaan. Myöskään tietokonepohjaiset simu-laatiot eivät sovellu kyseisissä malleissa lääkeaineen tehon tes-taamiseen, johtuen lukuisista sairauden vakavuuden osateki-jöistä.
2. Vähentäminen Kuinka on varmistettu, että eläi-miä 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 sisäi-nen variaatio minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määritte-lee tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi) ja joka määrittää koe-eläinten käytön määrän kussakin koeasetel-massa. Perusteellisen validaatiotyön ja tilastollisen voima-ana-lyysin perusteella voidaan luotettavasti ennustaa soveltuvat ryhmäkoot, jotka minimoivat eläinten käytön alimpaan mah-dolliseen ilman että koeasetelman tilastollinen voima vaaran-tuu.
3. Parantaminen a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on pa-ras tieteellisten tavoitteiden kan-nalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	3. Refinement Suurin osa aivojen hapenpuutteen ja verenkiertohäiriöiden eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä, sekä hiirissä että rotissa. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille lää-kkeille ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaati-oon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat kohtalaiset. Ne ovat kuitenkin niin tieteellisen yhteisön kuin lääketieteellisuu-den hyväksymiä menetelmiä tutkia näitä sairauksia. Alemmilla selkärankaisilla tai in vitro -menetelmin ei voida saada saman-laista tietoa uusien lääkeaineiden tehosta. Tämän lisäksi näistä menetelmistä ei ole saatavissa tietoa tällä hetkellä käytettyjen lääkeaineiden vasteista, joita voitaisiin käyttää verrattaessa uu-sista lääkeaineista saatavia tuloksia. Käsittelyistä aiheutuvaa ki-pua lievennetään kipulääkityksellä. Kokeessa käytetään mah-dollisimman aikaisia lopetuskriteerejä.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 23.4.2019, arviointi ESAVI 13.9.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli testata uusia tehokkaita hoitomuotoja vastasyntyneiden ja kehittyvien aivojen verenkiertohäiriöihin ja niistä aiheutuvaan vaikeavammaisuuden hoitoon kokeellisissa eläinmalleissa. Tavoitteena oli edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä kliinisiin kokeisiin potilailla. Toisena tavoitteena oli kehittää itse tutkimusmallin käyttöä, mikä edesauttaa uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.

Tutkimusmalli toimi odotetusti ja sen avulla voitiin arvioida luotettavasti testattujen lääkeainekandidaattien ja hoitomuotojen tehoa. Käytettävät eläin- ja tutkimusmallit soveltuvat tähän tutkimukseen.

2. Millaista haittaa?

Eläimille koitui kipua kirurgisesta toispuoleisen aivovaurion indusoimisesta, hypotermiahoidosta, tutkittavien lääkeaineiden annosteluista aivoihin ja systeemisesti sekä kuvantamisista. Poikaset kärsivät motorisista ja sensorisista häiriöistä aivovaurion seurauksena. Tutkimuksen päätteeksi eläimet lopetettiin.

Kuolleisuuden syitä:

- Hypoksian aikaiset komplikaatiot
- Poikasten pieni lähtöpaino ennen leikkausta
- Aivovaurion laajuus
- Anoreksia operaation jälkeen, paino ei kehittynyt normaalisti tai maitopilkkua ei havaittu
- Osaan kuolemista ei löydy selittävää syytä

3. 3R-mahdollisuudet

Seuraavia keinoja ja menetelmiä on kehitetty ja sovellettu eläinmäärän, kuolleisuuden ja stressin vähentämiseen sekä hyvin voinnin parantamiseen.

- Emojen käsittely ennen synnytystä, jotta emot tottuvat ihmiseen ja ovat rauhallisempia poikasia käsiteltäessä
- Poikasmäärän karsiminen 10–12 poikaseen / emo, mikä vähentää operaation jälkeistä kuolleisuutta ja samalla operoitujen pentujen määrää
- Poikasia karsittaessa valitaan henkiin jääviksi poikueen isoimmat poikaset, jotka todennäköisemmin selviävät iskemiasta. Kuitenkin niin, että kuhunkin poikueeseen jätetään suurin piirtein yhtä paljon uroksia ja naaraita
- Osa poikueesta jätetään operoimatta (1-2 pentua) silloin kuin koeasetelma sen sallii, jolloin emoilla on aina poikasia seuranaan ja niiden suhtautuminen operoituihin poikasiin säilyy normaalina. Muutoin emolla on aina seuranaan 1 tai useampi operoitu poikainen.

- Suurin osa kokeista oli kestoaltaan vain noin viikon verran, ainoastaan 1 tehdyistä kokeista kesti 21 päivän ikään saakka
- Huonokuntoisten poikasten tukihoito; terveemmät pennut siirretään ajoittain pois emon luota lämpömatolle, jolloin kilpailu paremmista nistä on vähäisempää

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?
Neonataali hypoksia/is-kemia	Rotta	Käytetyt tutkimusmallit toimivat odotetusti ja koikeista saatiin luotettavia tuloksia. Testattujen lääkeainekandidaattien tehoa pystyttiin arvioimaan luotettavasti.	1080/564	Ei toipumista; 10 (kuollut iskemian aikana), Lievä; 24 (naiivit eläimet, tässä luvussa ei ole huomioitu rottia, joille ei ole tehty toimenpiteitä), Kohtalainen; 20 (Sham operoidut eläimet), Vakava; 510 (Iskemia)	Vakava; Haitta on mallista johtuva. Tehdyissä kokeissa kuoli 115 rottaa ja lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 70 rottaa. Kuolleisuuden syitä: - Hypoksian aikaiset komplikaatiot - Poikasten pieni lähtöpaino ennen leikkausta - Aivovaurion laajuus - Anoreksia operatiion jälkeen, paino ei kehittynyt normaalisti tai maitopilkkua ei havaittu - Osaan kuolemista ei löydy selittävää syytä	Emojen käsittelyn lisääminen ja emojen totuttaminen ihmiseen ennen synnytystä, jolloin emojen kokema stressi on vähäisempää ja ne hoitavat poikasia paremmin. Poikasmäärän rajaaminen 10–12 poikaseen emoa kohti varmistaa sen, että kaikki poikaset saavat riittävästi ravintoa ennen operaatiota, jolloin ne selviävät leikkauksesta paremmin ja toipuvat nopeammin. Operoitaviksi valitaan poikueen painavimmat yksilöt, sillä lähtöpainolla näyttäisi olevan yhteys selviytymiseen. Osa poikueesta jätetään operoimatta (1-2 pentua) silloin kuin koeasetelma sen sallii, jolloin emoilla on aina poikasia seuranaan ja niiden suhtautuminen operoituihin poikasiin säilyy normaalina. Muutoin emolla on aina seuranaan 1 tai useampi operoitu poikanen. Huonokuntoisten poikasten tukihoito; terveemmät pennut siirretään ajoittain pois emon luota lämpömatolle, jolloin kilpailu paremmista nisistä on vähäisempää.

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 raportoidaessa
Aikaisempi päätepiste	X	-	-	-
Lyhyempi seuranta-aika	X	X	-	-
Pesämateriaali ja kuivikkeet	X	X	X	-
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	-
Totuttaminen	X	X	-	-
Poikueiden karsiminen	X	X	-	-
Riittävä koulutus ja perehdyttäminen	X	X	X	-
Validaatiot ja pilotointi	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	Neurodegeneraatio ja neurorestoraatio	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	hermorappeuma, hermokasvutekijä, aivosairaus	
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)	Hermosolujen akuuttia kuolemaa tai toimintakyvyn heikenty- mistä aiheuttaviin ihmisen hermorappeumasairauksiin tai aivo- sairauksiin ei ole olemassa hoitoa, joka pysäyttäisi hermorap- peuman tai palauttaisi hermosolujen toimintakyvyn. Tutkimuk- semme tavoitteena on kehittää lääkehoito hermosolujen tai hermoratojen toimintakyvyn palauttamiseksi.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Hemorappeumasairauksiin tai aivosairauksiin, joissa hermoso- lujen toimintakyky on heikentynyt, ei ole olemassa lääkehoitoa joka palauttaisi hermosolujen tai hermoratojen toimintakyvyn. Mikäli onnistumme tavoitteessamme, tulemme mullistamaan aivosairauksien hoidon sekä kansallisesti maamme lääketeolli- suusrakenteen. Onnistuessamme lääketeollisuuden osuus brut- tokansantuotteestamme tulee olemaan moninkertainen nykyi- sestä. Ennen kaikkea ikääntymiseen liittyvät hermosairaudet ovat lisääntymässä, ja tutkimuksestamme tulevat hyötymään tu- levaisuudessa Parkinsonin tautia, aivoinfarktia, ALS:ää tai aivo- vaurioita sairastavat potilaat.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri 4080, rotta 3480 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu kohtalaista haittaa kirurgisista toimenpiteistä sekä indusoiduista tautimalleista. Toimenpiteiden aiheuttama kipu on lyhytaikaista. Huntingtonin taudin eläinmallissa joudu- taan käyttämään niin myöhäistä lopetuspistettä, että eläin voi joutua kokemaan vakavaa motorista haittaa. Eläimet lopetetaan kokeiden päätyttyä. Vakavuusluokat: kohtalainen ja vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Tutkimuksestamme käytetään rinnakkain soluviljelmiä aina kun se on mahdollista. Soluviljelmät ovat kuitenkin äärimmäisen keinotekoisia tutkimusympäristöjä, eikä niillä pystytä tutkimaan	

	esimerkiksi hermoratojen tai hoidon vaikutusta eläinten toiminnalliseen toipumiseen.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Kokeet suunnitellaan ja toteutetaan huolellisesti ammattilaisten toimesta. Käytämme yleisesti hyvin toimiviksi osoittautuneita metodeja, jotka hallitsemme hyvin. Käytämme tutkimuksissamme mahdollisimman vähän, mutta riittävän määrän eläimiä, jotta saamme tarvittavan luotettavuuden tuloksiimme sekä riittävän tilastollisen voiman.
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) Käyttämämme rotta- ja hiirimallit ovat parhaita saatavilla olevia tautimalleja. Biologialtaan alemmat eläimet eivät sovellu hermorappeumasairauksien tautimalleihin eikä niitä käyttämällä päästä luotettaviin tuloksiin, joiden perusteella voisi tehdä kliinisiä potilaskokeita. Luotettavimmat mallit, jotka johtaisivat parempaan translaatioon potilaisiin, vaatisivat apinoilla tehtäviä kokeita. b) Hiirten ja rottien käyttö tutkimuksessa on perusteltua erityisesti geenimuunneltujen linjojen takia, sillä hermorappeumasairauksien taustalla on useita geneettisiä riskitekijöitä. Parkinsonin taudin ja aivoinfarktin tautimallina rotta on kokemussemme perusteella hiirtä parempi. c) Kaikki kirurgiset toimenpiteet suoritetaan anestesiassa ja riittävästä kipulääkityksestä huolehditaan sekä toimenpiteen aikana että sen jälkeen. Eläimiä tarkkaillaan huolellisesti kokeiden aikana ja jos eläimen havaitaan kärsivän, se lopetetaan. Käyttämässämme malleissa kipu liittyy leikkaukseen ja mikäli koe-eläin edelleen kokee kipua leikkauksen jälkeen, se lopetetaan.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TAKAUTUVA ARVIOINTI

Saapumispvm: 31.5.2019, arviointi ESAVI 12.9.2019.

1) Miten hankkeen tavoitteet on saavutettu?

Hankkeen tavoitteet on saavutettu hyvin. Tulosten perusteella olemme tehneet useita keksintöilmoituksia, 3 patenttihakemusta, 4 väitöskirjaa sekä julkaisseet 26 vertaisarvioitua julkaisua.

2) Eläimille aiheutettu haitta, mukaan lukien käytettyjen eläinten määrät ja lajit sekä toimenpiteiden tosiasiallinen vakavuus

Luvalla oli 4080 hiirtä ja 3480 rottaa josta käytettiin yhteensä 3305 eläin. Näistä 3305 eläimestä rottia oli 1543 ja hiiriä 1762 kpl. Alla olevassa taulukossa on eri vakavuusasteet ja eläinlajit on taulukoitu alla.

Luokka	Hiiri	Rotta
SV1 – Ei toipumista	138 (4 kpl GS2, 0 kpl GS3)	6 (0 kpl GS2, 0 kpl GS3)
SV2 - Lievä	1131 (215 kpl GS2, 0 kpl GS3)	1042 (30 kpl GS2, 0 kpl GS3)
SV3 - Kohtalainen	275 (51 kpl GS2, 0 kpl GS3)	463 (5 kpl GS2, 0 kpl GS3)
SV4 - Vakava	200 (22 kpl GS2, 97 kpl GS3)	20 (1 kpl GS2, 0 kpl GS3)

GS2 = ei-haitallinen geenimuunnos, GS3 = haitallinen geenimuunnos

3) Kaikki seikat, jotka saattavat edistää korvaamisen, vähentämisen ja parantamisen periaatteen toteuttamista

Kokeiden hyvällä suunnittelulla, tutkijoiden koulutukseen panostamalla sekä pitkäjänteisellä laatutyöllä olemme pystyneet toteuttamaan 3R periaatetta. Lisäksi olemme tehneet paljon yhteistyötä koe-eläinkeskuksen työntekijöiden kanssa, ja lisäämällä kommunikaatiota olemme pystyneet parantamaan eläinkokeiden laatua. Koska meidän tutkimuksessa on paljon nuoria väitöskirja- ja maisteriopiskelijoita on tämä prosessi jatkumo.

3R tavoitteet on myös saavutettu hyvin ja olemme voineet vähentää koe-eläinten käyttöä hyvällä suunnittelulla sekä tekemällä osan kokeista soluviljelyä apuna käyttäen. Parantamalla käytettyjä menetelmiä olemme edelleen kehittäneet käytänteitämme ja aivoinjektoiden laatua, joka jo sinällään vähentää tarvittavien eläinten määrää per ryhmä. Olemme vähentäneet eläinten kokemaa kipua käyttämällä pidempikeskitoista paikallispuudutetta (bupivakaiini) lidokaiinin sijaan sekä parantamalla eläinten seuranta. Parkinsonin tautimalleissa meillä kuoli muutamia eläimiä d-amfetamiinilla pyörittämisen jälkeen, ja patologin tutkimuksen perusteella eläimet olivat kuolleet sydämen vajaatoimintaan ja tästä seuranneeseen keuhk kongestioon ja kardiogeeninen keuhkoödeemaan. Pienentämällä annettavaa d-amfetamiini annosta 2.5 mg/kg:sta 2.25 mg/kg, nesteyttämällä rottia saliinilla sekä huolehtimalla huoneen paremmasta ilmanvaihdosta, olemme päässeet tilanteeseen jossa rottia ei ole enää kuollut. Lisäksi olemme kiinnittäneet erityistä huomiota leikkauksien yhteydessä instrumenttien puhtauteen ja tällä tavalla vähentäneet infektiota.

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	Akuutit toksisuuskokeet kemikaalien turvallisuuden arviointia varten	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	kemikaali, akuutti, toksisuus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä,Ei
	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)	Viranomaiset vaativat turvallisuusarvioinnin kaikista uusista sekä jo käytössä olevista lääkkeistä ja kemikaaleista suojellakseen ihmisiä, eläimiä ja ympäristöä kemikaalien haittavaikutuksilta (REACH) EU:n alueella. Turvallisuusarviot tehdään keräämällä tietoa kemikaalin ominaisuuksista ja sen vaikutuksista in vitro ja in vivo saatavien tulosten perusteella. Testien suorittamisesta on olemassa OECD-viranomaisten laatimat ohjeistot, joita tulee noudattaa. Akuuttien toksisuuskokeiden tarkoituksena on löytää kemikaalin alin annostaso, jonka kerta-annos aiheuttaa haittaa iholle, silmiin tai elimistöön tarkoituksella tai vahingossa annettuna. Eläinkokeissa täytyy käyttää vähintään kolmea eri annostasoa, joista alimmalla tasolla aiheutuvaa haittaa ei ilmene tai se on hyvin lievä ja ylimmällä tasolla saadaan esiin jonkin asteisia haittavaikutuksia, jotta voidaan määrittää sallittu päivittäinen enimmäisannos. Väärä negatiivinen tulos saattaa olla tuhoisa. Tämä hanke koskee akuutin toksisuuden koejärjestelmiä, joilla tutkitaan testiaineen vaikutusta eri annostasoilla käyttäen eri annostelureittejä (eri osahankkeina hakemuksessa), jotta voidaan määrittää vuorokausiannoksen turvarajat ja teoreettinen LD50-arvo kuvaamaan kemikaalin haittaluokitusta. Testien suorittamisesta on olemassa OECD-viranomaisten laatimat ohjeistot, joita tulee noudattaa. Tämä lupahakemus koskee kemikaalien turvallisuusarvioinnissa käytettäviä akuutin toksisuuden testejä (OECD 402, 404, 405, 420 ja 425), joita tehdään tutkimuspalveluina asiakkaille. Viranomaiset tarkastavat tutkimuksen kaikki vaiheet ja varmistavat, että tutkimus on tehty OECD:n GLP-laatuja järjestelmän mukaisella tavalla.	

Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	Akuutin toksisuuden koejärjestelmillä tutkitaan testiaineen vaikutusta eri annostasoilla käyttäen eri annostelureittejä jotta voidaan määrittää vuorokausiannoksen turvarajat ja teoreettinen LD50-arvo kuvaamaan kemikaalin haittaluokitusta.
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Rotta 500, hiiri 300, kaniini 500, marsu 500 eläintä
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Annostasot valitaan siten, että suurimmalla annoksella saadaan esiin toksisia oireita ja pienin annostaso aiheuttaa korkeintaan lieviä oireita, joista eläin toipuu kokeen seurantajakson aikana. Suurimmat annostasot oraalisenä kerta-annoksena saattavat aiheuttaa pahimmillaan eläimen äkillisen kuoleman. Tämä on mahdollista, mutta ei tarkoituksellista, osahankkeen 4. (OECD 420) pilottitesteissä ja osahankkeessa 5. (OECD 425). Osahankkeet 1. - 3. Iho- ja silmä-ärsytystestit saattavat aiheuttaa eläimelle kipua ja kärsimystä. Eläimet saavat kuitenkin kipulääkettä pre-emptiivisesti ja sen antamista jatketaan tarpeen mukaan. Määrätyn seuranta-ajan kuluttua eläimet lopetetaan makro- ja mikroskooppista patologista tutkimusta varten. 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?	Viranomaiset edellyttävät akuutin toksisuuden varmistamiseen aina eläinkokeen, jos kemikaalin/lääkkeen saatavilla olevien taustatietojen tai in vitro-tulosten perusteella ei ole mahdollista määrittää ao kemikaalin/lääkkeen käytölle turvallista päivittäistä kerta-annosta eri reittien kautta annosteltuna tai määrittää sen haittaluokitusta. Akuutin dermaalisen toksisuuskokeen (OECD 402) tarkoituksena on määrittää ihon kautta annettavan kerta-annoksen toksiset vaikutukset elimistössä käyttäen useita eri annostasoja. Mikäli testiaineen kerta-annostelu aiheuttaa ihoon ärsyyntymistä tai syöpymistä, varsinaista akuuttia ihon ärsyyntymis/syöpymistestä (OECD 404) ei enää tehdä. Akuutti iho- ja silmä-ärsytyskoetta (OECD 405) ei tehdä, mikäli aineen pH:n, happamuuden tai emäksisyyden perusteella tai aineista saadun aikaisemman tiedon pohjalta ei voida päätellä sen ärsyttävyyttä tai syövyttävyyttä. Mikäli testiaineen suurimmalla annoksella saadaan selvä ihoa ärsyttävä reaktio, silmä-ärsytys testiä ei tarvitse tehdä. Sekä ihoärsytys että silmä-ärsytys testi tehdään yhdellä eläimellä (kaniini) ja vakio-annoksella. Mikäli ärsytysreaktiota ei voida havaita, koe toistetaan kahdella uudella eläimellä. Kokeessa käytetään korkeintaan 3 eläintä, joita seurataan kahden viikon ajan. Koe keskeytetään heti jos voimakas reaktio on havaittavissa. Akuutti oraalinen toksisuustesti (OECD 420), jossa yleensä käytetään 3 eri annostasoa ja kontrollia, voidaan tehdä ns limit-testinä, jolloin tutkimuksessa on vain yksi annosryhmä ja kontrolliryhmä, mikäli kemikaalin odotetaan edeltävien testien ja

	taustatietojen perusteella olevan hyvin vähän toksinen (sen laskennallinen LD50 arvo on >2000 mg/kg). Akuutti oraalinen toksisuuskoe voidaan tehdä myös ns Up-and-Down menetelmällä (OECD 425), jolloin tarvittavien eläinten määrä voi jäädä edellistä koetyyppiä pienemmäksi, mutta kokeessa kuolee joitakin eläimiä testiaineen aiheuttamiin haittoihin. Testiainetta annostellaan vain yhdelle eläimelle ja annostasoa nostetaan logaritmisesti seuraaville eläimille, kunnes saavutetaan toksinen taso, jolla eläin kuolee äkillisesti testiaineen kerta-annoksen saatuaan tai sairastuu niin vakavasti, että se joudutaan lopettamaan (moribund). Logaritmisesti vuoroin nousevilla ja laskevilla annoksilla haetaan eläin kerrallaan annostaso, jolla kuolee tai joudutaan lopettamaan yhteensä 3 eläintä. LD50 arvo määritetään laskennallisesti.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	OECD-ohjeissa olevia eläinmääriä tulee noudattaa. Esikokeiden avulla varmistetaan että varsinaisessa kokeessa käytettävät annokset on valittu siten, että niillä saavutetaan luotettava tulos.
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) OECD ohjeiden mukaan, testiaineesta riippuu mikä ohjeessa annetuista lajeista valitaan b) OECD ohjeiden mukaan valitaan laji, jolla saadaan todennäköisimmin luotettava tulos c) Tutkimukseen liittyy oleellisesti eläinten kliinisten oireiden intensiivinen tarkkailu. Suurimmilla annoksilla eläimille voi aiheutua hyvinvointia vakavastikin haittaavia toksisia oireita ja odottamattomia kuolemia kesken kokeen. Selvästi kivuliaat ja moribundit eläimet lopetetaan heti kun tilanne havaitaan, joten eläinten kokema mahdollinen kärsimys jää lyhytaikaiseksi. Sekä ihoärsytykselle että silmä-ärsytykselle on kehitteillä korvaavia menetelmiä, mutta niitä ei vielä ole virallisesti hyväksytty eivätkä viranomaiset toistaiseksi hyväksy pelkästään niiden käyttöä turvallisuusarviointiin. Mikäli in vitro kokeessa ei saada toksista reaktiota esiin, tulokset täytyy varmentaa in vivo-mallilla. Koe keskeytetään heti ja testiaine huuhdellaan iholta tai silmästä, jos sen havaitaan aiheuttavan voimakasta kipua eläimelle.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TAKAUTUVA ARVIOINTI

Saapumispvm: 11.11.2019, arviointi ESAVI 5.12.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Mitä tavoitteita hankkeella oli?

Tämän hankkeen tavoitteena oli tuottaa luotettavasti ja OECD viranomaisten laatimien ohjeiden mukaisesti tietoa kemikaalien turvallisuudesta. Suoritimme tämän hankeluvan alla useita tutkimuksia, joiden tavoitteena oli edistää projektien/yhdisteiden etenemistä seuraaviin prekliinisiin ja kliinisiin tutkimuksiin. Osa tutkimuksista suoritettiin myyntiluvan hakemista tai uusimista varten.

Miten näiden saavuttamisessa onnistuttiin?

Viranomaiset (FIMEA) ovat tarkastaneet tutkimuksen kaikki vaiheet ja varmistaneet, että tutkimus on tehty OECD:n GLP-laatujärjestelmän mukaisella tavalla. Testit onnistuivat odotetusti.

Onko käytetty eläinmalli sopiva tähän tutkimukseen?

Testeissä käytetyt eläinmallit valittiin ICH ja OECD-ohjeiden mukaisesti. Olemme käyttäneet rottia ja kaniineja, koska ne mallintavat hyvin ihmisen fysiologiaa.

Mitä tavoitteita hankkeella oli?

Tämän hankkeen tavoitteena oli tuottaa luotettavasti ja OECD viranomaisten laatimien ohjeiden mukaisesti tietoa kemikaalien turvallisuudesta. Suoritimme tämän hankeluvan alla useita tutkimuksia, joiden tavoitteena oli edistää projektien/yhdisteiden etenemistä seuraaviin prekliinisiin ja kliinisiin tutkimuksiin. Osa tutkimuksista suoritettiin myyntiluvan hakemista tai uusimista varten.

Miten näiden saavuttamisessa onnistuttiin?

Viranomaiset (FIMEA) ovat tarkastaneet tutkimuksen kaikki vaiheet ja varmistaneet, että tutkimus on tehty OECD:n GLP-laatujärjestelmän mukaisella tavalla. Testit onnistuivat odotetusti.

Onko käytetty eläinmalli sopiva tähän tutkimukseen?

Testeissä käytetyt eläinmallit valittiin ICH ja OECD-ohjeiden mukaisesti. Olemme käyttäneet rottia ja kaniineja, koska ne mallintavat hyvin ihmisen fysiologiaa.

2. Millaista haittaa?

Katso taulukko 1.

3. 3R-mahdollisuudet

Replacement:

Lääkeaineiden turvallisuuden testaukseen on kehitetty in vitro -menetelmiä, mutta esimerkiksi akuutin toksisuuden testeille ei ole vielä viranomaisten hyväksymiä korvaavia menetelmiä. Akuutti

iho- ja silmä-ärsytyskoe tehdään, mikäli aineen pH:n, happamuuden tai emäksisyyden perusteella tai aineista saadun aikaisemman tiedon pohjalta ei voida päätellä sen ärsyttävyyttä tai syövyttävyyttä (in vitro, in vivo ja ex vivo –tutkimukset). Ennen ärsytyskokeita varmistetaan, että koe on perusteltu, eikä eläimille aiheuteta turhaa kärsimystä. Mikäli jokin pohjatiedoista osoittaa, että testiaine on iholle tai silmään annosteltuna ärsyttävä tai syövyttävä, ei edetä tutkimuksissa pidemmälle. Iho- ja silmä-ärsytyskokeissa on ohjeistoissa kerrottu, mitä tutkimustietoa testiaineesta pitää olla, ennen kuin siirrytään eläinkokeisiin.

Reduction:

Kokeet tehdään aina pienimmällä mahdollisella viranomaisen hyväksymällä määrällä eläimiä.

Refinement:

Pilottitutkimuksella pientä eläinmäärää käyttäen varmistetaan oikea annos varsinaista koetta varten. Korkein annostaso valitaan siten, että kudostasolla saadaan osoitetuksi toksisuutta osoittavia muutoksia, joiden ei kuitenkaan oleteta aiheuttavan eläimissä vakavia ja kuolemaan johtavia kliinisiä oireita. Tutkimuksen aikana eläinten kliinisiä oireita tarkkaillaan tehostetusti päivittäin. Lopetuspiste ei ole eläimen kuolema, vaan jo kliinisten oireiden (painonlasku, piloerektio tms.) havaitseminen riittää tavoitteen saavuttamiseen.

Onko käytettävänä uusia vaihtoehtoisia menetelmiä eläinten käytön tilalle?

Lääkeaineiden turvallisuuden testaukseen on kehitetty in vitro -menetelmiä, mutta akuutin toksisuuden testeille ei ole vielä viranomaisten hyväksymiä korvaavia menetelmiä.

Voisiko toimenpiteiden toteuttamistapaa ja/tai hoitomenetelmiä edelleen kehittää?

Seuraamme in vitro ja in silico -tutkimusmenetelmien kehittymistä ja ohjeistojen päivittymistä turvallisuuden arvioinnissa. Käytämme vain viranomaisten hyväksymiä ja päivitettyjä tutkimusmenetelmiä. OECD:n ohjeistuksissa otetaan nykyään huomioon 3R periaatteet ja noudatamme näitä ohjeita.

Voisiko inhimillisiä lopetuspisteitä aikaistaa?

Kriteerit kuolemansairaille ja kärsiville eläimille on kuvailtu erillisessä OECD-ohjeistossa (Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.) Ohjeisto ottaa huomioon 3R:n periaatteet toksikologisissa tutkimuksissa.

Eläimiä tarkkaillaan säännöllisesti kokeen aikana ja mikäli koulutettu henkilökuntamme havaitsee kivun ja kärsimyksen merkkejä eläimet lopetetaan heti. Kuolema ei siis ole päätepiste.

Pitäisikö eläinmääriä muuttaa?

Kokeet tehdään aina pienimmällä mahdollisella viranomaisen hyväksymällä määrällä eläimiä. Pilottitutkimuksella pientä eläinmäärää käyttäen varmistetaan oikea annos varsinaista koetta varten.

Voisiko käytetyistä eläimistä saada enemmän tietoa hyödynnettäväksi?

Perinteisessä akuutin toksisuuden-kokeessa eläintä seurataan ja lopuksi tehdään vain makroskooppinen tarkastus avatulle eläimelle. Testiaineen tyypistä (single microdose) ja käyttötarkoituksesta riippuen on joissain tilanteissa (esimerkiksi first human dose-testi) mahdollista käyttää

kahden eri OECD:n tutkimusmenetelmän (repeated dose in two species ja acute dose in one species) sijaan vain yhtä eläinlajia ja testiä (ICH guideline M3(R2)). "Extended single dose toxicity" on esimerkki tutkimustyyppistä, jossa voidaan saada enemmän tutkimustietoa kuin perinteisessä akuutissa toksisuuskokeessa. Tässä "laajennetussa" kokeessa kerätään tietoa esimerkiksi histopatologisten tutkimusten avulla, tai eläimistä otetuista verinäytteistä voidaan analysoida erilaisia parametreja.

Olisiko keksityillä 3R-keinoilla laajempaa hyödynnettävyyttä?

Toksisuuskokeissa on tärkeää kouluttaa henkilökunta havaitsemaan kivun ja kärsimyksen merkkejä. Ennen testimenetelmien valitsemista on tärkeää keskustella viranomaisten kanssa ja valita testimenetelmä josta saadaan eniten tietoa.

Muuta

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: OECD 402 Akuutti dermaali toksisuus	-	-	-	Kohtalainen / -	-	- OECD ohjeiden vaatimia minimi eläinmääriä käytettiin osahankkeissa - Kokeen aikana eläinten hyvinvointi tarkistettiin tehostetusti ja kliiniset oireet kirjoitettiin "kliiniset oireet" lomakkeisiin - Eläinten totuttaminen toimenpiteisiin: eläinten punnituksen ja häkkien vaihdon yhteydessä rotat totutettiin käsittelyyn, esimerkiksi ottamalla suun kautta annostelun ote eläimen selästä - Seurasimme OECD:n päivitettyjä ohjeista (Updates on 3Rs methods for regulatory testing October 2019) jossa nykyään kiinnitetään enemmän huomiota 3R-periaatteisiin
OSAHANKE 2: OECD 404 Akuutti dermaali ärsytys/syövyttävyys	-	-	-	Kohtalainen / -	-	
OSAHANKE 3: OECD 405 Akuutti silmänärsytys/syövyttävyys	Kaniini	+	300/7	Kohtalainen / Kohtalainen	*Eläimillä ei havaittu vakavaa ärsytystä tai syöpymistä *Havaittiin lievää hyperemiaa *Havaittiin lievää sidekalvon punaisuutta *Havaittiin jonkin verran silmäluomien normaalista poikkeavaa turvotusta *Havaittiin lievää/kohtalaista kyynelesteen eritystä kaikilla eläimillä (myös kontrollieläimillä) * Eläimillä ei havaittu vakavia toksisia oireita, tai kuolleisuutta tutkimuksen aikana. *Yhtään eläintä ei tarvinnut lopettaa hyvinvointiongelman takia kokeen aikana.	

OSAHANKE 4. OECD 420 Akuutti oraalinen toksisuus – kiinteä annos	Rotta	+	2400/124	Vakava / lievä	*Testiaineen annostelun jälkeen eläimillä ei havaittu vakavia toksisia oireita tai kuolleisuutta tutkimuksen aikana. *Yhtään eläintä ei tarvinnut lopettaa hyvinvointiongelman takia kokeen aikana. *Havaitsimme seuraavia ohimeneviä lieviä oireita: 1. lisääntynyttä porphyriinin eritystä (punainen väriaine silmien ja sierainten ympärillä stressireaktion seurauksena) 2. nenävuoto ja aivastelu 3. painonmenetyt 4. piloerektio (karvojen pystyyn nousu) 5. ääntely mahaan annostelun (käytetty annostelusondia) jälkeen	
OSAHANKE 5. OECD 425 Akuutti oraalinen ylös- alas testi (UPD-testi)	-	-	-	vakava	-	

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 raportoitessa
Kehitetty in silico –menetelmiä	-	-	-	-
Kokeet tehdään aina pienimmällä mahdollisella viranomaisen hyväksymällä määrällä eläimiä.	x	x	x	x
Pilottitutkimuksella pientä eläinmäärää käyttäen varmistetaan oikea annos varsinasta koetta varten.	x	x	x	x
Kliinisten oireiden tarkkailu päivittäin tutkimuksen aikana	x	x	x	x
Eläinten totuttaminen toimenpiteisiin	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 Parkinsonin taudin prekliinissä eläinmalleissa.	
Hankeluvan kesto	Kolme vuotta	
Avainsanat	Parkinsonin tauti, 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)	Parkinsonin taudin hoitoon ei ole tällä hetkellä käytössä tehokkaita, sivuvaikutuksettomia hoitomuotoja. Prekliinisten eläinkokeiden tarkoituksena on edesauttaa mahdollisen ihmiskäyttöön soveltuvan lääkeaineen löytymistä ja sitä kautta helpottaa yksilön hyvinvointia ja tuoda yhteiskunnallista hyötyä. Malleissa tehokkaiksi osoittautuneet lääkeaineet etenevät viimekädessä kliinisiin tutkimuksiin tehokkaiden ja turvallisten Parkinsonin taudin lääkehoitojen kehittämiseksi.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Eläinkokeet ovat välttämättömiä uusien lääkeaineiden kehitystyössä. Mahdolliset positiiviset tulokset edesauttavat tutkittavan lääkeaineen etenemistä lääkekehitystyössä mahdollisesti kliinisiin kokeisiin ja myöhemmin valmiiksi lääkkeeksi. Tutkimukset tuovat merkityksellistä tietoa lääkeaineiden tehosta laaja-alaisesti Parkinsonin taudin monimuotoisen oireiston hoidossa.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Rotta, 2160, hiiri, 2400 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Tautitilojen indusointi tehdään toksiineilla joko systeemisenä antona tai kirurgisesti aivoihin tiettyyn kohtaan. Tämä aiheuttaa eläimelle kohtalaista tai huomattavaa haittaa. Käyttäytymistesteistä, lääkinnästä ja kuvantamisesta aiheutuu eläimille kohtalaista haittaa. Lääkinnät suoritetaan i.p., s.c., i.v., i.n., p.o., juomavedessä tai osana dieettiä. Suurin osa kokeista on näillä annostelutekniikoilla toteutettavia. Pienelle määrälle kokeita (arvio < 5 %), voidaan käyttää kirurgiaa vaativia annostelumuuotoja. Eläimille tehtävät käyttäytymistestit aiheuttavat lievää haittaa. 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?	In vitro -mallit ovat hyvin rajalliset johtuen koko eliön elimistön fysiologisten ja anatomisten ulottuvuuksien puuttumisesta mallinnettaessa kutakin sairautta in vitro olosuhteissa. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen klinisiä kokeita, 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 ilmiäisy (fenotyyppi) jonka tulee olla 1) perinnöllisesti (geneettisesti) relevantti että 2) oireistoltaan/patologialtaan ihmissairautta kuvaava. Näin varmistetaan että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ja antaa oikeanlaisen taudinkuvan. Koeasetelmissa ryhmän sisäinen variaatio minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määrittelee tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi) ja joka määrittää koe-eläinten käytön määrän kussakin koeasetelmassa. Validaatiotyön ja tilastollisen voima-analyysin perusteella voidaan luotettavasti ennustaa soveltuvat ryhmäkoot, jotka minimoivat eläinten käytön alimpaan mahdolliseen ilman että koeasetelman tilastollinen voima vaarantuu.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Suuri osa keskushermostollisten kehityssairauksien eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille lääkkeille (jos on) ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Alemmilla selkärankaisilla tai in vitro -menetelmin ei voida saada samanlaista tietoa uusien lääkeaineiden tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole riittävästi tutkittuja, eivätkä yleisesti hyväksyttyjä ja käytettyjä. Tämän lisäksi näistä menetelmistä ei ole saatavissa tietoa tällä hetkellä käytettyjen lääkeaineiden vasteista, joita voitaisiin käyttää verrattaessa uusista lääkeaineista saatavia tuloksia.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 23.12.2019 - arviointi ESAVI 8.1.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja Parkinsonin taudin hoitoon testaamalla lääkeaineiden tehoa Parkinsonin taudin eläinmalleissa. Muutosluvista (i.v.-lääkintä 50 hii-
relle 1x pvssä, yht. 7 kertaa), (i.v.-lääkintä 150 rotalle 3x viikossa, yht. 18 kertaa), (Busulfan-käsittely

tg-eläimille, n. 500 hiirtä), (AAV A53T-aivoinfuusio hiirelle, lisänä LRRK2 tg-hiirikanta, IT-annostelu) haettiin lääkintäreittien ja -kertojen muutoksia, busulfan-käsittelyä ja lajimuutoksia sekä uuden transgeenisen kannan käyttöä taudin hoitoon tähtäävissä tutkimuksissa.

Toimenpiteet: taudin indusointi, kirurgiset operaatiot, lääkintä, käyttäytymistestit, verinäytteiden keruu, kuvantamismittaukset, lopetus ja näytteenkeruu. Lisäksi tutkittiin lääkeaineiden pitoisuuksia lääkehoidon jälkeen eläimiltä otetuista veri- ja kudospäätteistä.

Käytettävät eläin- ja tutkimusmallit soveltuivat hyvin tähän tutkimukseen kussakin osahankkeessa: Osahanke 1 (6-OHDA-malli, LPS-malli, AAV A53T alfa-synukleiini-malli), osahanke 2 (MPTP-malli), osahanke 3 (Transgeeninen A53T eläinkanta) ja muutoslupa osahankkeelle 3 (Busulfan-käsittely C57BL/6N-Gbatm1.1Mjff Tg(Thy1-SNCA)15Mjff/J (JAX kanta: #029124) hiirikannalle).

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

2. Millaista haittaa?

Osahanke 1 oli arvioitu lupakäsittelyssä haittaluokituksestaan vakaviksi. Takautuvan arvion perusteella tosiasiallinen haitta oli kuitenkin pääosin kohtalaista. Toimenpiteet onnistuivat suunnitellusti eikä eläimille aiheutunut odottamatonta haittaa hyvinvoinnille. Eläimet toipuivat toimenpiteestä hyvin. Eläimiä käytettiin tässä osahankkeessa yhteensä 3215, rottia 1941 kappaletta ja hiiriä 1274 kappaletta. 13 eläintä kuoli nukutuksessa toimenpiteen aikana. Näiden vakavuusluokka merkittiin ”ei toipumista”. Viisi hiirtä kuoli melko pian aivoinfuusion jälkeen, jolloin ne löytyivät kuolleena häkistä. Tämä liittyi todennäköisesti aivo-infuusiossa tullessiin komplikaatioihin. Osahankkeen 1 transgeenisillä hiirikannoilla ei havaittu hyvinvointiongelmia.

Osahankkeessa 2 haittaluokitus oli arvioitu lupakäsittelyssä vakavaksi ja tosiasiallinen haitta oli myös vakava. Osahankkeessa 2 käytettiin yhteensä 1358 hiirtä, joista kuolleena löydettiin 151 ja lopetuskriteerien takia lopetettiin 26 eläintä. Kuolleisuuden syynä oli tautimalliin liittyvä kuolleisuus (MPTP:n annostelu). Etukäteen ilmoitettu arvio kuolleisuusprosentista tässä mallissa oli 15% ja tosiasiallinen kuolleisuus oli n. 13 %, joka vastasi hyvin odotettua. Eläimiä tukihoitettiin kriittisimmän jakson aikana: niitä ruokittiin pehmenneillä rehulla ja häkki laitettiin lämpömatolle osittain, jotta eläimet pystyivät halutessaan lämmittelemään. Suurin riski kuolleisuuteen oli 3 vrk aikana MPTP:n annostelusta. Tästä toivuttuaan eläimet olivat hyväkuntoisia eikä muita hyvinvointiongelmia enää havaittu.

Osahankkeen 3 haittaluokitus oli arvioitu lupakäsittelyssä vakavaksi. Tosiasiallisen arvion perusteella haittaluokitus oli osalla hiiristä vakava (n. 17%), osalla kohtalainen (n. 38%) ja lopuilla lievä (n. 45%). Osahankkeeseen kuuluvassa muutosluvassa (Busulfan ja lentivirus käsittely) havaittiin kuolleisuutta, joka liittyi immuunipuutostilan indusointiin. Osahankkeessa 3 ja sen muutosluvassa käytettiin yhteensä 262 hiirtä, joista kuolleena löydettiin 11 kpl ja lopetuskriteerien perusteella lopetettiin 22 kpl. Toteutunut kuolleisuusprosentti oli 12.6%, joka vastaa hyvin etukäteen arvioitua julkaisun perusteella ilmoitettua 12.5% kuolleisuutta. Suurin osa kuolemista havaittiin ensimmäisessä Busulfan-mallilla tehdyssä tutkimuksessa. Myöhemmissä tutkimuksissa kuolleisuus putosi huomattavasti jäädessä alle viiden prosentin. Kuolleisuuden vähentymiseen vaikutti merkittävästi eläinten tukihoitoon kehittyminen, erityisesti eläinten pitäminen lämpömatoilla. Busulfan-käsitellyillä hiirillä havaittiin odotusten mukaisesti hyvinvointiongelmia, kuten painonlaskua ja yleistä huonokuntoisuutta. Eläimiä tukihoitettiin niin pitkään kuin niiden kunto sitä vaati. Malliin huomattiin liittyvän

hammasluuston pehmenemistä alkaen n. 2 kk kuluttua Busulfan-käsittelystä ja tästä aiheutuvaa hampaiden katkeamista ja lohkeamista. Eläinten hampaiden kuntoa tarkkailtiin joka päivä ja hampaita hiottiin tarvittaessa syömisen helpottamiseksi. Eläimet saivat pehmennettyä rehua koko tutkimuksen ajan hammasongelmien vuoksi, eikä eläinten yleiskunto tai paino laskenut hammasongelmien takia. Osahankkeessa 3 käytetyllä transgeenisellä kannalla oli jonkin verran hyvinvointiongelmia, mutta ne eivät poikenneet odotetusta.

3. 3R-mahdollisuudet

Kaikissa tutkimusmalleissa on ollut käytössä pehmennettyä rehua sekä pitkänippaiset juomapullot ja lämpömattoja toimenpiteiden jälkeen. Lopetuskriteerejä on pyritty kehittämään siten, että eläimiä löytyisi mahdollisimman vähän kuolleena. Eläimen kunnon arvioinnissa on käytetty apuna mm. eläimen painon putoamista, liikkumiskykyä ja yleiskunnon kehittymistä. Kirurgiaan liittyen on pyritty kiinnittämään huomiota aseptiikkaan, leikkausmenetelmiin ja koulutukseen. Tämän lisäksi eläinten post-operatiivista hoitoa ja eläinten tarkkailua on kehitetty. Auennutta haavaa tikattiin uudelleen vain yhden kerran. Jos haava kuitenkin aukesi toisen kerran eläin lopetettiin.

Kuolleisuusprosentit olivat ennakoidulla tasolla. MPTP- ja Busulfan-annostelun jälkeen eläinten lämmittäminen lämpömatolla koettiin tärkeäksi tukitoimenpiteeksi, joka saattoi merkittävästi auttaa joitakin eläimiä selviämään kriittisimmän jakson yli.

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?
Yhteen-veto:	Rotta + hiiri	Tutkimusmalli soveltui tähän tutkimukseen ja antoi luotettavia tuloksia (+). Myös tutkimuksen tavoitteet palveluntarjoajan näkökulmasta saavutettiin: Asiakas-tutkimukset suoritettiin protokollan mukaisesti (+). Tutkimustulokset lähetetty asiakkaalle protokollan mukaisesti (+).	Rotta 2160 / 1941 Hiiri 2900 / 2894	Rotta: Vakava-9, Kohtalainen-1237, Lievä-685, Ei toipumista-35 Hiiri: Vakava-1171, Kohtalainen-1045, Lievä-499, Ei toipumista-14	Vakavimmat haitat liittyivät tutkimusmalliin tai leikkauksessa tapahtuneisiin ongelmiin.	Tukihoito toimenpiteiden jälkeen, lisälämmön tarjoaminen ensimmäisen vuorokauden aikana. Laitoksessa siirrytty käyttämään systemaattisesti yhtä neulaa vain yhteen pistoon i.p.- ja s.c-lääkinnöissä.
Osahanke 1 (6-OHDA-malli, LPS-malli, AAV A53T alfasynucleiini-malli) +muutoslupa	Rotta	Tutkimusmalli soveltui tähän tutkimukseen ja antoi luotettavia tuloksia (+). Myös tutkimuksen tavoitteet palveluntarjoajan näkökulmasta saavutettiin: Asiakas-tutkimukset suoritettiin protokollan mukaisesti (+). Tutkimustulokset lähetetty asiakkaalle protokollan mukaisesti (+).	1941	Vakava-9, Kohtalainen-1237, Lievä-685, Ei toipumista-35	Kuolleena löydettyjen määrä: 1 Lopetuskriteerien perusteella lopetettujen määrä: 3. Vakavin haitta aiheutui komplikaatioista liittyen kirurgisiin toimenpiteisiin.	Eläimiä tukihoidettiin toimenpiteiden jälkeen ja kriteerien perusteella lopetettujen eläinten määrä saatiin pidettyä alhaisena.

Osahanke 1: muutoslupa AAV A53T alfasynukle- iini-malli hii- relle	hiiri	Tutkimusmalli soveltui tähän tutkimukseen ja antoi luotettavia tuloksia (+). Myös tutkimuksen tavoitteet palveluntarjoajan näkökulmasta saavutettiin: Asiakas-tutkimukset suoritettiin protokollan mukaisesti (+). Tutkimustulokset lähetetty asiakkaalle protokollan mukaisesti (+).	1274	Vakava-20, Kohtalainen- 946, Lievä-135, Ei toipumista-8	Kuolleena löydettyjen määrä: 16 Lopetuskriteerien perusteella lopetettujen määrä: 14. Vakavin haitta aiheutui komplikaatioista liittyen kirurgisiin toimenpiteisiin. Yhdessä kokeessa testiaine aiheutti arvaamattomia sivuvaikutuksia, jonka vuoksi eläimet lopetettiin ja lääkintä keskeytettiin.	Eläimiä tukihoitettiin toimenpiteiden jälkeen ja kriteerien perusteella lopetettujen eläinten määrä saatiin pidettyä alhaisena. AAV-aivoinfuusioon liittyviä tekniikoita tarkasteltiin ja henkilöstöä tarvittaessa koulutettiin, jotta kirurgiaan liittyvät ongelmat saatiin minimoitua.
Osahanke 2 + muutos- lupa	Hiiri	Tutkimusmalli soveltui tähän tutkimukseen ja antoi luotettavia tuloksia (+). Myös tutkimuksen tavoitteet palveluntarjoajan näkökulmasta saavutettiin: Asiakas-tutkimukset suoritettiin protokollan mukaisesti (+). Tutkimustulokset lähetetty asiakkaalle protokollan mukaisesti (+).	1358	Vakava-1106, Kohtalainen-0, Lievä-246, Ei toipumista-6	Kuolleena löydettyjen määrä: 151 Lopetuskriteerien perusteella lopetettujen määrä: 26. Vakavin aiheutunut haitta oli taudin indusointiin liittyvää (MPTP).	Eläimiä tukihoitettiin (ruokinta, lämpö) MPTP:n jälkeen ja kriteerien perusteella lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten määrä saatiin pidettyä odotettuna. Lämpömatolla pitäminen 1-2 vuorokautta saattoi auttaa eläimiä selviämään paremmin MPTP-käsitelystä. Kiinnitettiin huomiota i.p.- pistos-tekniikan koulutukseen.
Osahanke 3 + muutos- lupa	Hiiri	Busulfan-indusoitu malli soveltui erittäin hyvin tähän tutkimukseen, transgeeniset mallit soveltuivat hyvin (+). Validaatiotutkimuksissa kehitetty uusi malli (Busulfan) on todettu hyvin toimivaksi ja tulosten pohjalta otettu malli	262	Vakava-45, Kohtalainen- 99, Lievä-118	Kuolleena löydettyjen määrä: 11 Lopetuskriteerien perusteella lopetettujen määrä: 22 Lupakauden aikana tehtiin kaksi tutkimusta A30P(A53T) -hiirikannalla.	Busulfan- käsiteltyjä eläimiä pyrittiin tukihoitamaan mahdollisimman hyvin ja niiden hampaat tarkistettiin joka päivä ja tarvittaessa lyhennettiin, jotta eläimet pystyivät syömään. Lämpömaton käyttö vähensi kuolleisuutta.

		asiakastutkimuskäyttöön (+).Tutkimusmalli soveltui tähän tutkimukseen ja antoi luotettavia tuloksia (+).Myös tutkimuksen tavoitteet palveluntarjoajan näkökulmasta saavutettiin: Asiakastutkimukset suoritettiin protokollan mukaisesti (+). Tutkimustulokset lähetetty asiakkaalle protokollan mukaisesti (+).			Tähän kantaan liittyi neurologisia oireita, joiden takia osa eläimistä lopetettiin. Moni eläimistä myös tappeli, ja eläimiä lopetettiin tappeluvammojen vuoksi. Muutosluvan mukaisia Busulfan-käsiteltyjä eläimiä haittasi painonlasku ja yleiskunnon heikkeneminen, ja hampaiden lohkeaminen.	
--	--	---	--	--	--	--

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	-	-
Lämpömatto	X	X	X	-

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ		
Hankkeen nimi	Aivojen syvien osien sähköisen stimulaation vaikutusmekanismit Parkinsonin taudin eläinmallissa.	
Hankeluvan kesto	Kolme vuotta	
Avainsanat	Parkinson, Aivojen syvien osien stimulaatio, DBS	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-opetus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tieteellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Parkinsonin tauti on toiseksi yleisin aivoja rappeuttava (neurodegeneratiivinen) sairaus, jonka lääkehoito johtaa yleensä noin 5-10 vuodessa merkittäviin haittavaikutuksiin. Vaikeista Parkinsonin taudin lääkehoidon haitoista kärsivien potilaiden hoidossa voidaan käyttää aivojen syvien osien stimulaatio –hoitoa eli DBS:ää, joka on kliinisessä käytössä tehokkaaksi todettu hoitomenetelmä. Tämän hoitomenetelmän tarkkaa vaikutusmekanismia ei kuitenkaan tunneta. Hankkeen tarkoituksena on selvittää aivojen syvien osien stimulaation vaikutusmekanismeja, minkä tavoitteena on lyhyelläkin aikavälillä parantaa Parkinsonin taudista kärsivien potilaiden hoitomahdollisuuksia. Lisäksi hankkeella tavoitellaan uusia menetelmiä hidastaa Parkinsonin taudin etenemistä.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	Stimulaation vaikutusmekanismien tunteminen parantaa mahdollisuuksia kehittää stimulaatiohoidon kliinistä yhteensovittamista lääkehoidon kanssa sekä ymmärtää paremmin stimulaation lyhyen ja pitkän aikavälin vaikutuksia teoreettisesti. Tarkkojen vaikutusmekanismien selvittäminen mahdollistaa myös nykyistä paremman potilasvalinnan sekä stimulaatiokohteen (STN ja GPi) potilaskohtaisen valinnan. Aivojen syvien osien stimulaation vaikutusmekanismia tutkimalla voidaan myös saada lisätietoa L-DOPA:n aiheuttaman dyskinesian syntymekanismeista. Lisäksi on mahdollista, että stimulaation vaikutusten ymmärtäminen parantaa mahdollisuuksia käyttää stimulaatiota taudin etenemisen hidastamisessa eli neuroprotektiossa. Kasvutekijähoitojen ja stimulaation yhteisvaikutusten selvittäminen voi johtaa nopeallakin aikataululla klinisiin sovelluksiin. Tämän eläintutkimuksen tuloksia voidaan siirtää nopeastikin kliniseen tutkimukseen, koska tutkijat työskentelevät myös itse klinisen aivojen syvien osien stimulaation parissa.	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Rotta 565, Hiiri 565 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvioitua vakavuusluokat,	Eläimille koituu kipua kirurgisista toimenpiteistä. Toispuolisesta Parkinsonin tautimallista aiheutua toiminnallista haittaa ja subtalaamisen	

eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	tumakkeen leesioinnista seuraa ohimeneviä pakkoliikkeitä. Eläimet lopetetaan toimenpiteen päätyttyä. 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?	Tässä tutkimuksessa selvitetään stimulaation sekä stimulaation ja kasvutekijähoidon yhteisvaikutuksia systeemitasolla eläimen käyttäytymiseen ja aivojen signalointiin, mitä voidaan tutkia vain tutkimalla elävää eläintä. Tutkimuksen tavoitteiden toteutumiseksi tarvitaan tuoretta aivokudosta välittömästi stimulaation jälkeen, mitä ei ole mahdollista saada kliinisesti hoidetuilta ihmispotilailta. Tutkimukseen kuuluu myös täysin kokeellisia hoitoja, joita on ensin tutkittava eläinmallissa ennen kuin siirrytään kliinisiin tutkimuksiin. Yksipuolinen 6-OHDA injektio haittaa merkittävästä vähemmän rotan toimintakykyä kuin molemmin puolinen injektio. Aivojen stimulaatiota tutkittaessa korvaavaa menetelmää aivoihin asetettavalle elektrodille ei ole.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Eläimiä käytetään pienin mahdollinen määrä, joka aiemman kokemuksen perusteella riittää tutkittavien ilmiöiden toteutukseen.
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) Pyritään valitsemaan mahdollisimman yksinkertainen eläinmalli, joka mahdollistaa aivostimulaatioon liittyvien ilmiöiden tutkimisen. b) Rotta on luotettavin jysijämalli aivostimulaation tutkimiseen, koska kohdetumake on rotalla ja kohtalaisen kokoinen mahdollistaen luotettavan elektrodien asetuksen. Käyttäytymiskokeiden toteuttaminen on rotalla huomattavasti hiirtä luotettavampaa. Geneettisten mallien testaamisessa hiiri on rottaa parempi malli geneettisten mallien saatavuuden takia. c) Eläimille aiheutettu haitta minimoidaan toimenpiteiden osalta kipulääkityksellä ja lisäravinnolla sekä toteuttamalla toimenpiteet vain toispuoleisesti. Toispuoleinen parkinsonnintautimalli ei juurikaan vaikuta eläimen normaaliin käyttäytymiseen. Koe-eläimille annettu aivojen kohdetumakkeen sähköstimulaatio vähentää parkinsonin taudin oireita. Eläimet lopetetaan lopetuskriteerien mukaisesti.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TAKAUTUVA ARVIOINTI

Saapumispvm: 11.10.2019. Arviointi ESAVI 19.11.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli selvittää Parkinsonin taudin syväaivostimulaatiohoidon vaikutusmekanismeja sekä tutkia onko syväaivostimulaatiolla ja kasvutekijöillä potentiaalisesti hyödyllisiä

yhteisvaikutuksia. Vaikutusmekanismien suorassa selvittämisessä epäonnistuttiin, mutta hankkeessa onnistuttiin ensimmäistä kertaa osoittamaan kasvutekijähoidon ja syväaivostimulaation hyödyllinen yhteisvaikutus koe-eläinmallissa.

Käytetty Parkinsonin taudin rottamalli oli sopiva tähän tutkimukseen. Syväaivostimulaatiossa käytettiin varsin lyhyitä stimulaatioaikoja ja on mahdollista, että nämä lyhyet stimulaatioajat vaikuttivat siihen, ettei vaikutusmekanismeista saatu uutta tietoa. Pidempikestoista kliinistä syväaivostimulaatiota mallinnettiin kohdetumakkeen leesioinnilla yhdessä kasvutekijän kanssa, ja tämän mallin käyttö oli välttämätöntä tutkimuksen tulosten saavuttamisessa.

2. Millaista haittaa?

- Parkinsonin tautimallin luonti, aiheuttaa haittaa tarvittavan toimenpiteen ja siihen liittyvän nukuksen sekä näistä toipumisen vuoksi. Yksipuolisena tehdyn toimenpiteen aiheuttama pysyvä haitta rotan käyttäytymiseen on vähäinen. Kyseessä on hyvin tunnettu malli ja leikkaukset, eli etukäteen arvioitu haitta vastasi tosiasiallista haittaa. Kokonaishaitta on tarvittavien toimenpiteiden vuoksi kohtalainen. Kymmenen eläintä lopetettiin ennen aikaisesti puutteellisesti syntyneen Parkinsonin tautimallin vuoksi, näillä eläimillä ei ollut hyvinvointiongelmia.

- Kohdetumakkeen leesiointi. Kohdetumakkeen leesiointi aiheuttaa ohimeneviä pakkoliikkeitä, joita osattiin odottaa etukäteen. Pakkoliikkeitä oli n. 30 eläimellä mutta näitä hoidettiin onnistuneesti kloraalihydraattisedaatiolla. Yhdellä eläimellä oli mahdollisesti pakkoliikkeistä johtunutta iho-ongelmaa ja tämä sama eläin vaikutti heikolta, tämä eläin lopetettiin ennen aikaisesti lopetuskriteerien perusteella.

- Kasvutekijän ruiskutus, tästä aiheutuva haittaa liittyy kokemustemme mukaan lähinnä tarvittavaan toimenpiteeseen. Kun tässä kokeessa kasvutekijä ruiskutettiin aivoihin samassa yhteydessä kuin kohdetumakeleesioitiin, ei tästä aiheutunut ylimääräistä toimenpidettä. Kokonaishaitta on vaadittavan toimenpiteen vuoksi kohtalainen, mutta tässä asetelmassa kasvutekijästä ei siis lisähaittaa ollut.

3. 3R-mahdollisuudet

Tässä hankkeessa tehdylle tutkimukselle ei ole oikein lopulta muuta vaihtoehtoa kuin eläinkokeet. 6-OHDA -leesiot yksipuoleisesti annettuna aiheuttaa vähän haittaa eläimelle.

Hyvinvoinnin parantaminen subtalaamisen kohdetumakkeen leesioinnin (joka aiheuttaa ohimenevästi, n. 24 h, pakkoliikkeitä) jälkeen suunnitellusti annetulla kloraalihydraattisedaatiolla vaikutti onnistuvan hyvin, ja se lievitti alkuvaiheen pakkoliikkeitä huomattavasti.

Eläinmääriä ei kannata ainakaan pienentää kokemustemme perusteella, koska yksilökohtainen vaihtelu on esimerkiksi Parkinsonin tautimallissa varsin suurta. Osan näistä kokeista hylätyistä eläimistä saattaisi kuitenkin pystyä käyttämään hyödyksi muissa kokeissa. Tässä hankkeessa tutkitut neurodegeneratiiviset ilmiöt ovat hitaita ja pitkät koeasetelma saattaisivat olla selvästi hyödyllisempiä kuin lyhyet. Esimerkiksi puolen vuoden (tai jopa pidempi) koeasetelma saattaisi antaa

sellaista tietoa, jota ei saada edes useilla lyhyillä kokeilla tehtyä. Tämä saattaisi vähentää kokonaisuudessaan ilmiöiden tutkimiseen tarvittavia eläinmääriä.

Kohdetumakkeen tarkempi paikantaminen olisi hyödyllistä, mutta hankalaa ilman MRI-kuvantamislaitetta, mikä taas vaatisi yhden anestesian lisää sekä erityislaitteistoa jonka saatavuus on hyvin rajallinen. Kohdetumakkeen sähköisen toiminnan tunnistaminen elektrofysiologisesti olisi yksi mahdollisuus parantaa suurinta tarkkuutta vaativan toimenpiteen, eli elektrodin asettamisen, osuvuutta, mikä voisi johtaa tarvittavan eläinmäärän vähenemiseen.

Aiemman kokemuksen perusteella tiedetään että mikäli olisi mahdollisuus kokonaan saada stimulaattorilaitteisto ihon alle voisivat rotat olla yhteishäkeissä mikä varmasti parantaisi hyvinvointia. Tämä on kuitenkin toistaiseksi mahdoton ja tulevaisuudessakin todennäköisesti teknisesti hankalasti toteutettavissa oleva vaihtoehto.

Muuta

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?
1a) Natiivieläinten stimulaatio	Rotta	-	50/0	-	-	-
1b) emiparkinsonististen eläinten stimulaatio	Rotta	-	125/0	-	-	-
1c) Stimulaatio ja mikrodialyysi	Rotta	-	40/0	-	-	-
1d) Kohde tumakkeen leesiointi, pitkäaikaisvauvat	Rotta	-	100/0	-	-	-
2a) Stimulaatio ja kasvutekijät	Rotta	-	100/0	-	-	-
2b) Stimulaatio ja Kasvutekijävirusvektori	Rotta	-	50/0	-	-	-
2c) Kohdetumakkeen leesiointi ja kasvutekijät	Rotta	+	100/60	Vakava/Kohtalainen-Vakava	Kohdetumakkeen leesiointi aiheuttaa osalle eläimistä voimakasta mutta ohimenevää pyörimistä ja etutassujen dyskinesiaa.	Kohdetumakkeen leesiointin jälkeen tarvittaessa toistuvasti annettava rauhoittava lääkitys vähentää selkeästi haittaa.
1a-2c)	Hiiri	-	250/0	Hiiriä ei käytetty lainkaan	-	-

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	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoituessa
Pesämateriaali	X	X	X	X
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	joskus
Totuttaminen	X	X	X	X
Riittävän pitkät kokeet	-	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	Lääkeaineiden tehon testaaminen myotubular myopathy (MTM) lihasrappeumataudin prekliinisissä eläinmalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	hiiri, prekliininen lääkeainetutkimus, lihasrappeumasairaus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Myotubular myopathy lihasrappeumasairauden hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lääkkeitä. MTM tauti aiheuttaa potilaille ja heidän omaisilleen kärsimystä. Yritys tarjoaa lääkekehityste- ollisuudelle in vivo -eläinmalleja lupaavien lääkeaineiden preklii- niseen testaukseen. Tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä kliinisiin kokeisiin.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja MTM- sairauteen. Tutkimusmallien käyttö edistää myös MTM-sairau- den mekanismien tutkimista, mikä edesauttaa uusien lääkkei- den ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiret: 1300 kpl	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	MTM1-poistogeenisten hiirten fenotyyppi on vakava. Eläimillä havaitaan yleinen ja progressiivisesti etenevä myopatia ja lihas- ten toiminnan heikentyminen n. 4 viikon iästä alkaen. Eläimet kuolevat 15 ikäviikkoon mennessä. Tutkimus kestään enimmil- lään n. 3 kk. Tutkimuksen päätteeksi eläimet lopetetaan. Lope- tuksen jälkeen tarvittaessa kerätään veri- ja kudokset. 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 lihasrappeumataudin tutkimiseksi ovat hyvin ra- jalliset. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä tur- vallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä kokeita.	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?	Koeasetelmat on standardoitu ja niiden käytön pohjana on pe- rusteellinen mallien validointityö. Validointityöllä varmistetaan että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ja antaa oikeanlaisen tautivasteen. Koeasetelmissa ryhmän sisäinen vari- aatio	

	minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määrittelee tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi).
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Suurin osa lihasrappeumasairauksien eläinmalleista on kehitetty jysijöissä. Kyseinen tutkittava kanta on lihasrappeumasairauden poistogeeninen hiirikanta. Jysijöissä havaitut taudin mekani- smit, vasteet nykyisille lääkkeille ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Alemmilla selkärankaisilla tai in vitro -menetelmin ei voida saada samanlaista tietoa uusien lääkaineiden tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole standardoituja eivätkä yleisesti hyväksyttyjä ja käytettyjä. Tämän lisäksi näistä menetelmistä ei ole saatavissa tietoa tällä hetkellä käytettyjen lääkaineiden vasteista, joita voitaisiin käyttää verrattaessa uusista lääkaineista saatavia tuloksia.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TAKAUTUVA ARVIOINTI

Saapumispvm: 9.12.2019. Arviointi ESAVI 11.12.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja myotubular myopathy - lihasrappeumasairauden hoitoon. Muutosluissa tavoitteina oli lisäksi kehittää lääkaineita myotonisen dystrofian (DMSXL) lihasrappeumataudin ja Pompen taudin hoitoon.

Tehotutkimuksissa selvitettiin lääkaineiden vaikutusta eläinten käyttäytymiseen ja motorisiin toimintoihin sekä aivojen rakenteisiin ja niiden toimintaan. Tehotutkimusten lisäksi tutkittiin lääkaineiden pitoisuuksia lääkähoidon jälkeen eläimiltä otetuista veri- ja kudospäätteistä.

- Toimenpiteet: lääkintä, käyttäytymistestit, telemetriamittaukset, lopetus ja näytteenkeruu
 Tavoitteissa onnistuttiin erinomaisesti erityisesti myotubular myopathy - lihasrappeumasairauden hoidon mallissa. Testatut lääkaineet toimivat erinomaisesti tutkimusmallissa ja lääkaineita on testattu onnistuneesti myös kliinisissä kokeissa. Myös muissa malleissa tutkimukset ovat onnistuneet odotusten mukaisesti.

2. Millaista haittaa?

Tutkimuksessa käytettiin kolmea eri transgeenistä hiirikantaa. Pääosa hyvinvointiongelmista havaittiin myotubular myopathy - lihasrappeumasairauden tutkimusmallissa, jossa eläimiä jouduttiin lopettamaan halvaantumisoireiden takia. DMSXL- ja Pompen taudin malleissa havaittiin myös kannasta johtuvia hyvinvointiongelmia (sydämen laajentuminen, pienikasvuisuus), mutta kuitenkin vain yksittäistapauksissa. Tutkimusmenetelmiin liittyen vakavimmat hyvinvointiongelmat havaittiin telemetriamittauksiin liittyvissä operaatioissa DMSXL-mallissa. Yhteensä 16 hiirtä jouduttiin lopettamaan kirurgiaan liittyvien ihokomplikaatioiden takia. Muihin menetelmiin ei liittynyt hyvinvointiongelmia. Huomioitavaa on se, että myotubular myopathy - lihasrappeumasairauden tutkimusmallissa

n. 60% kaikista käytetyistä hiiristä kuului vakavuusluokkaan kohtalainen eikä suinkaan luokkaan vakava, johon kuului vain n. 28% hiiristä. Tämä seikka selittyy sillä, että lähes kaikki varsinaista tutkimusainetta saaneista eläimistä olivat hyväkuntoisia. Kokonaisuutena eläimistä suurimman osan vakavuusluokka ei siis sijoittunut luokkaan vakava, kuten oli esitetty lupapäätöksessä. Missään tutkimusmallissa ei ollut käytössä toistuvia injektioita, joiden haittoja lupapäätöksessä pyydettiin arvioimaan.

Hankkeessa käytettiin yhteensä 994 hiirtä. Hiiristä 343 oli poikasia, joilta otettiin vain genotyyppäusnäytteet, minkä jälkeen hiiret lopetettiin tarpeettomina väärän genotyypin takia (DMSXL-malli). Eläimiä jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella 74 kpl ja kuolleena löydettiin 18 kpl. Suurin osa lopetetuista (56 kpl) tai kuolleena löydettyistä hiiristä (16 kpl) oli myotubular myopathy -lihasrappeumasairauden malliin liittyvästä tutkimuksesta, ja erityisesti sen vehikkeliryhmästä. Tämän lisäksi 16 hiirtä jouduttiin lopettamaan telemetrialähettimien asennukseen liittyvien ihokomplikaatioiden takia.

3. 3R-mahdollisuudet

Kaikissa tutkimusmalleissa on ollut käytössä pehmennettyä rehua sekä pitkänippaiset juomapullot. Lopetuskriteerejä on pyritty kehittämään siten, että eläimiä löytyisi mahdollisimman vähän kuolleena. Eläimen kunnon arvioinnissa on käytetty apuna mm. eläimen painon putoamista, liikkumiskykyä ja yleiskunnon kehittymistä. Kirurgiaan liittyen on pyritty kiinnittämään huomiota aseptiikkaan, leikkausmenetelmiin ja koulutukseen. Tämän lisäksi eläinten post-operatiivista hoitoa ja eläinten tarkkailua on kehitetty. Auennutta haavaa tikattiin uudelleen vain yhden kerran. Jos haava kuitenkin aukesi toisen kerran, 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.

Osahanke / Toimenpide	Eläin laji	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?
MTM1-tautilinjat/ Tehokokeet	Hiiri	Tutkimusmalli soveltui erinomaisesti tähän tutkimukseen ja antoi luotettavia tuloksia (+). Tutkittavat lääkeaineet toimivat tehokkaasti tutkimusmallissa ja ovat edenneet edelleen kliinisiin kokeisiin (+). Myös tutkimuksen tavoitteet palveluntarjoajan näkökulmasta saavutettiin: Asiakastutkimus suoritettiin protokollan mukaisesti (+). Tutkimustulokset lähetetty asiakkaalle protokollan mukaisesti (+).	1300/510	Vakava-145, Kohtalainen-302, Lievä-64, Ei toipumista-0	Kuolleena löydettyjen määrä: 16 Lopetuskriteerien perusteella lopetettujen määrä: 56. Eläimille ei tehty toistuvia injektioita.	Halvaantumisoireiden perusteella eläin lopetettu aikaisessa vaiheessa. Tutkittavat lääkkeet toimineet niin erinomaisesti, että lääkehoitoryhmän eläimillä ei ole havaittu halvaantumisoireita eikä niitä ole jouduttu lopettamaan. Tästä syystä lääkettä saaneet hiiret on luokiteltu vakavuusluokkaan kohtalainen.
Muutoslupa: ESAVI/10135/2018 – DMSXL-tautilinjat/	Hiiri	Tutkimusmalli soveltui tähän tutkimukseen (+). Validaatiotutkimuksissa kehitetty uusi malli on todettu toimivaksi ja tulosten pohjalta otettu malli asiakastutkimuskäyttöön (+).	409	Vakava-3, Kohtalainen-24, Lievä-382 (tämä sisältää 343 poikasta, jotka lopetettu genotyyppaus-tulosten jälkeen tarpeettomina)	Kuolleena löydettyjen määrä: 1 Lopetuskriteerien perusteella lopetettujen määrä: 2 Eläimille ei tehty toistuvia injektioita.	Lupakauden aikana tehtiin vain yksi tutkimus. Suurin osa eläinmäärästä selittyy tarpeettomien väärää genotyyppiä olevien poikasten määrällä. Näille eläimille ei tehty muita toimenpiteitä kuin genotyyppausnäytteen ottaminen ja lopetus.

Tautimallin validaatio ja tehokoe		Myös tutkimuksen tavoitteet palveluntarjoajan näkökulmasta saavutettiin: Asiakastutkimus suoritettu protokollan mukaisesti (+). Tutkimustulokset lähetetty asiakkaalle protokollan mukaisesti (+).				
Muutoslupa: ESAVI/1528 8/2018 – Pompe-tautimalli/ Tehokokeet	Hiiri	Tutkimusmalli soveltuu tähän tutkimukseen ja antoi luotettavia tuloksia (+). Myös tutkimuksen tavoitteet palveluntarjoajan näkökulmasta saavutettiin: Asiakastutkimus suoritettu protokollan mukaisesti (+). Tutkimustulokset lähetetty asiakkaalle protokollan mukaisesti (+).	75/	Vakava-20, Kohtalainen-50	Kuolleena löydettyjen määrä: 1 Lopetuskriteerien perusteella lopetettujen määrä: 16 Eläimille ei tehty toistuvia injektioita.	Telemetrialähettimien asennuksesta johtuviin ihokomplikaatioihin reagoitiin tutkimuksen aikana: kirurgian aseptiikkaan, menetelmiin ja koulutukseen kiinnitettiin huomiota, postoperatiivista hoitoa ja eläinten tarkkailua lisättiin. Jos eläimen kunto ja haava ei hoitotoimenpiteistä huolimatta parantunut, eläin lopetettiin. Auennutta haavaa tikattiin uudelleen vain yhden kerran.

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 pääte piste	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	Lääkeaihioiden tehon testaaminen keskushermostoon vaikuttavan hepaattisen enkefalopatian prekliinisessä eläinmallissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Maksasairaudet, keltaisuus, neurologia, psykiatria	
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)	Maksan toimintahäiriöistä johtuvaan keltatautiin ja sen aiheut- tamien neurologisten ja psykiatristen sairauksien hoitoon ei tällä hetkellä ole olemassa tehokasta, sivuvaikutuksetonta hoitoa. Tässä hankkeessa toteutettavien prekliinisten eläinkokeiden ta- voitteena on mallintaa maksan toimintahäiriötä ja siitä johtuvaa aivosairautta (hepaattinen enkefalopatia), ja näin toteutetulla mallilla testata mahdollisia soveltuvia lääkeaineita ihmisen he- paattisen enkefalopatian hoitoon.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Vuonna 2009 pelkästään Yhdysvalloissa arvioitiin olevan 7 – 11 miljoonaa hepaattista enkefalopatiaa sairastavaa ihmistä. Hank- keen tutkimukset tuottavat merkityksellistä tietoa testattavien lääkeaihioiden tehosta ja käyttökelpoisuudesta maksan toimin- tahäiriöstä johtuvien sairauksien ja niiden oireiden hoidossa. Mahdolliset positiiviset prekliiniset tulokset johtavat parhaim- millaan testatun lääkeaineen kliinisiin kokeisiin, ja siten myö- hemmin kehitykseen valmiiksi lääkkeeksi kliiniseen käyttöön ky- seistä sairautta potevien ihmisten hoidossa. Tämän hankkeen ensisijainen tavoite on validoida hepaattiselle enkefalopatialle eläinmalli, ja testata mallia käyttäen lääkeaihiota ko. patologi- sen tilan hoidossa. Lopullisena tavoitteena voidaan nähdä yksi- lön, ja sitä kautta väestön hyvinvoinnin lisääminen, sekä sairau- den yhteiskunnalle aiheuttaman sosiaalisen ja taloudellisen kuorman keventäminen.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Rotta, 900; Hiiri, 900	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Patologisen tilan kirurginen indusointi ja mahdolliset kirurgiset lääkintämenetelmät aiheuttavat eläimille vakavaa haittaa. Koh- talaista haittaa aiheutuu käyttäytymistesteistä (muistin ja oppi- misen testaus; mahd. sosiaaliset testit; motoriset testit; psykiat- riset testit), lääkinnästä, sekä kuvantamisesta kokeen aikana. Muut toimenpiteet – kuten verinäytteen otto anestesiassa -	

	aiheuttavat eläimille lievää haittaa. Tutkimuksen lopussa eläimet lopetetaan histologisia tutkimuksia ja veren analyysyjä varten. 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?	Nisäkäsorganismissa toimivat monimutkaiset syy - ja seuraussuhteet säätelevät elion kokonaistoimintaa solutasolta aina kognitiivisiin ja psykofysiologisiin toimintoihin. Kyseisessä hankkeessa mallinnetaan ihmisessä esiintyvää tilaa, jossa maksan toimintahäiriö yleisesti aiheuttaa mm. ylemmissä aivotoinnoissa manifestoituvia oireita, kuten oireita muistin, oppimisen, sosiaalisen käyttäytymisen, ja/tai motoriikan alueella. Edellä kuvailusta syystä johtuen kyseisen patologisen tilan mallinnuksessa ja mallin käytössä ei voida käyttää korvaavaa menetelmää. Lisäksi kliinisiin kokeisiin tähtäävien uusien lääkeaineiden teho, vaste ja turvallisuus on aina todennettava prekliinisesti in vivo.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Koeasetelmat ovat standardoituja ja niiden käyttöä edeltää aina perusteellinen mallin validointityö. Huolellisen mallivalidaation tuloksena saatujen tietojen perusteella määritetään kokeelle minimieläinmäärä, jota noudatetaan varsinaisessa kokeessa. Hukkaan menevien eläinten määrä minimoidaan tai eliminoidaan siten että kirurgiaan, lääkintään, testaamiseen ja eläinten ylläpitoon – siis kaikkeen toimintaan - osallistuvat ainoastaan asianmukaisesti koulutetut työntekijät. Turhia kokeita ja koeosioita vältetään ottamalla ennen validaatiotyötä selvää malliin mahdollisesti kuuluvista komplikaatioista ym. hyvinvointiin liittyvistä riskeistä.
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 sappi- ja maksasairauksien eläinmalleista on kehitetty jyrksijöissä (hiiri ja rotta), johtuen niiden lukuisista eduista verrattuna muihin mahdollisiin koe-eläinlajeihin. Hiiren ja rotan hyötysuhde (eläinmäärä ja tarvittavat resurssit suhteessa saatavaan informaatioon) on huomattavan hyvä johtuen niiden ominaisuuksista, kuten nisäkäsfysiologiasta ja -biologiasta, ruumiinkoosta, ylläpitoon ja toimenpiteisiin liittyvistä vaateista, sekä yleensä selkeistä vasteista testattaville lääkeaihoille. Huolellinen mallivalidaatio ja koulutettu henkilökunta varmentavat eläimille koituvan haitan minimoinnin yhdessä ylläpitoolosuhteiden optimoinnin, eläinten tiiviin seurannan, käytetyn eläinmäärän minimoinnin, mahdollisten kivunlievityskeinojen ja humanien yleisten ja mallikohtaisten lopetuskriteerien kanssa.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TAKAUTUVA ARVIOINTI

Saapumispvm: 17.12.2019. Arviointi ESAVI 17.12.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää uusi tutkimusmalli ihmisen maksasairauksien (hepaattinen enkefalopatia) mallintamiseen rotissa. Toisena tavoitteena oli kehittää lääkkeitä maksasairauksien hoitoon.

Hankkeen aikana suoritettiin yksi varsinainen validaatiotutkimus. Validaatiotutkimuksessa varsinainen sappitiehyen ligaatiokirurgia onnistui hyvin ja eläimiltä otettujen verinäytteiden perusteella mallissa voitiin todeta ennakko-odotusten mukaisesti muutoksia maksan eri entsyymien pitoisuuksissa. Valitettavasti elämillä todettiin kuitenkin runsaasti komplikaatioita kirurgiaan liittyen; osalla eläimistä havaittiin ongelmia haava-alueen kanssa ja eläimiä jouduttiin tämän takia lopettamaan. Koska malliin ei todettu olevan laajempaa kaupallista kiinnostusta, jatkotutkimuksia ei tehty. Näin ollen hankkeen toteutus jää vaillinaiseksi tavoitteiden onnistumisen suhteen: tutkimusmallia ei saatu luotettavasti toimimaan ja lääkkeitä testaukseen ei edetty.

2. Millaista haittaa?

Tutkimuksessa käytettiin 15 eläintä. Näistä 1 löytyi kuolleena ja 4 jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella. Vakavaa haittaa aiheutui 9 eläimelle ja kohtalaista haittaa 6 eläimelle. Kaikki hyvinvointiongelmat aiheutuivat kirurgiseen operaatioon liittyvistä komplikaatioista. Haava ei parantunut odotusten mukaisesti ja haava jouduttiin tikkaamaan uudestaan kiinni. Tämä lisäksi haava-alueella havaittiin tulehdusta. Komplikaatioiden varsinaista syytä ei saatu selvitettyä. Projekti päätettiin lopettaa yllä mainittujen ongelmien ja vähäisen kaupallisen kiinnostuksen takia.

3. 3R-mahdollisuudet

Muuta

Kirurgiaan liittyen on pyritty kiinnittämään huomiota aseptiikkaan, leikkausmenetelmiin ja koulutukseen. Tämän lisäksi eläinten post-operatiivista hoitoa ja eläinten tarkkailua on kehitetty. Auenutta haavaa tikattiin uudelleen vain yhden kerran. Jos haava kuitenkin aukesi toisen kerran, 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.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Eriyistä aiheutettuun haittaan liittyen: esim. satunnainen / toistuva, saatu vähenemään/ loppumaan 3R-keinoin	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa?
Ligaatio-malli/validaatio	Rotta	Tutkimusmallia ei saatu validoitua luotettavasti kirurgisten komplikaatioiden takia (-).	15/900	Vakava-9, Koh-talainen-6, Lievä-0, Ei toipumista-0	Kuolleena löydettyjen määrä: 1 Lopetuskriteerien perusteella lopetettujen määrä: 4.	Komplikaatioiden perusteella eläin lopetettu aikaisessa vaiheessa. Post-operatiivisessa hoidossa huomioitu pehmenetyn ruoan saanti, nesteytys ja kipulääkintä.

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	-

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	Sisäkorvan kehitys, toiminta ja stressivaste	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Kuuloelin, kuulotoiminta, kuulovamma, aistin- ja hermosolut,	
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)	Hankkeessa tutkitaan hiiren sisäkorvan kehitystä ja toimintaa, keskittyen kuuloelimen aistin-, tuki- ja hermosoluihin. (1) Pyrimme ymmärtämään sisäkorvan ja em. solutyypin kehitystä ohjaavia molekulaarisia mekanismeja. (2) Selvitämme mekanismeja, jotka liittyvät kuuloelimen ja näiden solutyypin vastee- seen stressille, ennen kaikkea melulle. Käytettävät äänenpainetasot ovat sellaisia, joita ihmiset kokevat normaalissa elämässä, joskus pitempiaikaisestikin. Tällä tutkimuksella voidaan löytää keinoja aistinsolujen ja hermosolujen tuhoutumisen estämi- seen. Kuulovammalle ei ole tällä hetkellä hyvää hoitoa, siis sel- laista, jossa hoidetaan vaurion syytä (solutuho) eikä vain oireita.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Uuden kuulovaurion hoitomuodon kehitys	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri, 560 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	1. Hiiret altistetaan melulle. Käytettävät äänenpainetasot aiheuttavat hiirille yleistä stressiä, mutta eivät kipua. Melutasot ovat sellaisia, joita koetaan pitempiaikaisestikin normaalissa elä- mässä, esim. konserteissa. Kokeen jälkeen eläimet lopetetaan ja korvakudos otetaan analyysiin, joko heti tai tietyn aikaperiodin kuluttua. Vakavuusluokka kohtalainen. 2. Lipopolysakkaridi-injektiot. Julkaistun tiedon perusteella käy- tettävä pitoisuus ei haittaa hiirten hyvinvointia. Vakavuusluokka lievä. 3. Tamoksifeeni-injektiot: Kokemuksemme ja kirjallisuuden mu- kaan tamoksifeeni ei haittaa hiirten hyvinvointia. Eläimet lope- tetaan tietyn aikaperiodin jälkeen altistuksesta. Vakavuusluokka lievä.	

	Eläimet lopetetaan siten, että ne tainnutetaan hiilidioksidilla ja dekapitoidaan heti sen jälkeen. Vakavuusluokat: lievä, kohtalainen
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Eliö- ja kudostasolla solut toimivat kiinteässä yhteydessä toisiinsa ja tähän vuoropuheluun perustuvat monet fysiologiset tapahtumat, myös ne joita tässä hankkeessa selvitetään. Soluviljelykokeissa tutkitaan yksittäisiä soluja, joten tämä malli ei toimi korvaavana menetelmänä ko. hankkeessa.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Huolellisella koesuunnittelulla, kokeen suorittamisella ja sen jälkeisellä kudosten analyysillä voidaan merkittävästi vähentää koe-eläinten käyttöä.
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. Korvan anatomiaa ja toimintaa on parhaiten tutkittu hiirellä. Sen korva vastaa pääpiirteissään ihmisen korvaa. b. Julkaistu tieto hiiren korvasta on pohja hankkeen puitteissa tehtäville tieteellisille hypoteeseille ja tavoitteille. c. Hiirten käyttäytymistä seurataan meluallistuksen aikana. Jos kudoksia ei oteta heti sen jälkeen analyysiin, hiirten hyvinvointia eläintalissa seurataan tarkasti. Injektiot tehdään vankkaan kokemukseen pohjautuen. Myös näiden toimenpiteiden jälkeen eläinten hyvinvointia seurataan.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm:16.10.2019. ESAVI arviointi ESAVI 11.12.2019.

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?
meluallistutus 105 db 2 h ja 91 dB 2h	hiiri	+	130/140	Kohtalainen	Hiiriä seurattiin huolellisesti meluallistuksen aikana ja sen jälkeen. Emme huomanneet erityisiä ongelmia. 105 dB:n allistuksen aikana hiiret olivat hissukseen laatikoissa. 91 dB:ssä ne liikkuvat laatikoissa. Molemmissa tapauksissa hiiret alkoivat käyttäytyä normaalisti, kun ne siirrettiin takaisin yhteislaatikoihin. Eläintenhoitajat ja me tutkijat emme huomanneet muutoksia hiirten elinkyvyssä (tutkin kunto, paino) tai käyttäytymisessä (kiinnostus saman laatikon muihin yksilöihin, pesärakenus, yleinen alttiivisuus).	Huolellisella kokeen suunnittelulla ja kudosten analyysillä voitiin vähentää eläinten määrää arvioidusta. -Tutkimustoiminnassa pyrin koe-eläinten määrän minimoimiseen huolellisella kokeiden suunnittelulla ja huolellisella kudosnäytteiden analyysillä. Meillä oli useampia tutkittavia aikapisteitä äänialtisten jälkeen ja jotta saisimme selvitettyä tilastollista merkitsevyyttä analyysiparametreillemme, tarvitsimme tietyn yksilömäärän per aikapiste. Tässäkin pyrimme minimiyksilömääriin. - Valitettavasti meluallistusta ei voi mallintaa in vitro. - Vaihtoehtoisesti aistinsolut saadaan tuhottua yliannoksella aminoglykosideja, mutta tämä myrkytys on hyvin haitallinen kaikille elintoiminnoille ja aiheuttaa eläimille paljon kärsimystä pitkäaikaisesti.

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 raportoituessa
empi 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	Vaihtoehtoisten hengityssentsyymien toimivuus aivosairausmalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	mitokondrio, hermorappeutumissairaudet, aivovaurio	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-opetus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tieteellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Useimmissa aivosairauksissa esiintyy mitokondrion toimintahäiriöitä eikä niihin ole tehokasta hoitoa. Tutkimuksen tavoite on ymmärtää paremmin mitokondrioiden toimintaa terveessä ja sairaassa yksilössä sekä kehittää potentiaalisesti uusi terapiamuoto neurodegeneratiivisiin tauteihin sekä aivovaurioon. Kehittämämme jyrksijäkannat tuottavat vaihtoehtoisia entsyymejä toimimaan perinteisten mitokondrion soluhengityskompleksien rinnalla. Yhdistettyinä eri tautimalleihin, tehtävät kokeet auttavat ymmärtämään sekä vaihtoehtoisten entsyymien toimintaa paremmin että mitokondrioiden toimintahäiriöiden roolia tautipatologiassa. Lisäksi tutkimus auttaa edistämään mahdollisen uuden terapiamuodon kehittämistä vaihtoehtoisista entsyymeistä.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	Taudin mekanismin ja mahdollisen hoitomekanismin ymmärtäminen on välttämätöntä uusien terapiamuotojen kehittämiseksi. Tässä projektissa tutkimme eläinmalleja, jotka ovat verrattavissa ihmisen sairauksiin. Onnistuessamme tutkimuksistamme tulevat hyötymään tulevaisuudessa varsinakin aivosairauksia sairastavat potilaat.	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 2160, rotta 1940 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu kohtalaista haittaa kirurgisista toimenpiteistä sekä indusoiduista tautimalleista. Toimenpiteiden aiheuttama kipu on lyhytaikaista. Transgeenisissä sairausmalleissa joudutaan käyttämään niin myöhäistä lopetuspistettä, että eläin voi joutua kokemaan vakavaa fyysistä haittaa. Eläimille voi aiheutua haittaa myös käyttäytymistestien suorittamisesta. Eläimet lopetetaan kokeiden päätyttyä.	
Vakavuusluokat: lievä ja vakava		
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi	Tutkimuksessamme käytetään rinnakkain soluviljelmiä aina kun se on mahdollista. Soluviljelmät ovat kuitenkin äärimmäisen keinotekoisia tutkimusympäristöjä, eikä niillä pystytä tutkimaan esimerkiksi hoidon vaikutusta eläinten toiminnalliseen toipumiseen. In vitro tutkimukset eivät myöskään riitä selvittämään mitokondrion toiminnan ongelmien	

korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	vaikutuksia organismin kehitykseen sekä elinten toimintaan tai rakentamiseen.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Minimoimaksemme eläinten lukumäärän, (i) teemme yhteistyötä maailmanlaajuisesti tiedemiesten kanssa välttääksemme tutkimusten toistoja (ii) teemme statistiset analyysit rajoittamaan eläinten lukumäärän mahdollisimman pieneksi (iii) tarkistamme vastaako tuotettujen eläinten genotyyppi odotettua
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkeitus minimoida?	A) Rotta- ja hiirimallit ovat hyvin käytännöllisiä sillä niiden genomi on helpposti muunneltavissa ja metabolia suurilta osin verrannainen ihmiseen, sekä kasvatusta ja ylläpito on vakiintunutta. Käyttämämme rotta- ja hiirimallit ovat parhaita saatavilla olevia tautimalleja. Niitä käyttämällä päästä luotettaviin tuloksiin, joiden perusteella voisi tehdä kliinisiä potilaskokeita. B) Hiirten ja rottien käyttö tutkimuksessa on perusteltua erityisesti geenimuunneltujen linjojen takia, sillä sairauksien taustalla on useita geneettisiä riskitekijöitä. C) Kaikki kirurgiset toimenpiteet suoritetaan anestesiassa ja riittävästä kipulääkityksestä huolehditaan sekä toimenpiteen aikana että sen jälkeen. Lisäksi eläimille aiheutuvan haitan minimoimiseksi sekä hyvinvoinnin parantamiseksi teemme tiivistä yhteistyötä eläintenhoitajien sekä eläinlääkäreiden kanssa.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 30.12.2019. ESAVI arviointi 8.1.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Tutkimuksen tavoite oli ymmärtää paremmin mitokondrioiden toimintaa terveessä ja sairaassa yksilössä sekä kehittää potentiaalisesti uusi terapiamuoto neurodegeneratiivisiin tauteihin sekä aivo- vaurioon. Tässä käsitellään Alzheimer, Huntingtonin ja SCA28 ataksia mallia (Osanhanke 2 ja 3 – Muistisairaudet ja Motoriset sairaudet). Hanke jouduttiin lopettamaan kesken tutkijoiden työsuhteen päättymisen vuoksi. Eläinmallit soveltuivat kuitenkin hankkeeseen, niillä esiintyi taudeille olennaisia fenotyyppisiä ja kanta pystyttiin risteyttämään AOX hiirikantaan, jonka avulla mitokondrioiden toimintaa voitiin tutkia. Alzheimer ja SCA28 malleissa ei manifestoitunut vakavia oireita, joiden perusteella eläimet olisi jouduttu lopettamaan.

2. Millaista haittaa?

Toimenpiteet eivät olleet tässä hankkeessa vakavia, vaan eläimen haitta aiheutui tautigeenin ekspressiosta. Eläimille tuli odotettu tauti-ilmentymä, kyseessä oli aiemmin kuvattuja tautimalleja. Yhdessä vakavaksi luokitellussa hankkeessa tosin eläimet lopetettiin ennen motoristen oireiden ilmenemistä, joten tosiasiallinen haitta oli lievä (SCA28 ataksia). Huntington mallissa, 17 eläimestä

ainoastaan 4 jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien täytyttyä. Pääsyinä olivat painonpudotus ja liikkumattomuus.

3. 3R-mahdollisuudet

In vitro malleja sovellettiin in vivo mallien rinnalla, mutta esimerkiksi eläimen selviytymistä ei voi mallittaa in vitro malleilla. Mielestämme hoitomenetelmät kuten pehmeän muonan tarjoaminen ja päivittäinen tarkkailu paransivat eläimien oloja siinä missä mahdollista. Lopetuspisteiden aikais-taminen onnistuu, mikäli on olemassa sopiva surrogaatti markkeri; meidän tapauksessa SCA28 mallille löytyi sopiva menetelmä, jolla voitiin nähdä taudin vaikutus aikaisemmin. Kun arvioimme efektiä selviytymiselle, niin lopetuskriteerien on tärkeä kuvastaa taudin loppua, jotta saadaan tarkka arvio vaikutuksesta siihen. Siihen mielestämme luvassa mainitut lopetuskriteerit toimivat. Uusissa hankkeissa vaikutusta on vaikea arvioida, liian pienet ryhmät voivat aiheuttaa sen, että koe pitää toistaa isommalla ryhmällä, jolloin eläinmäärät nousevat lisää. Joten eläinmäärän tulisi olla suhteutettu tehtäviin kokeisiin ja efektin kokoon, eikä niitä tulisi rajoittaa liikaa, mutta tukea voi antaa tutkijoille arvioida tarvittava eläinmäärä paremmin. Kaikista eläimistä kerättiin myös ku-dosta ja lisäanalyyseja tehtiin siinä missä mahdollista, joten niistä yritettiin saada kaikki mahdolli-nen tieto.

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 – ei tehty	-	-	-	-	-	-
Osahanke 2 - Alzheimer	hiiri	+	320/106	Lievä/lievä	Ei vakavia oireita	-
Osahanke 3 - Huntington	hiiri	-	160/17	Vakava/vakava	Painon putoaminen >25%, eläin ei enää syönyt/juonut, liikkumattomuus häkissä	Taudinkulkua ei pysty nyky menetelmin parantaa ja ymmärtääksemme taudin loppua ja vaikutustamme selviytymiseen, pitää eläimen selviytymistä tutkia loppuun asti. Lopussa eläimille annettiin pehmeää muonaa syömisen auttamiseksi ja eläimet lopetettiin lopetuskriteerien mukaisesti, ennen kuin kärsivät liikaa. Jos on olemassa surrogaattimarkkereita (biomarkkereita), niitä voidaan jatkossa mitata ja eläimet lopettaa aikaisemmin, mutta hyvää biomarkkeria selviytymiselle huntington taudissa ei ole. Hanke lopetettiin etuajassa sillä tutkijat lopettivat.
Osahanke 3 - Ataksia	hiiri	-	160/31	Vakava/lievä	Ei vakavia oireita	Eläimet lopetettiin ennen oireita koska käytimme aivopatologiaa surrogaattimarkkerina mitokondriaalisen toiminnan vaikutuksesta taudissa.
Osahanke 4 – 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 raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	X	X	-	-
Pesämateriaali	X	X	X	-
Totuttaminen	X	X	X	-
Pehmeä muona	X	X	X	-

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ: Tiivistelmä 95-2017		
Hankkeen nimi	Toiminnallinen magneettikuvantaminen hereillä olevilla rotilla	
Hankeluvan kesto	1 vuotta	
Avainsanat	magneettikuvaus, EEG, lääkeaineet, trauma	
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)	Toiminnallinen magneettikuvantaminen (fMRI) on monipuolinen kuvantamismenetelmä, joka mahdollistaa aivojen toiminnan tutkimisen kehoon kajoamatta, hyvällä aika- ja paikkatarkkuudella. Eläimillä tehtävissä fMRI-kokeissa nukutusaineet ovat kuitenkin merkittävä häirttekijä, koska ne muokkaavat voimakkaasti aivojen perustoimintaa, vaikuttaen tutkimustuloksiin. Tästä syystä tässä hankkeessa hyödynnetään uudenlaisia menetelmiä, jotka mahdollistavat fMRI-kuvantamisen hereillä olevilla rotilla. Hankkeessa keskitytään aivojen lepotilan verkostoitumisen tutkimukseen, sekä siihen kuinka lääkeaineet muokkaavat tätä verkostoa. mahdollisia uusia diagnoosi- ja/tai hoitokohteita. Tutkimme menetelmässä myös mahdollisuutta yhdistää magneettikuvantamisen kanssa EEG:tä, kun kuvantaminen tapahtuu liikkuvalla alustalla, joka mahdollistaa eläinten liikkumisen päästä lukuunottamatta.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	Hereillä olevilla eläimillä tehtävä MRI-tutkimus palvelee lääketutkimus- ja kehitystyötä, hoitovasteen seuranta, sairauksien diagnosointia, sekä lisää ymmärrystä aivojen toiminnasta. Lisäksi hereillä olevilla eläimillä saadut tulokset ovat paremmin siirrettävissä kliiniseen käyttöön (verraten tutkimuksiin, joissa on käytetty nukutusaineita).	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Rotta, 55 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvioitavat vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Tutkimuksissa eläimille ennakoitu haitta on kohtalainen. Eläimet ovat hereillä MRI-laitteen sisällä kiinnitettynä pehmustettujen tukien avulla, siten että eläinten vapaa hengitysliike ei esty. Vaihtoehtoisesti eläimet ovat hereillä MRI-laitteessa juoksumaton päällä ja päästä kiinnitettynä. Mittauksen aikana eläimet ovat yleensä lepotilassa (ei ulkoista ärsykettä) tai eläimelle voidaan anostella lääkeainetta. MRI-kuvauksien jälkeen eläimet palauteaan omiin häkkeihinsä. 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?	Tavoitteena on kehittää MRI menetelmiä koko aivot kattavaan tutkimukseen, jolloin tietokonesimulaatiot, solu- tai leiketutkimukset eivät pysty tarjoamaan vaihtoehtoa.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Arvio tarvittavasta eläinmäärästä perustuu aikaisempaan kokeemukseemme hajonnasta vastaavista tutkimuksista sekä niiden avulla laskettuun voima-analyysiin
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a/b) MRI-tutkimuksia on tehty useilla eri eläinlajeilla (kädelliset, kissat, rotat, hiiret). Rottia käytämme niiden hyvän saatavuuden sekä hyvin tunnetun fysiologian ja anatomian vuoksi. Rotat ovat helpompi kuvauskohde verrattuna hiiriin suurempien aivojen vuoksi. Rotille olemme myös kehittäneet aiemmin hereillä olevan kuvausmenetelmän. c) Eläinten fysiologisia toimintoja ja liikkeitä seurataan toimenpiteiden ajan, jotta voidaan varmistua stressin tasosta. Leikkauksien aikana eläimet ovat syvässä nukutuksessa, jonka jälkeen eläimille annetaan tarvittavat kipulääkkeet.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 27.9.2019. Arviointi ESAVI 18.10.2019.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen 'Toiminnallinen magneettikuvantaminen hereillä olevilla rotilla' ja siihen liittyvän muutoslavan tavoitteena oli kehittää sekä suorittaa toiminnallista magneettikuvantamista hereillä olevilla rotilla. Hankkeessa hyödynsimme jo hyväksi todettuja menetelmiä immobilisoitujen rottien kuvantamisessa sekä kehitimme uudenlaista menetelmää, joka mahdollistaa päästä kiinnitettyjen käyttäytyvien rottien kuvantamisen.

Immobilisoitujen rottien menetelmän olemme todenneet käytännössä toimiviksi, sillä rottien stressiarvot ovat alentuneet merkittävästi koulutuksen myötä ja MRI-kuvantaminen on onnistunut liikkeen ja stressin ollessa vähäistä. Hereillä olevien rottien MRI-tulokset ovat osoittautuneet myös tuovan huomattavan paljon lisäarvoa verrattuna MRI-kuvantamiseen nukutetuilla rotilla. Tutkimuksemme liittyen hereillä olevaan kuvantamiseen on herättänyt suurta mielenkiintoa tutkimusyhteisössä ja kahteen julkaistuun artikkeliimme aiheesta on ensimmäisen vuoden aikana viitattu erittäin runsaasti (35 kertaa, Google Scholar).

Käyttäytyvien rottien kuvantamismenetelmä on lähtökohtaisesti eläimille luonnollisempaa niiden ruumiin ollessa vapaana lukuun ottamatta pääkiinnitystä. Olemme todenneet, että rotat ovat pääasiassa paikallaan, tai satunnaisesti kävelevät tai juoksevat juoksualustan päällä. Rottien kokeman stressin voi todeta videokameran kautta nauhoitettavan liikkeen tai eleiden perusteella. Stressaantunut rotta pyrkii pääsemään päästä kiinnityksestä irti tehden pakenemisen kaltaisia liikkeitä (yrittää peruuttaa juoksualustan päällä). Kyseisiä liikkeitä olemme havainneet ensimmäisen päivänä joillakin rotilla, tilanteen ollessa rotille uusi. Seuraavina päivinä pakoyritysten määrä on huomattavasti vähentynyt tai lakannut kokonaan, joka osoittaa

rottien tottuvan päästä kiinnitykseen. Totesimme, että olemme onnistuneet hankkeen tavoitteissa, sillä rottien kuvantaminen on onnistunut ja olemme saaneet hyviä MRI-tuloksia. Olemme kehittäneet käyttäytymisen rottien kuvantamistekniikan siihen pisteeseen, että olemme valmiita aloittamaan suurempien kohorttien kuvantamisen sekä lisäämään rotille erilaisia stimulaatioita (haju, tunto, näkö, palkitseminen, ym.) kuvantamisen aikana. Kyseisen tekniikan kehittäminen voi tuottaa merkittäviä löydöksiä prekliinisen kuvantamisen saralla.

Eläinmallina rotta soveltuu tutkimukseen, nopean MRI-kuvantamisympäristöön tottumisen ja helpon käsiteltävyyden ansiosta.

2. Millaista haittaa?

Eläinten kokema tosiasiallinen haitta oli arviomme mukaan lievä koulutuksen osalta ja enimmillään kohtalainen operaatioiden jälkeen. Rottia totutettiin ennen magneettikuvantamista 4-9 päivää MRI-kuvantamisympäristöä vastaavissa olosuhteissa. Aiempien kokemustemme mukaisesti rotat liikkuvat eniten koulutusjakson ensimmäisenä päivänä, jolloin niiden kortikosteroniarvojen on todettu olevan suurimmillaan (kuitenkin vain n. 150 ng/ml). Seuraavina totuttamispäivinä ja kuvantamispäivänä rottien kokeman stressi vähenee aiemmin mitattujen stressiarvojen laskemisen (kortikosteroni, liike, syke) perusteella. Tosiasiallinen haitta vastasi etukäteisarvioita, ja totuttamissessioita ei tarvinnut keskeyttää tai eläimiä ei tarvinnut lopettaa kesken hanketta lopetuskriteereiden pohjalta. Osahankkeessa 1 olemme injektointeet kuvantamisessa käytettävää merkkiainetta (pyruvaatti) kanyyliin (23G neula) kautta häntälaskimoon. Rotan häntä on puudutettu lidokaiinilla ennen merkkiaineen injektiota (injektio 1% lidokaiinia, 200µl kahdelle puolelle häntää anestesian aikana). Merkkiaine on tehty pH:ltaan neutraaliksi. Injektion aikana osa rotista on pysynyt täysin paikallaan ja osa rotista on reagoinut pienellä liikkeellä injektion loppuvaiheessa. Liikkuminen on loppunut kuitenkin heti injektion jälkeen. Emme ole huomanneet, että häntään olisi tullut vaurioita injektion seurauksena. Häntäinjektion arvioitu haitta oli lievä. Yliopistomme eläinlääkäri on seurannut osahankkeen toimenpiteitä muutamilla yksilöillä kokeen alusta kokeen loppuun, ja raportoinut eläinten kokeman haitan olevan lähempänä lievää kuin kohtalaista. Eläinlääkäriin yksityiskohtainen raportti on toimitettu lautakunnan nähtäväksi muutoslavan yhteydessä.

3. 3R-mahdollisuudet

1. Korvaavat menetelmät

Koko aivojen kattavassa, eläinten toiminnallisten yhteyksien tutkimuksessa ei ole olemassa vielä vaihtoehtoisia menetelmiä.

2. Eläinten määrän vähentäminen

Hankkeessa käytimme aiempien tutkimuksien pohjalta tehtyjen voima-analyysien pohjalta vain tarvittavan määrän rottia, kuitenkin saaden tilastollisesti merkittäviä tuloksia. Koska toimenpiteet eivät ole terminaalisia, samoja rottia voidaan kuvata useamman kerran. Rottien käydessä läpi yhden koulutuskerran, niiden seuraavaa koulutusjaksoa voidaan lyhentää ja täten nopeuttaa tuloksien keräystä. Kokonaisuutena hereillä oleva kuvantaminen vähentää merkittävästi tarvittavaa kokonaiseläinmäärää, koska sama yksilö voidaan kuvata useamman kerran ja löydökset aivot toimintaan liittyen ovat luotettavampia.

3. Hyvinvoinnin parantaminen

Hyvinvoinnin parantamisessa käytimme hereillä olevien eläinten totuttamisessa ja kuvantamisessa menetelmiä, jotka on todettu aiheuttavan minimaalisesti stressiä. Näitä olivat immobilisoitujen rottien osalta rottien immobilisoinnissa käytetyt pehmustetut tuet, joustava vaahtomuoviharso ja korvatappien

käyttämättä jättäminen; totuttamisvaiheessa asteittain nousevat ajat, sekä rottien kuulon suojaaminen sili-konikorvatulpilla. Käyttäytyvien rottien osalta hyvinvointia parantavat rottien vapaampi liikkumismahdollisuus, pidempi ja hienovaraisempi totuttamisjakso (2 viikkoa), totuttamisvaiheessa asteittain nousevat ajat sekä rottien kuulon suojaaminen silikonikorvatulpilla.

3.1. Väliseinälliset parihäkit

Olemme yhteistyössä Koe-eläinkeskuksen kanssa investoineet väliseinällisiin parihäkkeihin (Double-decker -häkki, <https://www.nc3rs.org.uk/double-decker-rodent-telemetry>). Häkit ovat selkeästi korkeampia, kuin tällä hetkellä käytössä olevat IVC-häkit, joka mahdollistaa rottien luonnollisemman käyttäytymisen. Lisäksi väliseinän verkon kautta rotat pääsevät vuorovaikuttamaan toistensa kanssa muun muassa hajun, kosketuksen ja näköyhteyden avulla. Häkkien toivotaan tuovan parannusta rottien hyvinvointiin ja ehkäisevät masennuksen ja ahdistuneisuuden syntyä, mitä rotat voivat yksittäishäkeissä kokea. Rotille asennettavien pääimplanttien kannalta korkeat häkit helpottavat myös selvästi rottien vapaampaa liikkumista. Täten implantti ei jää esimerkiksi jumiin tai törmää häkin rakenteisiin yhtä helposti, kuin matalammissa yksittäishäkeissä.

3.2. Palkitseminen

Olemme tutkineet rottien palkitsemista päästä kiinnityksen aikana, tarjoamalla niille 1% sokerivettä. Rotat lipovat sokerivettä ajoittain, mikä voi edelleen lievittää niiden kokemaa stressiä koulutuksen yhteydessä. Tulemme jatkossa palkitsemaan rotat sokerivedellä sekä koulutuksen yhteydessä, että ennen ja jälkeen koulutuksen (sokerivesi ja suklaamurot).

3.3. Pitkä koulutusjakso

Käyttäytyvien rottien koulutuksessa hyödynnämme pidempää 2 viikon koulutusjaksoa. Olemme todenneet rottien tottuvan huomattavasti paremmin päästä kiinnitykseen pidemmän koulutusjakson kautta (vrt. 1 viikko). Ensimmäisen viikon aikana rotat totutetaan koulutusympäristöön (ilman päästä kiinnitystä), MRI-ääniin, MRI-telineeseen ja rotille tarkoitettuihin ulkoilutusvaljaisiin (joita käytetään päästä kiinnityksen yhteydessä). Pään paikallaan pysymiseen rotat totutetaan ensimmäisen viikon lopussa pitämällä rottien päätä paikallaan muutamia sekunteja ja tarjoamalla suklaamuroja välittömästi palkinnoksi. Vasta toisen koulutusviikon aikana rotat totutetaan päästä kiinnitykseen eläintelineessä.

Muuta

Kevyesti nukutettujen ja hereillä olevien rottien tulokset on esitetty ELLA-kokouksessa 21.02.2017. Luvan hakemisen yhteydessä on esitetty eläinlääkäriin raportti liittyen hereillä olevien immobilisoitujen rottien magneettitutkimukseen.

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?
Hereillä olevilla rotilla tehtävä farmakologinen toiminnallinen magneettitutkimus	Rotta, Wistar	+	25/21	Vakava/lievä	Vakavin haitta oli lievässä anestesiassa tehtävä magneettikuvantaminen ja siihen liittyvä totutus, jonka vuoksi eläin jouduttiin immobilisoimaan. Kesto 4 päivää. Stressitasot ja sitä myöten eläimen kokema haitta vähenivät totutuksen myötä.	Eläimen hyvinvointia parannettiin rotan immobilisoinnissa käytettävillä pehmusteilla ja vaahtomuoviharsolla, asteittain pitenevällä totutusajoilla (15, 25, 35, 45 min/pv), korvatappien välttämällä sekä kuulon suojaamisella silikonikorvitulpilla. Eläinmäärät pidettiin minimissä siten, että ryhmien välille saatiin tilastollisia eroja.
Pilotti EEG-fMRI-tutkimus päästä kiinnitetyllä juoksumatolla liikkuvalla rotalla	Rotta, Wistar	+	30/13	Vakava/kohdalainen	Vakavin haitta oli päästä kiinnityksen implantoinnista toipuminen. Postoperatiivista kivunlievitystä ja erityisruokintaa jatkettiin kahden päivän ajan, jolloin eläimen kunnon arvioitiin palautuvan ennalleen.	Käyttäytyviä rottia totutetaan 9 päivän ajan, jonka ansioista rotat tottuvat päästä kiinnitykseen paremmin. Rotat pääsevät liikuttamaan vapaasti raajojaan juoksumaton päällä, joka lieventää niiden kokemaa stressiä. Rottien pidetään isommissa double decker –häkeissä. Rotat palkitaan sekä koulutuksen yhteydessä, että ennen ja jälkeen. Eläinmääriä on voitu vähentää kuvaamalla samoja rottia useamman kerran.

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
Rottien uudelleenkäyttäminen	X	X	X	X
Stressitaso (kortikosteroni, syke, hengitystiheys, liike, paino)	X	X	X	X
Totuttaminen	X	X	-	X
Palkitseminen	X	X	X	X
Double Decker -häkit	X	X	X	X