



2016. a loomkatsete mittetehnilised kokkuvõtted

2017

Sisukord

1	Langendorfi perfusioonisüsteemiga õppeeksperimendid südametegevuse regulatsioonimehhanismide tundmaõppimiseks	3
2	Rekombinantse GH, FSH ja INS tootmine veise piimas transgeneetiliste ja genoomi editeerimise meetoditega.....	4
3	Neuraalsed adhesioonimolekulid kui potentsiaalsed terapeutilised sihtmärgid aju plastilisuse häirete korral (IUT2-3 grandiga seotud tegevused)	4
4	Terapeutiliste cDNA vektorite (GTU) efektiivsuse uuring lammastes	7
5	Th17 tsütokiinid kandidoosi vastases kaitses	8
6	<i>CPP & Tumor</i>	8
7	Ketamiini toime uurimine wolframiini (<i>Wfs1</i>) geeni puudulikkusega hiirtel	9
8	Angiogenees <i>Cd44</i> geeni <i>knockout</i> hiirtes	10
9	Metaboolsed uuringud <i>WFS1</i> -puudulikel hiirtel.....	12
10	Psühhoosi mudeldamine amfetamiini manustamisel – mõju <i>Egf</i> ja <i>IgLON</i> perekonna ekspressioonile	13
11	Maksakahjustuse regeneratsiooni mehhanismid parenhüümi ja sapiteede samaaegsel kahjustusel	14
12	Uudsete kation-amfifiilsete ühendite farmakokineetika uurimine in vivo kuvamismeetodil, eesmärgiga arendada uusi ravimikandjaid iminestele. (koostööprojekt Läti Orgaanilise sünteesi instituudi ja Tartu Ülikooli vahel)	15
13	Endogeensete fluorofooride uurimine hiirte ja rottide ajus.....	16
14	Ümarmudila (<i>Neogobius melanostomus</i>) kodupiirkonna suuruse hindamine.....	17
15	Polükloonsete antikehade arendamine kodukanades.....	18

16	Neurodegeneratiivsete haiguste hiiremudelite neuronaalne kuvamine	19
17	Neurodegeneratiivsete haiguste hiiremudelite käitumise uurimine.....	20
18	Pilootkatse. Hiire VEGF monoklonaalse antikeha ekspressioon lihastes - võimalik kasvavastane ravi Ewing sarkoomi vastu (A673) fox1 nu/nu hiiremudelis.....	21
19	Superkomplekside moodustumise ja oksüdatiivse fosforüülimise vaheline seos südame mitokondrites.	23
20	DNMT ja TET perekonna ensüümid kui uued biomarkerid ja terapeutilised sihtmärgid psühhostimulaatorite poolt indutseeritud ravimsoõltuvuse raviks	27

1 Langendorfi perfusioonisüsteemiga õppeeksperimentid südametegevuse regulatsioonimehhanismide tundmaõppimiseks

Loomkatseprojekt näeb ette Langendorfi perfusioonisüsteemiga õppeeksperimentide teostamist südametegevuse regulatsiooni- ja kaitsemehhanismide tundmaõppimiseks. Üliõpilastele demonstreeritakse isheemia, isheemilise eelkohastumise ning reperfusiooni toimeid südame poolt arendatavale rõhule.

Eeldatav kasu: Tulevaste arstide põhjalikumad teadmised südamelihased toimuvatest mehhanismidest, mis võimaldavad paremat ravi ning on olulised ka kriisisituatsioonides. Läbiviidud demonstratsioonikatsed võivad tekitada üliõpilastes huvi ka edaspidiseks teaduslikuks uurimistöök, mis võib anda olulist infot südamelihase kaitsemehhanismide kohta ning samuti ka praktilist kasu uute ravimite väljatöötamisel.

Kahju: Loomadele tekitatud kahju seisneb 200 isase Wistar liini roti kasutamises, kellele tekitatakse nõrka lühiajalist valu kolme intraperitonaalse süstiga. Need menetlused ei põhjusta katseloomadele pikaajalisi kannatusi ega valu. Südame eemaldamine, mis põhjustaks loomale ülemäärast valu ja kannatust viiakse läbi anesteseeritud loomal, mille tõttu loom ka enne anesteetikumide mõju lõppu hukkub. Esitatud katseloomade arv, on vajalik selleks, et katseid oleks võimalik näidata viie aasta jooksul kõigile arstiteaduse üliõpilaste praktikagrupidle.

Asendamine: On olemas lihtsad õpetöös kasutatavad demod südame funktsiooni tundmaõppimiseks nagu Hyper Heart ja Circ Adapt kuid isheemia-reperfusiooni muutusi pole võimalik nende abil simuleerida. Langendorffi perfusiooni teostamise kohta oleme ka näidanud vastavaid videoid, kuid pole leidnud sellist, kus demonstreeritaks isheemia ja järgneva perfusiooni toimet. Seetõttu on plaanis need videod luua lähtudes artiklitest, kus on seda ja südant isheemia vastu kaitsvaid toimeid uuritud (Tähepõld et al 2002; Bittl et al 1985). Vajaminevad teoreetilised teadmised saavad tudengid suurel määral eelnevast õppetööst, kus käsitletakse rakukahjustuse mehhanisme. Siiski ei saa õppetöös piirduda ainult nende videote demonstreerimisega, elusal südamel tehtud näidiseksperimentid võimaldavad tudengitel mõista paremini reaalseid situatsioone, mida ükski demo ei asenda. Näidiseksperimenti käigus toimuv südame taaskäivitumine on varieeruv ja väga individuaalne. Sellist variatsiooni ei ole võimalik demonstreerida simulatsiooniprogrammides. Arstiõppe programmis on ka nõue kasutada reaalseid objekte õppetöös, sest kuidas muidu tuleksid arstidele vältimatult vajalikud praktilised oskused.

Tähepõld P, Ruusalepp A, Li G, Vaage J, Starkopf J, Valen G. Cardioprotection by breathing hyperoxic gas-relation to oxygen concentration and exposure time in rats and mice. Eur J Cardiothorac Surg. 2002 Jun;21(6):987-94.

John A. Bittl, Myron L. Weisfeld, and William E. Jacobus. Creatine Kinase of Heart Mitochondria The Journal of Biological Chemistry, 1985; Vol. 260, 10, pp. 208-214.

2 Rekombinantse GH, FSH ja INS tootmine veise piimas transgeneetiliste ja genoomi editeerimise meetoditega

Kloonimine on kiirelt arenev biotehnoloogia meetod. Selle loomkatse eesmärgiks on kloonimise ja genoomi modifitseerimise meetodite abil luua transgeenseid piimaveiseid, kelle piimast oleks võimalik välja puhastada inimesele omaseid hormone. Tegemist on rakendusuuringuga, mille eesmärk on senisest efektiivsemate bioloogiliste ravimite tootmise tehnoloogiate arendamine inimeste haiguste raviks. Tulenevalt katsete eesmärgist, ei saa loomkatset asendada ega vähendada. Katsete käigus kogutavad teadusandmed võimaldavad kasutatavaid tehnoloogiaid täiendada ja arendada. Katsetes kasutatakse retsipientidena 120 holsteini tõugu mullikat. Loomkatse käigus sündinud loomad keskkonnaohtu ei sisalda, kuna transgeenseid loomi kasvatatakse ainult farmis ja loodusesse ei lasta. Kasutatavate katseloomade pidamise tingimused on sarnased farmis peetavate loomade tingimustega. Katses kasutatavate loomade arv on minimaalne, et oleks võimalik saada katsete tulemusena 10 transgeenset järglast. Samu retsipientide on võimalik kasutada korduvalt, et vähendada loomkatsetes osalevate loomade arvu. Korduvalt kasutatakse neid loomi, kes ei ole tiinestunud esmakordsest embrüote siirdamisest, mis tehakse kindlaks ultrasonograafilisel uurimisel 30.-35. päeval pärast embrüote siirdamist. Arvestades keskmiseks tiinestumiseks pärast embrüosiirdamist 50%, kasutame korduvaks siirdamiseks kokku 50-60 looma. Loomkatse võimalik kahju loodet kandvale retsipientile on varajane abort, suure järglase sündroomi ja/või lootekestade vesitõve tekkimine. Arvestades transgeensete tehnoloogiate praegust arengutaset maailmas, ei ole võimalik neid riske täielikult vältida. Nende riskide maandamiseks monitooritakse retsipientide seisundit kliiniliselt ja ultrasonograafiliselt kuni kandeaaja lõpuni. Lootekestade vesitõve ja suure järglase sündroomi diagnoosimisel kutsutakse esile sünnitus, teostatakse keisrilõige ja intensiivne ravi. Varajase aborti korral jälgitakse retsipientide suguelundite ja munasarja aktiivsuse taastumist, ta eemaldatakse katseloomade hulgast ning seemendatakse esimesel võimalusel, et tagada looma normaalne sigimisyritus. Katsete eeldatav kahju vasikale seostub enneaegse sünnituse ja suure järglase sündroomi esinemisega. Võimalikeks tüsistusteks sellisel juhul on hingamisprobleemid ja nõrk immuunsüsteem. Transgeense kloonvasika sünni järel teostatakse tema ööpäevane veterinaarne valve esimese 1-2 elukuu jooksul ja seejärel visiidid sagedusega 2-3 korda päevas kuni sünnijärgsete tervisprobleemide möödumiseni.

3 Neuraalsed adhesioonimolekulid kui potentsiaalsed terapeutilised sihtmärgid aju plastilisuse häirete korral (IUT2-3 grandiga seotud tegevused)

Antud uuringute planeerimisel on võetud aluseks teaduslikult kinnitatud teadmine, et neurodegeneratiivsete (nagu nt. Alzheimeri tõbi) ning neuropsühhiaatriliste haiguste (nagu nt. depressioon, skisofreenia, epilepsia) tekkepõhjustes on oluline roll aju plastilisuse häiretel. Aju plastilisust saab kirjeldada kui aju omadust kohaneda ning reageerida erinevatele sise- ja väliskeskkonnast tulenevatele stiimulitele ning see on kompleksne ning äärmiselt vajalik protsess aju kohanemisprotsesside tagamiseks. On teada, et närvirakkude adhesioonimolekul (NCAM) ja tema polüsialüülitud vorm (PSA-NCAM) on valgud, mis on üheks peamisteks sünaptilise ja

neuronaalse plastilisuse kujundajateks. Nende roll ajus on närvirakkude omavaheliste kontaktide loomine ja säilitamine, ning nende tähtsus on tõestatud ka närvirakkude infovahetuseks vajalike sünaptiliste kontaktide loomisel ning funktsioneerimisel. See omakorda on olulise tähtsusega meeoleolu, mälu ja kognitiivsete funktsioonide tagamisel. Erinevate neurodegeneratiivsete haiguse korral on näidatud, et neuronaalsete adhesioonimolekulide tase ja funktsionaalsus ajus on muutunud, ning selle põhjal on püstitatud mitmeid teooriaid, mille kohaselt on nende patoloogiate kujunemisel ja sellega kaasnevate kognitiivsete funktsioonide häires oluline roll neuronaalsetel adhesioonimolekulidel. Siit tulenevalt on antud projekti peamine eesmärk NCAMi ja sünaptilise adhesioonimolekulide rollide selgitamine rakulistes ja molekulaarsetes neurodegeneratsiooni mehhanismides aju plastilisuse häirete korral, mis omakorda loob võimaluse tuvastada uusi võimalikke biomarkereid ja luua uusi ravimikandidaate neuropsühhiaatriliste ja neurodegeneratiivsete haiguste raviks.

Antud uuringu kavandamisel on arvestatud 3R (loomkatsete asendamise-Replacement, vähendamise-Reduction ja täiustamise-Refinement) põhimõtet ning on leitud, et väljatoodud uuringud vastavad nendele nõuetele. Katsegruppide suurus on arvestatud selliselt, et saadavad tulemused oleksid statistiliselt usaldusväärsed. Arvestades andemete kõikumust eriti gruppides kus võivad esineda loomade tervisele ohtlikud muutused, siis pikemaajaliste uuringute grupis peab olema vähemalt 10 looma/grupp/sugu. Antud projekti eeldadavaks kasuks on eelkõige vastuse saamine baasteaduse seisukohalt olulisele küsimusele: milline on sünaptiliste ja neuronaalsete adhesioonimolekulide roll aju plastilisuse regulatsioonis ja kuidas on häireid aju plastilisuses võimalik farmakoloogiliselt mõjutada NCAMi ja tema signaalradade vahendusel. Antud uuringust tulenev eeldatav kahju on eelkõige katseloomadele põhjustatav kahju sh manustamisest ja protseduuridest põhjustatud stress, samuti lühi- või pikaajaline valu (nt sabariputamise- ja passiivse vältimise katse või neuropaatilise valu katse) ning võimalike tervislike vaeguste teke nii diabeedikatse uuringutes (kehakaalu langus, neuropaatilised kahjustused) kui erinevate ainete, nagu lipopolüsahhariid või kaiinhappe manustamistest tulenevad tervisekahjustused (madalalävine põletik, krambid). Vältimaks katseloomade valu ja kannatusi paiksetest teostavate protseduuride (sabast vere võtmine indutseeritud diabeedikatses glükoosi taseme monitooringuks) korral kasutatakse tuimestavat 5% lidokaiinisaldusega geeli, mida stressi ja valu minimeerimiseks määratakse sabale. Vähendamaks erinevate protseduuridega seotud katseloomade stressi (eelkõige katsetes, kus akuutse stressi tekitamine protseduuridega ei ole eesmärgiks), harjutatakse neid eelnevalt katseseadmetega. Kui tiinusaegse stressi mudelis tiinetele loomadele tekitatakse stressi, siis siin ei ole katseseadmega harjutamine asjakohane, kuna eesmärgiks ongi tiinele emasloomale stressi tekitamine, kuid kui hakatakse läbi viima käitumiskatseid nende emasloomade täiskasvanud järglastega, siis enne iga käitumiskatset harjutatakse järglasi katseseadmega, et vältida akuutse stressi mõju väljakujunenud käitumismustrile. Nende katseloomade, kes kannatavad katse käigust mittetulenevate valude käes või muude raskete seisundite nagu nt. krambid kaiinhappe manustamise tagajärjel (hinnatuna vastava skoori alusel 1-5, ning loomad, kellel esineb 30 sek. Jooksul krambiskoor 5) või kelle kehamass langeb uuringu käigus üle 20%, kasutatakse humaanselt eutanaasiaks Dorminali (pentobarbitaalnaatrium, 200 mg/kg i.p.). Uuringu lõppedes hukatakse surmava annuse anesteetikumiga uinutatud loomad ning viiakse läbi lahkamine, kus nende organeid uuritakse põhjalikult mikroskoopilisel uuringul. Loomad, kellega on vaja läbi viia tõsisemaid valu põhjustavaid kirurgilisi protseduure (siaalnärviligeerimine), uinutatakse 4% isofluoraaniga ning seejärel teostatakse protseduur. Postoperatiivselt valuvaigisteid ei manustata.

Antud projekti IUT 2-3 seotud uuringute in vitro mudelite teostamiseks planeeritakse primaarkultuuri jaoks kasutada 200 tiinet hiirt ebrüonaalse rakukultuuri valmistamiseks ja rakultuurides hinnatakse in vitro järgnevaid aineid: prolüülendopeptidaasi inhibiitor KYP-2047, maatriksmetalloproteaasi inhibiitor MMP-9 neutraliseeriv antikeha, NCAM-mimeetikum enreptiini peptiid, antidepressant tsitalopraam. Hinnatakse nimetatud ainete toimet sünaptiliste ja neuronaalsete adhesioonimolekulide ekspressioonile ning lisaks hinnatakse rakkudel elulemusnäitajaid. Kui nimetatud ained omavad potentsiaali edasisteks uuringuteks, viiakse läbi loomakatse. Eelnevalt selgitatakse avaldatud teaduskirjanduse põhjal nimetatud ainetega seonduvad nii farmakoloogilised aspektid (annus, lahustuvus, efektiivsuse manustamisviis jt) kui ka toksilisus ning võimalikud aspektid, mis võiksid mõjutada loomade tervisklikku seisundit ning heaolu. See võetakse arvesse lõpliku katseprotokolli koostamisel ja vormistamisel ning selle koostamisel lähtutakse põhinedes kõige uuemale teadusinfole uuritavate ainete kohta. Käitumuslike uuringute läbiviimiseks, samuti uuringutes, kus eelnevalt on manustatud erinevaid aineid (prolüülendopeptidaasi inhibiitor, KYP-2047, annuses 5 mg/kg, i.p. 1 kord päevas, 5 päeva jooksul) maatriksmetalloproteaasi inhibiitorid (MMP-9 neutraliseeriv antikeha, 3 mg/kg, i.v.), NCAM-mimeetikum (enreptiini peptiid (AKTVKFK), annuses 5 mg ja 10 mg/kg, ühekordselt, s.c), antidepressant (tsitalopraam, annuses 10 mg/kg, i.p., 21 päeva jooksul) nn stressi, põletiku või neurodegeneratsiooni mudelitel planeeritakse kasutada metsiktüüpi hiiri. Neuropaatilise valu mudelis ja indutseeritud diabeedi uuringus on planeeritud kasutada kummaski C57BL/6J hiiri. Juhul kui in vitro katsed primaarkultuuril näitavad uuritavate ainete toimet konkreetses in vitro haigusmudelis on vajalik jätkata eksperimente in vivo haigusmudelites e. in vivo kutsutakse hiirel esile patoloogiasarnane seisund. Hoolimata soovist katseloomade kasutamist piirata ei ole võimalik neurodegeneratiivseid haigusi ja farmakonide toimet ainult rakukultuuril modelleerida. Põhjus, miks nimetatud ainete toime uurimise katsed viiakse läbi hiirtel ja rottidel, tuleneb teaduskirjandusest, mille põhjal võib järeldada, et alternatiivsed in vitro meetodid mälu patoloogiate uurimiseks puuduvad, samuti on selge, et rakukultuuridel (näiteks primaarne närvirakkude kultuur) ei saa modelleerida soovitud käitumuslike ja biokeemilisi muutusi. Närlisi kasutataksegi antud uuringus eesmärgil korreleerida katseloomade käitumiskatsetest saadud tulemusi (fenotüüp), katseloomade erinevates kudedes avalduvate biokeemiliste, geneetiliste ja epigeneetiliste muutustega. Rotid ja hiired on tunnustatud nende uuringute jaoks parimateks, kuna nende aju on anatoomiliselt väga sarnane inimese omaga. Samuti on leitud sarnasus nende funktsioonides, eeskätt regioonides, mis osalevad õppimise ja mälu formeerumises ning on näidatud sarnased mehhanismid patoloogiate väljakujunemisel. Patoloogiate tagajärjel väljakujunenud muutusi on võimalik meie laboritingimustes uurida väljatöötatud ja tunnustatud meetoditega.

Loomkatsetesse on planeeritud loomi järgmiselt:

Hiired: Rakukultuuri valmistamiseks: 200 emast ja isast 50 Balb/C liini hiirt; Neuroloogiliste põletike mudelites: 120 isast Balb/C liini hiirt; Neuropaatilise valu mudelis: 60 C57/Bl6 liini hiirt; Indutseeritud diabeedikatses: 60 C57/Bl6 liini hiirt; Tiinusaegse stressi mudelis: et kindlustada vähemalt 20-30 järglast igasse katserühma [(kokku 4 katserühma, rühmasise vea minimeerimiseks igas 10-15 järglast, kahes korduses, järglaste vanus katsete alguses on 2 kuud, pooled emased, pooled isased) pooled järglased kasutatakse immunohistokeemiliseks analüüsiks ja pooled WB analüüsiks] on kavas kasutada 32 emast ja 16 isast Balb/C liini hiirt. Kui emasloomadel sünnib rohkem poegi ja need jäävad

ka ellu, siis üleliigsed järglased hukatakse anesteetikumi üleannusega. Kokku: 232 emast ja 186 isast Balb/C liini hiirt + poegadest lisandub 60 isast ja 60 emast looma; 120 isast C57/Bl6 liini hiirt

Rotid: Maternaalse separatsioonikatse: 20 emast ja 10 isast Wistar Hannover liini rott. Maternaalse separatsioonikatsesse on planeeritud 36 rotipoega (12 looma grupis).

4 Terapeutiliste cDNA vektorite (GTU) efektiivsuse uuring lammastes

Käesoleva loomkatseprojekti eesmärk on edasi arendada olemas olevaid ja efektiivseid GTU DNA vektoreid (*gene transport unit*), millega on võimalik lihas rakkudes efektiivselt ja pika-ajaliselt ekspresseerida erinevaid terapeutilisi molekule. Nendeks terapeutilisteks molekulideks võivad olla nii vaktsiinid, antikehad kui ka ravimid. Kokku plaanitakse testida GTU vektorit, mis eelkatsetes hiirtega on andnud pikaajalise püsiva ekspressiooni. Antud vektor lubab toota lihastes terapeutilisi antikehi, mis on humaanmeditsiinis suurem/võrdsed efektiivsete ravimi doosidega.

Kasu: Juhul kui katsed osutuvad edukaks, siis parandatakse oluliselt:

- Inimese ravivõimalusi, ekspresseerides nende lihastes haiguste vastaseid antikehi või DNA vaktsiine (ravi muutub odavamaks ja kättesaadavamaks).
- Tekib võimalus ka geeniteraapia läbiviimiseks, kasutades selleks kaasaegseid rekombinantseid tehnoloogiaid geenides ümberkorralduste tegemiseks.

Lisaks:

- Katseloomade arv on viidud miinimumini, see on valitud ja välja arvatud varasema kogemuse põhjal (katsed hiirtega). Grupi suurus on optimaalne tulemuste statistiliseks interpreteerimiseks.

Alternatiivid

Esmased uuringud hiires (*Mus Musculus*) on juba edukalt läbi viidud. Tulemus, hiires õnnestus pikaajaliselt ekspresseerida terapeutilistes kogustes antikehi. Et jõuda projektiga lähemale kliinilistele uuringutele, oleks vaja vektorsüsteemi testida suures loomas, kelle kehakaal oleks paremini võrreldav inimese kehakaaluga. Selleks sobib ideaalselt lammas. Alternatiivina kaaluseime kasutada ka sigu, kuid seoses Eestis leviva Aafrika Sigade Palavikuga (Aafrika seakatk) on sigade kättesaadavus halb ja nende kasutamine kliinikumis problemaatiline.

Kahju

Loomadele tekitatud kahju seisneb kuni 20 lamba kasutamises loomkatses. Loomadele tehtav lühiajaline nõrk valu ja stress seisneb valuvaigisti ja seadatiivsete ravimite manustamisest (intramuskulaarsed süstid), reielihasesse DNA vektorite elektroporeerimises ja veenist vere võtmises (kokku võetakse verd 12 korral, igal korral 1 ml verd). Katse iseloomust tulenevalt ja erinevate protseduuride kumulatiivsest koosmõjust hindame katset raskusastmega mõõdukas.

5 Th17 tsütokiinid kandidoosi vastases kaitses

Krooniline naha ja limaskestade kandidoos (KMK) on tõsine ja raskeid komplikatsioone põhjustav haigus. Selle raviks kasutatakse fungitsiidse toimega preparaate, mille suhtes *C. albicans* kujuneb resistentsus ning mis omavad patsiendile raskeid kõrvaltoimeid. Detailsete KMK tekkemehhanismide mõistmine on oluline kaasaegsete ravivõimaluste väljatöötamiseks. Üksikute rakkude ja mediaatorite osalemist *Candida* vastases kaitses on võimalik uurida ka rakukultuuris, kuid kõiki osalevate rakkude ja mediaatorite koostoimed ei ole võimalik rakukultuuri katsetega moduleerida. Me oleme näidanud, et antikehad, mis on suunatud *Candida* vastases kaitses oluliste tsütokiinide vastu, neutraliseerivad nende tsütokiinide toimet katseklassis. Oluline on nüüd uurida ka nende antikehade toimet elusorganismis, sest sellises situatsioonis võib neil olla mitmeid lisatoimeid, mida koekultuuris ei ole võimalik tuvastada. Ei ole ka välistatud võimalus, et hoolimata nende antikehade väga tugevast toimest katseklassis, on elusorganismis kompensatoorsed mehhanismid nii võimsad, et vastuvõtlikkus KMKle oluliselt ei tõusegi. Kõik katsed, mis on antud projekti raames võimalik teostada rakukultuuris, on kas juba tehtud või tegemisel. Käesoleva projekti raames katsetatakse ka uut KMK bioloogilise ravi võimalust hiirtel. See avab võimalused töötada sarnased ravimeetmed välja ka inimese jaoks. Uuring toob otsest kasu KMKd põdevatele patsientidele, sest varem või hiljem kujuneb neil välja resistentsus kandida vastastele preparaatidele, mis käesoleval ajal kasutada on. Krooniline ravile allumatu kandidoos on aga vähitekke riskifaktor. Uute bioloogiliste ravimitega on tulevikus seda rasket komplikatsiooni võimalik ennetada.

Stressi põhjustab katseloomadele üksikmajutus peale kandidaga infitseerimist. See on vältimatu, et hiirtel puuduks võimalus üksteisele nakkust üle kanda. Metsiktüüpi hiired on kandidoosile väga resistentsed. Nende puhul infektsiooni sümptomid kas puuduvad või on väga leebed ega põhjusta hiirtele kannatusi. Kontrollgrupi hiired, kes on kortisooliga immuunpuudulikuks muudetud, saavad tõsise infektsiooni. Neid jälgitakse katse käigus korduvalt päeva jooksul ning katse lõpetatakse kohe, kui hiirte kaal hakkab tugevasti langema või ilmnevad muud tõsised tervisehäired. Hiiri kasvatatakse ja hoitakse suletud tingimustes, kontrollitud valgustingimustel (12h valgustsükkel). Söödaks kasutatakse standardset labornäriilistele mõeldud sööta. Puurikeskkonna rikastamiseks kasutatakse pesamaterjali. Kõik loomadega kokkupuutuvad matejalid k.a. joogivesi (va sööt) autoklaavitakse. Vivaariumi töötajad jälgivad iga päev loomade arvu ja tervisliku seisundit. Katsegruppide arv ja katseloomade arv igas grupis on viidud miinimumini. Selleks on teostatud vajalikud statistilised kalkulatsioonid. Katseloomadele põhjustatavad kannatused on enamuses katsegruppides väga leebed, maksimaalselt mõõdukad, ning tehtud kahju on väiksem kui katseprojektist saadud kasu patsientide jaoks. Hiirte koguarvuks on planeeritud 132.

6 CPP & Tumor

Antud taotluse raames plaanitakse testida uudsete vähiravimite ravitoimet. Testainetena kasutatavad ravimid mõjutavad geeniekspressiooni ning on võimalik disainida ravim vastavalt konkreetsele vähkkasvajale selliselt, et mõjutatakse teatud geenide ekspressiooni ning pidurdatakse vähirakkude jagunemine. Seega on projekti kaugemaks eesmärgiks luua paremaid ravimeid inimesel esinevate haiguste raviks.

Uuritavad testained koosnevad mitmest erinevast alaiühikust ning iga alaiühiku ülesehitus on keeruline (tegemist ei ole väikeste ja lihtsa struktuuriga molekulidega), samuti on nende omavaheline kombineerimine komplitseeritud protsess. Seetõttu on tarvis enne inimestel raviefekti testimist uurida nende ainete käitumist imetaja organismis, hiires. Seda kahel põhjusel – peame kirjeldama, kuidas testained organismis liiguvad, kuidas neid lagundatakse ja väljutatakse ning kas nad omavad kahjulikke toimeid (normaalsetele kudedele). Teiseks on vaja mõõta nende kasvavastast toimet.

Loomade kasutamine aga sisaldab paratamatult katseloomadele valu põhjustamist. Antud projekti raames puutuvad katseloomadega kokku vaid selleks eraldi väljaõppe saanud spetsialistid ning valu ja kannatuste komponenti minimeeritakse kõigiti. Kõik loomades kasutusele tulevad testained on eelnevalt kirjeldatud ja optimeeritud laboris kasvatatud vähirakkudel ning loomades kasutatakse ainult selliseid testaineid, mis on olnud efektiivsed.

Et vähendada vajatavate katseloomade arvu, kasutame uudset ja efektiivsemat mõõtmisseadet – eluslooma jälgimisseadet, mis võimaldab testainete liikumist elusloomas jälgida ning seega saadakse väiksema loomade arvuga rohkem infot uuritavate testainete käitumise kohta.

Loomkatsetes planeeritakse kasutada 3 aasta jooksul kuni 528 hiirt.

7 Ketamiini toime uurimine wolframiini (Wfs1) geeni puudulikkusega hiirtel

Ketamiin on NMDA antagonistide hulka kuuluv anesteetikum, mis on viimasel ajal pälvinud rohkelt tähelepanu seoses kiire ning tõhusa depressiooniravimi omadustega. Depressiooni tekkerisk on suurenenud inimestel, kel on muteerunud wolframiini (Wfs1) geen ja samas on histoloogilistes uuringutes näidatud, et WFS1 valk on seotud Ca²⁺ rakusisese kontsentratsiooni regulatsiooniga. On oletatud, et ketamiin mõjutab otseselt raku Ca²⁺ pumba aktiivsust. Käesoleva projekti eesmärk on uurida ketamiini mõju Ca²⁺ pumba aktiivsusele kesknärvisüsteemis ja perifeerias. Kuna Wfs1 valk on seotud nii depressiooni kui ka Ca²⁺ kontsentratsiooni regulatsiooniga, siis on Wfs1 puudulikkusega hiired võrrelduna metsikut tüüpi ja Wfs1 heterosügootsete hiirtega sobivad katseobjektideks projekti eesmärgi saavutamiseks.

Kahju

Sundujumise test ei põhjusta loomadele valu (THE INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC) alusel), kuid indutseerib mõõdukat stressi, mida pole kahjuks võimalik vähendada, kuna siis jäävad püstitatud eesmärgid saavutamata. Liikumisaktiivsuse test ei põhjusta loomadele valu, kuid indutseerib lühiajalist leebet stressi, mida ei saa ka vähendada eelmisega samal põhjusel. Uuringutes kasutatavad annused on valitud avaldatud kirjanduse alusel, mis on omanud antidepressiivset toimet indutseerimata muid toimeid.

Kasu

Ketamiini toimemehhanismide selgitamine aitab kaasa uute tõhusate antidepressantide väljatöötamisele. Kuna Wfs1 puudulikkuse korral on ühelt poolt tuvastatud muutused depressiooniga seostatud mediaatorsüsteemide aktiivsuses ja teisalt näidatud muutunud Ca²⁺

homöostaasi, siis võimaldavad Wfs1 puudulikud hiired uurida ketamiini antidepressiivset mõju käitumisele ja spetsiifilisemalt Ca²⁺ pumba aktiivsusele.

3R

- Asendamine. Püstitatud eesmärgid pole võimalik saavutada loomkatsete asendamisega, kuna alternatiivsed meetodid ei võimalda reprodutseerida kõiki organismis asetleidvaid kompleksseid interaktsioone.
- Vähendamine. Katsegruppide loomade arv on viidud miinimumini, mis tagab planeeritava katse 95% võimsuse erinevuste (1,5- kordne hälve) tuvastamise u väärtusel 0.05 ja seega välistab võimaluse, et saadakse valepositiivne või valenegatiivne tulemus.
- Täiustamine. Katsete lõpus võetakse loomadelt erinevaid kudesid hilisemasteks molekulaarbioloogilisteks uuringuteks. Koeproovid säilitatakse ning vajadusel saab neid hiljem analüüsida ning saadud tulemusi korreleerida juba tehtud loomkatsetest saadud tulemustega.

Katseloomad- Kasutatavateks katseloomadeks on metsik-tüüpi, heterosügootsed ja homosügootsed Wfs1 puudulikkusega emased hiired. Hiirte koguarv on 216. Katsetes osalevaid geneetiliselt modifitseeritud loomi kasvatatakse ja hoitakse suletud tingimustel. Katsealused ei kujuta mitte mingit potentsiaalset ohtu keskkonnale ega inimeste tervisele.

8 Angiogenees Cd44 geeni *knockout* hiirtes

Antud projekti loomkatsete eesmärgiks on hinnata CD44 valggu rolli uute veresoonte moodustumisel. Selleks kasutatakse hiiri, kellel CD44 valggu on esitatud rakkudel kudedes loomulikus kontsentratsioonis (Cd44+/+), loomulikust väiksemas kontsentratsioonis (Cd44-/+) ja kellel see molekul sisse viidud geenimutatsiooni tõttu puudub (Cd44-/-). Varasemalt on teostatud prekliiniline angiogeneesi uuring, milles CD44 valggu põhinevat ravimikandidaati SB101 süstiti hiirtele juurde, kontrollides selle efektiivsust angiogeneesi alla surumisel. Endogene (rakkude enda poolt ekspresseeritava) CD44 valggu roll veresoonte rakkudel on uurimisel in vitro (koekultuuris ja katseklaasis), kuid ainult in vivo (loomudel) on võimalik uurida CD44 rolli uute veresoonte moodustumisel, mis lisaks veresoonte rakkudele hõlmab ka interaktsioone mitmete teiste rakutüüpidega ja rakuvälise maatriksiga. Cd44 geeni rolli testimine angiogeneesi loomudel on praegu kõige tugevam tõend füsioloogilisest funktsioonist või selle puudumisest

Eeldatav kasu.

Angiogeneesi uurimine Cd44 geeni knockout hiirtes võimaldab mõista CD44 rolli uute veresoonte moodustumisel. Uute veresoonte kasv on seotud selliste füsioloogiliste ja patoloogiliste protsessidega nagu haava paranemine, vähi areng ja vähi siirded. Lisaks angiogeneesi protsessi üldiselt paremale teaduslikule mõistmisele võimaldavad need katsed meil mõista ka CD44 valggu põhineva ravimikandidaati SB101 toimemehhanismi angiogeneesi alla surumisel.

Kasutades võimalusi loomkatsete asendamiseks ja vältimiseks, oleme näidanud, et CD44 reguleerib veresoonte rakkude jagunemisterinevates mudelites koekultuuris ning katseklaasis. Kuid selleks, et selgitada kas CD44 roll veresoonte rakkude jagunemisel koekultuuri tingimustes väljendub ka uute veresoonte tekkel füsioloogilistes tingimustes peab Cd44 geeni funktsiooni uurima ka tervikliku organismi kontekstis angiogeneesi mudelid. Me peame selgeks saama

missugune on Cd44 geeni deleteerimise mõju uute veresoonte tekkele – kas CD44 puudumine mõjub angiogeneesi pärssivalt või hoopis soodustavalt. Selleks on vaja viia läbi loomkatsed. Loodetava kasu tõenäosus on suur.

Eeldatav kahju loomadele. Katse käik.

Loomadele tekitatav kahju on seotud eelkõige kirurgilise implanteerimise protseduuriga. Implanteerimine viiakse läbi anesteeritud loomal. Hiire seljale tehakse 2 sümmeetrilist naha sisselõiget puusajoonest 1 cm ülespoole. Kummassegi nahaalusesse taskusse implanteeritakse 2 silikoonist angiokambrit. Tagaselja piirkonnas on hiirtel naha all suhteliselt palju ruumi ja maatriksi padjand ega paarikümne kuupmillimeetriline silikoon implantaat iseenesest ei põhjusta loomadele kestvatu valu ja ebamugavustunnet. Operatsioonijärgsel ärkamisel saavad hiired ka valuvaigistit. Tillukeste silikoonist angiokambrite implanteerimist teostatakse looma bakteriaalset nakkusohu vältivas laminaarse õhuvooluga bio-ohutuse kapis (aseptiline tehnika), implanteerimisel tehtav lõige nahka kasvab kinni mõne päeva jooksul ning katse lõppedes kahe nädala pärast ei ole palja silmaga tihtipeale võimalik tuvastada isegi armi. Katse lõpus, neljateistkümnendal päeval pärast angiokambrite implantatsiooni, hukatakse hiired CO₂ järkjärgulise inhalatsiooniga, veendutakse loomade surmas, mille järel eemaldatakse nahaalused angiokambrit ning protsessitakse veresoonte sissekasvu analüüsiks. Samuti võetakse vereproovid ja erinevate organite koeproovid.

Loomkatseprojekti vastavust loomkatse asendamise, vähendamise ja täiustamise nõudele.

Projekti meetodikate arendamisel teostatakse pidevat sarnase temaatikaga teadustööde monitooringut. Regulaarselt kasutatakse nt. PubMed otsingut valdkonna publikatsioonidega tutvumiseks (k.a. aastatel 2014-2015), tagades sealhulgas ka 3R printsiipide täitmist – asendades, vähendades ning parandades loomkatseid.

Veresoonte kasvu kuldseks standard mudeliks on Matrigeeli padjandi katse. Selles mudelis süstitakse hiirtele tagaselja piirkonda naha alla kasvajast pärit rakuvälist maatriksit millesse on lisatud padjandisse veresoonte sissekasvu stimuleerivad ühendid.

Loomkatse vähendamise ja täiustamise nõudest lähtudes planeerime oma katseseerias kasutada DIVAA mudelit (Directed *In Vivo* Angiogenesis Assay, Trevigen). DIVAA mudel on edasiarendus Matrigeeli mudelist ja tagab lihtsalt kvantiteeritavad ja korratavad tulemused. DIVAA mudeli üks põhilisi erinevusi klassikalisest matrigeeli mudelist on naha alla implanteeritava maatriksi 25 korda väiksem maht. Seda võimaldab pisikeste silikoonist torukeste ehk angiokambrite kasutamine. DIVAA meetodi puhul on katseloomade vajadus miinimum kaks korda väiksem võrreldes klassikalise nahaaluse Matrigeeli padjandi angiogeneesi mudeliga võimaldades meil seega säästa loomi.

Kasutatavate katseloomade arv ja liigid.

Loomkatsetes planeeritakse kasutada aasta jooksul kuni 96 hiirt.

9 Metaboolsed uuringud WFS1-puudulikel hiirtel

Loomkatseprojekti eesmärgiks on iseloomustada põhjalikumalt WFS1-puudulikku hiiremudelit, eelkõige ajas progresseeruvat neurodegeneratsiooni, biokeemilisi ja metaboolseid muutusi, mis on tingitud *Wfs1* geeni puudulikkusest.

Eesmärgid:

- *Wfs1* mutanhiirtel energiavahetuse ja metabolismi uurimine
- *Wfs1* puudulikkusega seotud neurodegeneratsiooni kirjeldamine
- *Wfs1* mutanhiirte geeniekspressiooni ja biokeemiline analüüs erinevatest kudedest
- mitokondrite ja lihaste uurimine seoses degeneratsiooniga ja metabolismi mõjutamisega

Projekti raames on plaanis kasutada viie aasta jooksul 1248 hiirt (kaks genotüüpi, kaks sugu), mis on vähim millega saab vastata katse küsimustele, sest tegemist on pikaajalise uuringuga. Katseloomade arv on viidud miinimumini, katserühmade suurused on valitud lähtudes katsetulemuste oodatavast hajuvusest, oletatava efekti suurusest ning statistilise analüüsi võimsusest. Võimalusel kasutatakse katseloomi korduvalt. Katse täiustamisel kasutame moodsaid seadmeid ja tehnoloogiaid, millega on võimalik hiiri jälgida võimalikult loomulikus käitumises, MRI-d teostatakse narkoosis ja uued kalorimeetrilised puurid on välistemperatuuri kontrollimisega, tagamaks loomadele maksimaalne heaolu.

Loomkatset ei saa asendada *in vitro* meetoditega, sest eesmärgiks on süsteem kui tervik, vananemisega seotud neurodegeneratsiooni ja metabolismi hindamine, mis on kompleksed protsessid, hõlmates kogu organismi süsteemide omavahelist regulatsiooni. Vananemist ja degeneratsiooni ei saa rakukultuurides süsteemselt uurida.

Projekti eeldatav kahju on katseloomadele nõrga ja/või mõõduka valu ja stressi põhjustamine. Lühiajalist ebamugavust põhjustab katselooma kinnihoidmine ja ravimite suukaudune manustamine või süstimine. Katseseadmed ja katsete läbiviimine ei põhjusta katseloomadele üldiselt ebamugavust. Stressi tekitab üksikmajutus kalorimeetrilistes puurides ning samuti jahedal temperatuuril hoidmine, kuid hiired on võimelised sellega kohanema.

Stressi vähendamiseks hoitakse loomi kontrollitud ja rahvusvaheliselt standardiseeritud tingimustes, muuhulgas välistades igasugu müra ja lõhnade võimaliku mõju stressi tekitamisel. Labori loomadega töötamisel ei kanta koduseid riideid, mille küljes on koduloomade lõhna, mis on võimalikuks stressiallikaks laborihiirtele. Kõik invasiivsed protseduurid teostatakse ühekordsete või steriliseeritud instrumentidega. Enne katse alustamist loomi harjutatakse kas katseseadmega või protseduuriga, vältimaks uuest olukorrast tekkinud stressireaktsiooni mõju katsetulemustele. Kindlasti ei asetata omavahel varem mitte kohtunud hiiri ühte puuri, vältimaks hiirte agressiivse käitumise avaldumist.

Antud katsed aitaksid paremini mõista *WFS1* geeni funktsiooni nii neurodegeneratsiooni kujunemisel kui ka metabolismi häirete tekkimisel. *WFS1* on suure tõenäosusega seotud peptiidsete hormoonide ja virgatsainete sekretsiooni või töötusega ning läbi selle biokeemiliselt oluline degeneratiivsete haiguste patogeneesis (eeskätt hormonaalsed häired, aga ka teatavad neurodegeneratsiooni vormid). Seega võimaldaks antud geeni täpsem uurimine selgitada degeneratiivsete haiguste tekkemehhanisme ja võib-olla pakuks ka ravivariante.

Loomkatseprojekt vastab asendamise, vähendamise ja täiustamise nõudele, mille tagavad loomade heaolu eest hoolitsemine ja võimalusel korduvkasutus (metabolismi ja neurodegeneratsiooni katsed). Lisaks eraldatakse igast loomast võimalikult palju materjali edasisteks uuringuteks. Katseloomade arv on täpselt planeeritud ning viidud miinimumi, mis on vajalik uurimisküsimuste lahendamiseks. Kõik katsed protokollitakse.

10 Psühhoosi mudeldamine amfetamiini manustamisel – mõju Egf ja IgLON perekonna ekspressioonile

Skisofreenia on raske kuluga psüühiline häire, mis mõjutab vaatamata geograafilisele asukohale ühte protsenti kogu maailma elanikkonnast. Skisofreeniale on omane ebanormaalne sotsiaalne käitumine ja reaalsusest vöörandumine. Skisofreeniale eelneb psühhoosilaadne seisund, mis algab tavaliselt alates esimesest psühhootilist episoodist. Psühhoosi korral kaotab inimene esmakordselt kontakti reaalsusega. Psühhoosilaadsed sümptomid esinevad ka teiste psüühiliste häirete korral.

Meie uuring keskendub psühhoosi modelleerimisele, mille käigus tuvastame varajasi skisofreenia markereid. Katse käigus uurime kasvufaktorite ja kindlate geeniperekondade ekspressiooni mõju haiguse kulule mudelorganismis. Vaatluse all on nii *Egf* kui ka *IgLON* perekonna geenid. Eelnevalt on näidatud EGF üleekspressioonist tingitud psühhoosilaadse seisundi kujunemist hiire mudelis. Samuti on inimesel leitud seos *NRG* geeni (*EGF* perekonna alamjaotus *NRG* perekond) ja skisofreenia esinemissageduse vahel. *NRG* geeni poolt kodeeritav glükoproteiin seondub muuhulgas EGF retseptorile. *Post mortem* skisofreeniahaigete aju uuringud on tuvastanud EGF valgu taseme languse prefrontaalkoores ja juttkehas. Meie eelnevalt avaldatud andmete põhjal esineb esmaspsühhoosi korral veres märkimisväärne EGF valgu taseme tõus, mis normaliseerub antipsühhootilise ravi tulemusel. *IgLON* perekonna (*OPCML*, *NTM*, *LSAMP*, *NEGR1*, *IGLON5*) korral on tuvastatud skisofreeniahaigetel *LSAMP* valgu 20% üleekspressioon frontaalkoores. Käesolev katse on esimene kord, kui uurime, kuidas on need kaks geeniperekonda seotud ja millised on üksikute geenide ekspressiooni mõju erinevate psüühiliste häirete korral.

Lisaks:

- Katseloomade arv on valitud tagamaks statistiline võimsus
- Antud loomkatse läbiviimise asendamiseks puuduvad alternatiivsed meetodid ja mudelid
- Antud uuringust saab uusi baastadmisi, mis laiendavad üldist arusaama psühhoosist ja aitavad kaasa uute ravimite väljatöötamisele

Kasu: EGF ekspressiooni on varem seostatud vähi progressiooni ja esinemisega. Varju on jäänud aga EGF-i roll erinevate vaimsete häirete kujunemisel. Uuem kirjandus seostab EGF-i üha enam ka vaimsete häiretega. Antud katse laiendab meie teadmisi psüühiliste häirete tekkemehhanismide kohta.

Kahju: Loomadele tekitatud kahju seisneb 144 hiire kasutamises teadusuuringus, kellele põhjustatakse mõõdukaid kannatusi, see seisneb korduvates intraperitonaalsetes süstides ja amfetamiini manustamisega kaasnevas psühhoosilaadses seisundis. Selline protseduur ei põhjusta katseloomadele pikaajalisi kannatusi. Antud ebameeldivusi ei ole võimalik katse õnnestumise eesmärkidel kuidagi vältida.

11 Maksakahjustuse regeneratsiooni mehhanismid parenhüümi ja sapiteede samaaegsel kahjustusel

Taust: Maksahaigused, nende hulgas ka maksakasvajad on tänu arenenud maades viljeldavale moodsale elustiilile, tasakaalustamata toitumisele ning elanikkonna kasvavale eksponeerumisele keskkonna- ja olmemürkidele kasvav trend. Kahjuks on maksahaiguste ravi

efektiivsus madal, mis tingib neid põdevate patsientide varase väljalülitumise töajaluse elanikkonna hulgast, põhjustades suurt koormust haigekassa süsteemile.

Kuna maksakude on organismi üks kõige paremini taastuvaid kudesid, siis on senini pööratud vähe tähelepanu maksa tüvirakkude regulatsiooni uurimisele. Käesolevaks ajaks aga on selgeks saanud, et nii maksa degeneratiivsed haigused (maksa lipodüstroofia, mittelipoidne maksadüstroofia ning maksatsirroos) kui ka maksakasvajate teke, on vahetult seotud maksa tüvirakkude regulatsiooni häirega.

Käesolev projekt on suunatud maksa regeneratsiooni mehhanismide paremaks tundmaõppimiseks. Maksa tüvirakkude märkimiseks ja jälgimiseks kasutame geneetiliselt muudetud hiiri. Tüvirakkude täpse rolli kindlakstegemiseks, tekitame me erinevaid maksakahjustusi, mis mimikeerivad inimestel esinevaid haigusi ning jälgime maksa tüvirakkude käitumist kahjustuse korral. Antud projekti raames kasutatakse CDE-dieedi poolt

põhjustatud maksa parenhüümirakkude ja sapiteede rakkude kahjustust. Eraldades märgitud rakud maksast, uurime ka neid reguleerivate signaaliradade muutusi erinevate stressiolukordadega toimetulemisel.

Selle projekti tulemusel avardame oma teadmisi maksa regeneratsioonist üldiselt ning täpsemalt neid juhtivates signaaliradades maksa tüvirakkudes. See annab meile võimaluse edaspidi sekkuda nende signaaliradade regulatsiooni ning eeldatavasti võidelda nii tüvirakkude alanenud regeneratsioonivõimega maksa degeneratiivsete haiguste ravis kui ka kontrolli alt väljunud jagunemisega maksakasvaja tekkel.

Kuna kasutatavatel geneetiliselt muundatud hiirtel ei esine mingeid kõrvalekaldeid normaalsest funktsioonist, kaasa arvatud reproduktiivne funktsioon, siis projekti tekitatav negatiivne efekt on seotud maksa kahjustuse tekitamisega. CDE dieet meie kasutatavates doosides hiirtel tekitab eeldatavasti kergeid kuni keskmisi vaevusi kuid võimalik on tüsistuste

tõttu kannatuste teke. Kui vastavad märgid ilmnevad (katseloomade sundasend, ebaloomulik loidus, kaalulangus) siis katseloomad hukatakse viivitamatult.

Katseloomi ei kasutata korduvalt. Keerulisemate katsete läbiviimiseks kombineeritakse erinevaid protseduure, aga mitte kunagi kahte keskmist või rasket valu põhjustavat protseduuri.

Kuna projekti elluviimine eeldab geneetiliselt muundatud imetajaliigi kasutamist, siis sisuliselt ainsaks võimalikuks variandiks on hiir. Hiire ehitusplaan on üldiselt sarnane kõigile imetajatele kaasa arvatud inimene, ning hiire maks on sarnase struktuuri ja rakulise koostisega kui inimese maks. Antud hiirekoloonia pidamisel täidetakse kõiki seadusega ettenähtud elukeskkonna rikastamise reegleid. Hiiri käsitlevad vastava hariduse saanud ning suure kogemusega töötajad. Hiirtega teostatavate eksperimentide juures jälgitakse rangelt valutustamise reegleid, ühtegi

kannatusi põhjustavat protseduuri ei teostata hiire teadvusel olles ning eksperimentide käigus jälgitakse pidevalt hiirte tervislikku seisundit. Kannatuse märkide esinemisel või ka astsiidi tekkel katse lõpetatakse kohe. Meie katsete eesmärk ei ole tekitada ülemäärast maksakahjustust, mida ka inimestel esineb suhteliselt harva, vaid modelleerida mõõdukat maksakahjustust ning sellele järgnevat regeneratsiooni. Vastavad andmed inimeste haiguste kohta kinnitavad, et sellised haiguslikud seisundid ei põhjusta erilisi subjektiivseid vaevusi enne kui haigus on progresseerunud viimase staadiumini ning on tekkinud maksapuudulikkus. Katseid planeeritakse lähtudes minimaalselt vajalikust katseloomade arvust (3 hiirt katsepunkti kohta). Kokku kasutatakse antud katsetes 96 hiirt. Katsetes osalevaid hiiri jälgitakse igapäevaselt. Kannatuse märkide ilmumisel (iseloosulikkus, kaalulangus) lõpetatakse katse kohe. Mitte ühtegi katses osalevat looma ei kasutata kahes eksperimendis, kuna selleks puudub igasugune vajadus. Juhul kui katseloomadele põhjustatakse keskmist või tugevat valu/stressi kasutatakse eeldatava valu kestuse ajal valuvaigistite manustamist.

12 Uudsete kation-amfifiilsete ühendite farmakokineetika uurimine in vivo kuvamismeetodil, eesmärgiga arendada uusi ravimikandjaid inimestele. (koostööprojekt Läti Orgaanilise sünteesi instituudi ja Tartu Ülikooli vahel)

Suur hulk terapeutiliselt aktiivseid molekule on vees halvasti lahustuvad. Viimane võib piirata nende kasutamist ravimitena. Meie eesmärgiks on iseloomustada uudsete kation-amfifiilsete ühendite farmakokineetikat hiirtes, et leida uusi potentsiaalseid ravimikandjaid terapeutiliselt aktiivsete molekulide jaotumise ja tõhususe parandamiseks inimestes.

Amfifiilid on molekulid, mille eripäraks on see, et nad on mõlemat liiki, nii hüdrofiilsed kui hüdrofoobsed. Nad sarnanevad rakumembraanidele, mis koosnevad peamiselt fosfolipiididest. Kation-amfifiilide arendus on hetkel väga aktiivne teadusvaldkond. Teadustöögrupid uurivad neid kui potentsiaalseid RNA/DNA või ravimite toimekohta kandjaid. Neid kandjaid võib muuta sihtmärgi spetsiifiliseks vastavalt nende koostise modifitseerimisele (nt valkude lisamisega, mis spetsiifiliselt tunneb ära antigeene). Lisaks võivad need kandjad olla ise bioloogiliselt aktiivsed (nt antioksüdatiivne või bakteritsiidsed). Käesolevas uurimustöös plaanime kasutada uusi kation-amfifiile, mida pole varasemalt iseloomustatud *in vivo* ja mis on arendatud meie kolleegide Läti orgaanilise sünteesi instituudist poolt. Uuritavad molekulid on fluorestseeruvad, mis tähenda, et neid ergastades (nt valgustamisega) nad kiirgavad valgust. Praeguses arenguetapis me uurime nende ühendite funktsionaalsust *in vivo* - kas fluorestsentsi on võimalik jälgida aine jaotumisel süstekohast ja selgitada nende ohutust. Käesolevas töös meie ei uurinud nende efektiivsust kandjatena. See on tulevaste katsete eesmärk.

Täiskasvanud hiirtele manustatakse uuritavaid ühendeid erinevatel viisidel, et jäljendada kliinilisi kasutamisi. Seejärel jälgitakse fluorestsentsi muutusi ajas huvipakkuvas kehapiirkonnas. Kõik manustamisviisid klassifitseeruvad raskusastmesse leebe (ei halvenda märkimisväärselt katselooma heaolu või üldist seisundit Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL). Amfifiilsed ühendid on fluorestseeruvad, mis võimaldab nende jaotumist jälgida *in vivo* kuvamisel.

Potentsiaalsed puudused

Uuringu käigus võib ilmneda, et ühenditel on kõrvalmõjud. Siiski tuleb rõhutada, et senised uuringud *in vitro* on näidanud, et ühendid on mittetoksilised. Samuti rakendatakse ühendite manustamisel järk-järgulist katsedisaini, mis võimaldab modifitseerida protokollid või katse lõpetada, kui see osutub vajalikuks.

Potentsiaalsete amfiifilsete ravimikandjate farmakokineetika uurimiseks loomkatsetele alternatiivi pole. Ühendi jaotumist ja eritumist on võimalik hinnata ainult terve organismi kontekstis ning seetõttu pole uuringuid võimalik läbi viia *in vitro*. Kõrgemaid loomi katses ei kasutata, kuna uuringu teostamine hiirtega võimaldab vastata püstitatud uurimusküsimustele.

Põhinedes sarnaste ühendite kohta publitseeritud infode, pole oodata uuritavate ühendite toksilisust hiirtes. Lühiajaliste ja kuni 100-päevaste uuringute jooksul ei ilmnenu sarnaste ühendite korral toksilisust.

Katseloomade arv: 288 hiirt

Käesolev projekt võtab arvesse 3R:

Asendamine: Meie koostööpartnerid on teostanud põhjalikud katsed *in vitro*, et iseloomustada fluorestsents katioon-amfiifile. Eedasises arendusetapis pole võimalik loomkatseid asendada, kuna eesmärgiks on karakteriseerida ühendite farmakokineetilisi omadusi. Viimast on võimalik läbi viia vaid organismi kui terviku tasemel. Siiski ei kasutata uuringus kõrgemaid loomi, kuna hiirte abil on võimalik leida vastused püstitatud uurimusküsimustele.

Vähendamine: Projektis on kavandatud kasutada väikseim arv isendeid, mis siiski tagab statistilise usaldusväärsuse. Fluorestsentskuvamismeetod, mida uuringus kasutatakse, on kõrge tundlikkusega. Varieeruvuse vähendamiseks kasutatakse vaid isaseid hiiri. Grupi suuruse minimeerimiseks manustatakse kontrollrühmale kontroll-lahust jaotatud viisil.

Täiendamine: Kõikide gruppide süstimisel ja kuvamisel kasutatakse järk-järgulist katsekorraldust, et esiteks jälgida madalate dooside mõju katseloomadele eelnevalt kõrgete dooside manustamist. See võimaldab teha muudatusi protokollis, kuigi tõsiseid kõrvalmõjusid katseloomade tervisele pole oodata. Korduv *in vivo* kuvamine suurendab sadavate teabe mahtu iga hiire kohta, vähendades katseloomade arvu. Lähtuvalt katse iseloomust preanesteesia ja toidule ligipääsupiirangut ei rakendata. Kõik läbiviidavad katseprotokollid on standardiseeritud hiirte peal kasutamiseks. Eksperimentaatorid omavad laialdast kogemust katseloomadega töötamises ning menetletavate tehnikate läbiviimises.

13 Endogeensete fluorofooride uurimine hiirte ja rottide ajus

Katsetes määratakse *in vivo* endogeensete fluorofooride fluorestsents kontroll loomades ja neurodegeneratiivse haiguse mudelites. On erinevaid endogeenseid fluorofoore (valk, mis emiteerib valgust kui teda ergastada teatud lainepikkusel) nagu flavoproteiinid, protoporfüriin, elastiin, kollageen ja lipofuskiinid. Mitmeid neid on varasemalt uuritud vähimudelites. Käesolevas töös soovime nimetatud endogeenseid fluorofoore kasutada neurodegeneratiivsete haigusmudelite analüüsimiseks. Kasutatav meetod on madala stressitasemega ja

mitteinvasiivne. Meile teadaolevalt pole varasemalt sarnaseid uuringuid hiirtes ega rottides teostatud. Katsed on vajalikud, et arendada mitteinvasiivseid meetodeid

neurodegeneratiivsete haiguste progressiooni hindamiseks ja uurimiseks.

Käesolev projekt võtab arvesse 3R:

Asendamine: Oluline on rõhutada, et kõrgemaid loomi ei kasutata, kuna hiirte ja rottide abil on võimalik vastata püstitatud uurimusküsimustele, mis põhinevad varasematel põhjalikel in vitro uuringutel.

Vähendamine: Võttes arvesse tulemuste varieeruvust ja et koguda vajalik hulk andmeid, kasutatakse miinimum arv loomi. Igat looma kuvatakse kahel korral, et koguda võimalikult palju infot.

Täiendamine: Analüüsimeetodid on kõrge tundlikkusega. Premedikatsioon enne anesteesia induktsiooni pole vajalik ja loomade ligipääsu toidule ei piirata. Kasutatav protokoll on kiire, madala stressitasemega ja mitteinvasiivne.

Potentsiaalsed puudused:

In vivo eksperimendid on vajalikud, kuna uuritakse keerukaid patoloogiaid. Hukkamine võib potentsiaalselt olla katseloomale valulik, kuid uuringu teostajad on kogenenud ja omavad väga häid tehnilisi oskusi. Samuti anesteseeritakse loomad enne kuvamisprotseduuri.

Katseloomade arv

Uuringus kasutatakse 80 rottit ja 320 hiirt, et uurida fluorestsentsi nii kontroll-loomades kui haigusmodelites.

14 Ümarmudila (*Neogobius melanostomus*) kodupiirkonna suuruse hindamine

Loomkatse selgitamiseks ümarmudila kodupiirkonna suurust Eesti rannikumeres

Liik: Ümarmudil (*Neogobius melanostomus*)

Count: 48 isendit (36 põhikatseks ja 12 varuks)

Tegemist on minimaalse võimaliku arvu isenditega, millega on võimalik katsest saada ökoloogiliselt ja statistiliselt usaldusväärseid tulemusi. Loomade arv on minimaliseeritud akustilist signaali eritavate märgiste kasutamisega (isend positioneeritakse iga kord 90s jooksul), millega saab ühe isendi kohta palju infot. Erinevalt klassikalistest märgistest, mille puhul seoses madala taaspüügi tõenäosusega peaks märgistama vähemalt 5000 isendit, kes kõik võivad tunda stressi vesikeskkonnast eemaldamise ajaks. Antud katse puhul ei ole võimalik asendada loomade kasutamist, sest uuritakse looma enda käitumist tema looduslikus elukeskkonnas. Loomade laboris viibimise ajaks luuakse võimalikult loodusliku keskkonnaga sarnased tingimused (merevesi ja toiduobjektid samast keskkonnast), mis vähendab loomadele põhjustatud stressi ja parandab katse tulemusi.

Kahju ja kasu katseloomale:

Antud katse käigus võib ümarmudil kui katseloom kogeda tõenäoliselt lühiajalist mõõdukat valu, kannatusi või stressi, mis on tingitud kiibi sisestamisest kõhuõõnde. Valu on minimaliseeritud anesteetikumi manustamisega enne kiibi sisestamist ja valuvaigisti manustamisega peale kiibi sisestamist. Kogu katseperioodi jooksul tagatakse katseisenditele võimalikult looduslähedane elukeskkond ning -kvaliteet, et minimeerida katseloomadele põhjustatavat stressi.

Kahju ja kasu:

Antud katse peamine eesmärk on saada teaduslikku informatsiooni võõrliigi käitumise kohta Eesti rannikuvetes. Kuna tegemist on võõrliigiga, siis käesoleva katse tulemused võimaldavad anda selgeid soovitusi rannikumere kaitsmiseks selle ja sarnaste invasiivsete liikide eest. Ümarmudil on üks vähestest bentilise eluviisiga kaladest, kes toitub merepõhja pinnal elavast põhjaloomastikust. Antud liigi arvukus on kiires kasvufaasis ja liigi potentsiaalne negatiivne mõju merekeskkonnale on suur. Ümarmudila kodupiirkonna suuruse teadmine võimaldab adekvaatsemalt hinnata võõrliigi mõju ulatust antud piirkonnas, aga ka mujal.

15 Polükloonsete antikehade arendamine kodukanades

Kodukanu kasutatakse polükloonaalsete antikehade valmistamiseks juba aastakümneid. Polükloonaalsete antikehade valmistamiseks on võimalik kasutada erinevaid katseloomi alates küülikutest, kitsedest ning lõpetades eksootilisemate loomadega nagu laamad, kaamelid, karpkalad jne. Kodukanade kasutamise eeliseks on lühike immuniseerimisperiood, samuti saadud antikeha suhteliselt suur hulk võrreldes nt. Küüliku vereseerumist puhastatud antikehaga. Väga oluline on ka see, et antikeha puhastamiseks ei pea kasutama katselooma vereseerumit vaid seda puhastatakse kanamunadest. Saadud antikehad on teistsuguste omadustega võrreldes imetajarakkudes toodetud antikehadega. Kuna kana kehatemperatuur on vahemikus 42-43°C, siis seetõttu on saadud antikehad oluliselt termostabiilsemad. Samuti on kana IgY antikehad stabiilsemad ühe lisadisulfiidsideme tõttu antikeha raske ahela konstantses piirkonnas.

Antikehi arendatakse vastavalt biotehnoloogia- ning farmaatsiafirmade ning akadeemiliste asutuste tellimustele.

Lõppeesmärgid ja eeldatav kasu:

Polükloonsete antikehade kasutamine on uurimistööks vajalik erinevates valdkondades sealhulgas biomeditsiinilised uuringud, samuti alus-, rakendusuuringud uute ravimikandidaatide väljatöötamisel.

Katseloomale tekitatav kahju:

Ühe antigeeniga immuniseeritakse kaht kuni kolme kodukana. Katseloomale tekitatud otsene kahju piirdub antigeeni süstimisega, millega tekitatakse loomale võimalikult vähe ebamugavusi ja stressi. Edasine katse piirdub looma loomuliku eluprotsessiga. Katse käigus kogutakse munetud munad ning polükloonaalsed antikehad eraldatakse munarebust.

Monokloonaalsete antikehade arendamine katselooma põrnarakkudest toimub alles peale katse lõppu kui katseloom on hukatud. Katse iseloomust tulenevalt ja erinevate protseduuride kumulatiivsest koosmõjust hindame katset raskusastmega mõõdukas.

Soovitavad tulemused:

Kõrge antigeeni äratundva afiinsusega spetsiifilised IgY tüüpi antikehad, põrnarakud rekombinantsete monoklonaalsete antikehade arendamiseks.

Katseloomade arv ja liik

Loomkatse perioodi jooksul kasutame kokku 75 kodukana.

16 Neurodegeneratiivsete haiguste hiiremodelite neuronaalne kuvamine

Wolframi sündroom (WS) on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, millega kaasnevad nägemisnärv atroofia, suhkruhaigust, kuulmiskadu koos magediabeedi, neuroloogiliste häiretega, tasakaaluhäiretega ja neerude düsfunktsiooniga. WS põhjuseks peetakse endoplasmaatilise retiikulumi valgu wolframiini (Wfs1) funktsiooni häired. Mitmeid mutatsioone WFS1 geenis seostatakse WS-iga. Kuigi ühe geenikoopia puudumine ei põhjusta WS, seostatakse heterogeensust teatud neuroloogiliste häiretega. Hetkel WS etioloogiline ravi puudub ja 60% patsientidest surevad 35-aastaselt.

Park2 (parkin) ja Pink1 on seotud autofaagia ühe alatüübi mitofaagiaga. Tegemist on rakusisese protsessiga, mille käigus elimineeritakse kahjustunud mitokondrid. Mutatsioonid Park2 ja Pink1 geenides põhjustavad autosomaalset retsessiivset Parkinsoni tõve. Arvatakse, et just mitofaagia häirumine võib kombineerida Parkinsoni tõve patofüsioloogiasse. Ka Parkinsoni tõve ravi põhineb sümptomite leevendamisel ning haiguse kulgu hetkel peatada ei suudeta.

Kuvamist on varasemalt edukalt kasutatud inimestel, kes põevad WS või PT. Meie töös kasutavad hiiremodelid on leebe fenotüübiga, eriti just Pink1 ja Park2 mudelid. Tundliku kuvamise meetodi rakendamine võib paljastada degeneratiivseid muutusi ajus, mis rakendatavad hilisemates ravimite uuringutes. Kõik võimalik on tehtud, et vähendada kasutatavate loomade arvu.

Katseloomade arv põhineb varasematel publitseeritud töödel ja kogemustel. Lisaks arvestame oma töös 3R-ga (Rs (http://www.3rs-reduction.co.uk/html/main_menu.html)). Humaanne lõpp-punkt ja teised kontrollimehhanismid on kohandatud, et vältida ebavajalikku katseloomade kannatusi.

Loomkatses kasutatakse kokku 90 hiirt.

Oodatav kasu: PD ja WS patsientidel ilmnevad väga varakult muutused tagaaju mahtudes ja struktuuris. Loomkatsete käigus plaanime uurida hiirte tagaaju in vivo, kasutades lühikesi ja eetilistelt vastuvõetavaid skaneerimise aegasid. Lühem skaneerimisaeg on vähem detailsem, kuid oluline kuna näitab kas in vivo MRI skaneerimist on võimalik kasutada tulevastest ravimiuuringutes.

Katse oodatavate tulemuste saavutamise tõenäosus: Käesoleval hetkel me ei oska ennustada, kas katsed töötavad. Siiski, arvesse võttes teavet, mis pärineb inimuuringutest, on suur tõenäosus, et leiame erinevusi mudel- ja kontrollhiirte vahel, kasutades väga tundlikke visualiseerimismeetodeid.

Negatiivne mõju uuringugrupile (hiirtele): EU direktiivi 2010/63/EU, lisa VIII, osa III, 1 (c) ütleb, et loomade mitteinvasiivne kuvamine (nt MRT) asjakohase sedatatsiooni või anesteesiaga on LEEBE katse. Seega katsemõju loomadele on LEEBE, madalaim kategooria.

17 Neurodegeneratiivsete haiguste hiirmudelite käitumise uurimine

Meie uurimustöö eesmärgiks on uurida neurodegeneratiivsete haiguste Wolframi sündroomi (WS) ja Parkinsoni tõve (PT) hiiremudeleid, et leida haiguse leebid markereid. Wolframi sündroom on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, millega kaasnevad nägemisnärv atroofia, suhkruhaiguse, kuulmiskadu koos magediabeedi, neuroloogiliste häiretega, tasakaaluhäiretega ja neerude düsfunktsiooniga. WS põhjuseks peetakse endoplasmaatilise retiikulumis lokaliseeruva valgu wolframiini (Wfs1) funktsiooni häired. Mitmeid mutatsioone WFS1 geenis seostatakse WS-iga. Kuigi ühe geenikoopia puudumine ei põhjusta WS, seostatakse heterogeensust teatud neuroloogiliste häiretega. Hetkel WS etioloogiline ravi puudub ja 60% patsientidest surevad 35-aastaselt.

Park2 (parkin) ja Pink1 on seotud autofaagia ühe alatüübi mitofaagiaga. Tegemist on rakusisesel protsessiga, mille käigus elimineeritakse kahjustunud mitokondrid. Mutatsioonid Park2 ja Pink1 geenides põhjustavad autosomaalset retsessiivset Parkinsoni tõve. Arvatakse, et just mitofaagia häirimine võib kontribueerida Parkinsoni tõve patofüsioloogiasse. Ka Parkinsoni tõve ravi põhineb sümptomite leevendamisel ning haiguse kulgu hetkel peatada ei suudeta.

Oma uurimustöös kasutame leebe haiguse fenotüübiga, eriti just Pink1 ja Park2, hiirmudeleid. Käesolevas uurimustöös rakendame tundlike käitumiskatseid, mis annavad uut teavet haiguste varajaste sümptomite ja neuronaalsete ühenduste funktsionaalsuse muutuste kohta hiirtes. Varasemad uuringud on peamiselt keskendunud haiguse tüüpilisematele ja tugevamini väljendunud sümptomitele. Näiteks tuntakse PT kui haigust, millega kaasnevad häired mootorikas. Samas on haigetele mootorsete häirete kõrval tõsiseks probleemiks ka mittemotoorsed. Meie eesmärgiks on koguda teavet nimetatud haiguste sümptomite kohta terviklikult ja jälgida haiguse progressiooni hiirtes, et tulevikus rakendada neid teadmisi uute paremate ravimite arenduses.

Uuringus kasutatakse erivanuses hiiri, et avastada juba varaseid muutusi. Vanemad loomad on vajalikud haiguse progressiooni jälgimiseks ja tõestuseks, et loomadel kujunevad välja haigusele iseloomulikud sümptomid. Katseloomade arv on viidud miinimumini, kuid käitumiskatsed ja patoloogiate analüüsid eeldavad teatud grupi suurust, et tagada piisav testi võimsus. Samuti oleme grupisuuruse arvutamisel arvesse võtnud eelnevaid põhjalikke kogemusi neurodegeneratiivsete hiirmudelitega. Lisaks arvestame oma töös 3R-ga (Rs (http://www.3rs-reduction.co.uk/html/main_menu.html)). Humaanne lõpp-punkt ja teised kontrollimehhanismid on kohandatud, et vältida ebavajalikku katseloomade kannatust.

Loomkatses kasutatakse kokku 180 hiirt.

Oodatav kasu: PD ja WS patsientidel ilmnevad väga varakult muutused koordinatsioonis, lõhnatajus ja kõnnakus. Käesolevas loomkatsete käigus plaanime uurida neid funktsioone hiirtes

in vivo, kasutades lühikesi ja eetilisele kohaseid teste. Nimetatud testid annavad olulist teavet meie mudeli kohta, mis on vajalik hilisemateks terapeutikumide arenduseks.

Katse oodatavate tulemuste saavutamise tõenäosus: Käesoleval hetkel me ei oska ennustada, kas katsed töötavad. Siiski, arvesse võttes teavet, mis pärineb inimuuringutest, on suur tõenäosus, et leiame erinevusi mudel- ja kontrollhiirte vahel. Lisaks kasutame loomkatsete läbi viimisel väga tundlikke, hästi kirjeldatud ja tõestatud efektiivsusega käitumiskatseid.

Negatiivne mõju uuringugrupile (hiirtele): Võttes aluseks EU direktiivi 2010/63/EU, lisa VIII, osa III, meie varasemaid kogemused ja publitseeritud tööd, klassifitseerub käesolev loomkatse raskusastmesse leebe.

18 Pilootkatse. Hiire VEGF monoklonaalse antikeha ekspressioon lihastes - võimalik kasvajavastane ravi Ewing sarkoomi vastu (A673) fox1 nu/nu hiiremudelil

Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus	Pilootkatse. EWING sarkoomi vastaste antikehade ekspressioon skeletilihastes - võimalik kasvajavastane ravi	
Loomkatseprojekti kestus	60-70 päeva	
Loomkatseprojekti iseloomustavad märksõnad (maksimaalselt 5)	Kasvajate indutseerimine, kasvajavastane ravi, DNA transfektsioon	
Loomkatseprojekti läbiviimise eesmärk loomakaitseseaduse § 35 kohaselt	Alusuuring	Ei
	Rakendusuuring	Jah
	Õiguslike nõuete täitmisega seotud kasutus ja tavapärase tootmine (s.o loomakaitseseaduse § 35 punktides 2–4 nimetatud eesmärgil ravimite, toidu ning muude ainete ja toodete arendamine ja tootmine ning nende kvaliteedi, tõhususe ja ohutuse kontroll)	Ei
	Loodusliku keskkonna kaitsmine inimese või looma heaolu või tervise huvides	Ei
	Uuring, mille eesmärk on loomaliigi säilitamine	Ei
	Kõrghariduse või kutsehariduse omandamine või täienduskoolitus	Ei
	Kohtuekspertiisi uuring	Ei
	Loomakaitseseaduse §-s 35 loetletud lubatud eesmärgil selliste väljakujunenud liini geneetiliselt muundatud loomade kolooniate säilitamine, keda ei kasutata muudes katsetes	Ei

Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus	Pilootkatse. EWING sarkoomi vastaste antikehade ekspressioon skeletilihastes - võimalik kasvavastane ravi
Kirjeldage loomkatseprojektiga saavutada soovitavaid tulemusi (nt teadusalaste probleemide lahendamine)	Vähiravimid on kallid, mis raskendab oluliselt vajaliku ravimi kättesaadavust paljudele patsientidele. Eesmärk on uurida, kas vähi vastaste antikehade terapeutilist efekti on võimalik saavutada tootes ravimit vähi all kannatava organismi enda lihasrakkude poolt (geeiteraapia). Selleks transfekteeritakse hiirte lihastesse, kes kannavad inim päritolu vähki, DNA ekspressioonivektorid, mis toodavad ja sekreteerivad verre juba kirjeldatud Ewing sarcoma vastast antikeha. Tulemuseks võib olla uus ravistrateegia, kus vähi ravimi süstimise asemel pannakse patsiendi organism ise tootma vähivastaseid terapeudikume. Kauges perspektiivis võib antud meetodika leida kasutust ka humaanmeditsiinis, muutes vähivastase ravi kordades odavamaks ja sellega seoses ka kättesaadavamaks.
Milline on selle loomkatseprojekti võimalik kasu (kuidas see edendab teadust või kuidas inimesed või loomad loomkatseprojektist kasu saavad)?	Kasuna võivad tekkida uued ja majanduslikult soodsamad strateegiad vähi raviks nii veterinaar – kui ka humaanmeditsiinis
Milliseid loomaliike ja kui palju loomi (ligikaudu) kavatakse kasutada?	Katseks kasutatakse immuunpuudulikke hiiri. Katseloomade arv 90 isendit.
Millised on katseloomadel rakendatavad menetlused ja nende eeldatav kahju loomadele? Milline on loomkatse tõenäoline/eeldatav raskusaste ja katseloomade saatus pärast loomkatseprojekti lõppu?	Osadele katseloomadele elektroporeeritakse jalgadesse üldanesteesias (sh eelnevalt on loomale süstitud valuvaigistit) DNA vektoreid. Seejärel tekitatakse loomadele subkutaansed (nahaalused) tuumorid (A673). Loomadelt kogutakse iga nädal sabaveenist vereproove (5 mikrolitrit) ning osadele loomadele süstitakse 2 korda nädalas juba varem kirjeldatud vähivastast monoklonaalset antikeha (positiivne kontroll grupp) või negatiivse kontrollina „moc“ antikeha või füsioloogilist lahust. Kuna loomad läbivad mitmeid protseduure ning neile tekitatakse tuumorid, siis hindame katse summaarselt raske raskusastmega, seda siis eelkõige mitte tehtava valu tulemusena (võimalikku valu ka leevendatakse valuvaigistitega) vaid katsest iseloomust tuleneva summaarse pikaajalise stressi ja võimaliku leebe või mõõduka valu tulemusena.

Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus	Pilootkatse. EWING sarkoomi vastaste antikehade ekspressioon skeletilihastes - võimalik kasvajakavastane ravi
Loomkatseprojekti vastavus loomkatse asendamise, vähendamise ja täiustamise nõudele	
<p>Asendamine Selgitage, miks on vaja kasutada elusloomi ja miks ei saa valida loomkatse asemel teaduslikult rahuldavat meetodit või katsestrateegiat, milles elusloomi ei kasutata</p>	<p>Antud katset ei saa asendada <i>in vitro</i> katsetega, kuna eesmärgiks on uurida, kas lihasrakkudes toodetav ja verre sekreteeritav antikeha on võimeline pidurdama kasvaja arengut organismi tasemel, sarnaselt ravimi manustamisega kõhuõõnde. Hiir on antud katseks parim mudel, kuna immuunpuudulikele hiirtele saab siirdada inimese päritolu kasvajakarke. Nii on võimalik tulemusi humaanmeditsiini transleerida.</p>
<p>Vähendamine Selgitage, kuidas vähendatakse loomkatseprojekti kasutatavate katseloomade arvu miinimumini, ilma seejuures loomkatse eesmärke kahjustamata</p>	<p>Loomakatses kasutatavate loomade arv on viidud miinimumini arvestades katse läbiviija varasemat kogemust. Tänapäevase tehnoloogiaga ei ole võimalik valideerida <i>in vivo</i> elektroporatsiooni efektiivsust nii, et kõikidel loomadest oleks sama geeniekspressiooni tase. Sellest tulenevalt oleme suurendanud katsegruppides olevate loomade arvu kuni 20 isendini. Vastavalt ekspressioonitasemele saame hiljem indiviidi põhiselt arvutada võimalikku tuumori supressiooni ja veres ringleva ravimi kontsentratsioonide omavahelisi seoseid.</p>
<p>Täiustamine Selgitage loomaliigi valikut: mille poolest on kasutatav loomaliik kõige sobivam, pidades silmas loomkatse eesmärke. Selgitage, kuidas täiustatakse katseloomade pidamis- ja hooldamistingimusi ning loomkatses kasutatavaid meetodeid, kõrvaldades katseloomadele põhjustatava võimaliku valu, kannatused, stressi või püsivad kahjustused või vähendades neid miinimumini.</p>	<p>Katses kasutatakse hiiri, kellel on puudulik immuunsüsteem. Tänu sellele on võimalik neile siirata inimese päritolu kasvajakarke. Katseloomade kannatusi leevendatakse valuvaigistite kasutamisega ja <i>in vivo</i> elektroporatsioon jala lihasesse viiakse läbi üldanesteesias. Hilisemate sabaveenist vereproovide võtmise käigus kasutatakse tuimestavat geeli. Katseloomi jälgitakse igapäevaselt ning vajadusel rakendatakse humaanseid lõpp-punkte, vältides nii loomade võimalike raskeid kannatusi.</p>

19 Superkomplekside moodustumise ja oksüdatiivse fosforüülimise vaheline seos südame mitokondrites.

Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus	Superkomplekside moodustumise ja oksüdatiivse fosforüülimise vaheline seos südame mitokondrites.
Loomkatseprojekti kestus	01.01.2017 – 31.12.2020
Loomkatseprojekti iseloomustavad märksõnad (maksimaalselt 5)	

Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus	Superkomplekside moodustumise ja oksüdatiivse fosforüülimise vaheline seos südame mitokondrites.																
Loomkatseprojekti läbiviimise eesmärk loomakaitseseaduse § 35 kohaselt	<table border="1"> <tr> <td>Alusuuring</td> <td>Jah</td> </tr> <tr> <td>Rakendusuuring</td> <td>Jah</td> </tr> <tr> <td>Õiguslike nõuete täitmisega seotud kasutus ja tavapärase tootmine (s.o loomakaitseseaduse § 35 punktides 2–4 nimetatud eesmärgil ravimite, toidu ning muude ainete ja toodete arendamine ja tootmine ning nende kvaliteedi, tõhususe ja ohutuse kontroll)</td> <td>Ei</td> </tr> <tr> <td>Loodusliku keskkonna kaitsmine inimese või looma heaolu või tervise huvides</td> <td>Ei</td> </tr> <tr> <td>Uuring, mille eesmärk on loomaliigi säilitamine</td> <td>Ei</td> </tr> <tr> <td>Kõrghariduse või kutsehariduse omandamine või täienduskoolitus</td> <td>Ei</td> </tr> <tr> <td>Kohtuekspertiisi uuring</td> <td>Ei</td> </tr> <tr> <td>Loomakaitseseaduse §-s 35 loetletud lubatud eesmärgil selliste väljakujunenud liini geneetiliselt muundatud loomade kolooniate säilitamine, keda ei kasutata muudes katsetes</td> <td>Ei</td> </tr> </table>	Alusuuring	Jah	Rakendusuuring	Jah	Õiguslike nõuete täitmisega seotud kasutus ja tavapärase tootmine (s.o loomakaitseseaduse § 35 punktides 2–4 nimetatud eesmärgil ravimite, toidu ning muude ainete ja toodete arendamine ja tootmine ning nende kvaliteedi, tõhususe ja ohutuse kontroll)	Ei	Loodusliku keskkonna kaitsmine inimese või looma heaolu või tervise huvides	Ei	Uuring, mille eesmärk on loomaliigi säilitamine	Ei	Kõrghariduse või kutsehariduse omandamine või täienduskoolitus	Ei	Kohtuekspertiisi uuring	Ei	Loomakaitseseaduse §-s 35 loetletud lubatud eesmärgil selliste väljakujunenud liini geneetiliselt muundatud loomade kolooniate säilitamine, keda ei kasutata muudes katsetes	Ei
Alusuuring	Jah																
Rakendusuuring	Jah																
Õiguslike nõuete täitmisega seotud kasutus ja tavapärase tootmine (s.o loomakaitseseaduse § 35 punktides 2–4 nimetatud eesmärgil ravimite, toidu ning muude ainete ja toodete arendamine ja tootmine ning nende kvaliteedi, tõhususe ja ohutuse kontroll)	Ei																
Loodusliku keskkonna kaitsmine inimese või looma heaolu või tervise huvides	Ei																
Uuring, mille eesmärk on loomaliigi säilitamine	Ei																
Kõrghariduse või kutsehariduse omandamine või täienduskoolitus	Ei																
Kohtuekspertiisi uuring	Ei																
Loomakaitseseaduse §-s 35 loetletud lubatud eesmärgil selliste väljakujunenud liini geneetiliselt muundatud loomade kolooniate säilitamine, keda ei kasutata muudes katsetes	Ei																
Kirjeldage loomkatseprojektiga saavutada soovitavaid tulemusi (nt teadusalaste probleemide lahendamine)	<p>Südamehaigused on üheks olulisemaks surma põhjuseks arenenud maailmas, vastavalt WHO statistikale kolmandal kohal. Kardiovaskulaarsete haiguste riskifaktoriks on kõrgvererohutõbi, diabeet, rasvumine, vähene füüsiline aktiivsus. Need põhjustavad ainevahetuse häireid, mille tulemusena ei saa meie keha vajalikke toitaineid, mis omakorda vähendab südame töö efektiivsust. Üheks olulisemaks lahendamist vajavaks probleemiks on metabolismi kõrvalekallete varane diagnoosimine, mis võimaldaks ennetada tõsisemaid patoloogilisi muutusi.</p> <p>Südame arengu käigus moodustuvad mitokondris asuva hingamisahela kompleksid superkompleksi, respirasoomi, mis tagab oksüdatiivse fosforüülimise efektiivsema toimumise põhilise energiakandja, ATP (adenosiintrifosfaadi) moodustamiseks vähendades samaaegselt reaktiivsete hapniku ühendite (ROS) teket. Neonataalsel perioodil, samaaegselt respirasoomi moodustumisega, lülitub mitokondri seniselt, valdavalt laktaadi ja glükoosi oksüdatsioonilt, ümber rasvhapete beeta-oksüdatsioonile. Samas on südame vananemisega seotud uuringutes näidatud</p>																

Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus	Superkomplekside moodustumise ja oksüdatiivse fosforüülimise vaheline seos südame mitokondrites.
	<p>respirasoomide arvu ja nendega seotud komplekside arvu vähenemist. Antud projekti eesmärk on uurida respirasoomi moodustumist ja bioenergeetilise regulatsiooni muutust südamerakkudes substraatide vahetumisel sünnijärgsel perioodil, samuti kaardistada muutusi mis toimuvad vananemise varases faasis. Uuring viiakse läbi kahes erinevas mitokondrite populatsioonis, subsarkolemmaalses ja interfibrillarses fraktsioonis, jälgides samaaegselt ka soospetsiifilisi muutusi. Antud projekti esmaseks eesmärgiks on määrata ATP tootmist otseselt mõjutavate superkomplekside moodustumise kulgu ja kaardistada esmased muutused vananemisel. Järgnevas eesmärgiks on saadud uurimistulemuste seostamine energiavaegusest põhjustatud esmaste patoloogiliste ilmingutega südamelihases, mis võimaldaks varase diagnoosimise ja sellest tulenevaid ravivõimalusi.</p>
Milline on selle loomkatseprojekti võimalik kasu (kuidas see edendab teadust või kuidas inimesed või loomad loomkatseprojektist kasu saavad)?	<p>Projekti tulemused annavad olulist lisateavet mitokondriaalsete häirete varaseks diagnoosiks. Antud uuringud annavad vajalikke alusteadmisi südamelihase arengu käigus toimuvatest bioenergeetilise regulatsiooni ümberkorraldustest ja muutustest südamelihase bioenergeetikas vananemise varasel etapil.</p>
Milliseid loomaliike ja kui palju loomi (ligikaudu) kavatakse kasutada?	<p>Antud projekti käigus on plaanis kasutada Wistari liini rotte. Kasutatud katseloomade arv on viidud miinimumini, mis tagaks statistiliselt usaldusväärse katseseeriade läbiviimise. Vastavalt väljatöötatud katseplaanile jagatakse rotid 2 X 7 katserühma (7 vanuserühma, igas isane ja emane rühm) 0, 3, 7, 14, 21, 90 ja 365 päeva sünnijärgset vanust, igas katserühmas 10-30 looma (vanuse kasvades loomade arv rühmas väheneb). Projekti jooksul on planeeritud kasutada kokku 240 rottit.</p>
Millised on katseloomadel rakendatavad menetlused ja nende eeldatav kahju loomadele? Milline on loomkatse tõenäoline/eeldatav raskusaste ja katseloomade saatus pärast loomkatseprojekti lõppu?	<p>Töö käigus põhjustatakse katseloomadele otseseid kannatusi paari sekundi jooksul anesteetikumi süstimise käigus. Pärast anesteetikumide süsti kontrollitakse narkoosi sügavust kvalifitseeritud töötaja poolt, et vältida loomale põhjustatud kannatuste tekitamist. Narkoosi ajal, pärast dekapitatsiooni eraldatakse vastavalt väljatöötatud meetodikale looma süda ja valikuliselt sääre lihaskudet.</p>

Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus	Superkomplekside moodustumise ja oksüdatiivse fosforüülimise vaheline seos südame mitokondrites.
Loomkatseprojekti vastavus loomkatse asendamise, vähendamise ja täiustamise nõudele	
Asendamine Selgitage, miks on vaja kasutada elusloomi ja miks ei saa valida loomkatse asemel teaduslikult rahuldavat meetodit või katsestrateegiat, milles elusloomi ei kasutata	Antud projekti eesmärk on kaardistada superkomplekside areng südamelihase raku mitokondrites ja muutused, mis toimuvad nendes vananemise käigus. Rakukultuurides ei ole selliste muutuste jälgimine võimalik, seega antud uurimuse puhul puudub võimalus katseloomade kasutamise täielikuks vältimiseks. Oleme läbi viinud analüüsi ja jõudnud järeldusele, et kuna eelduseks on eraldada rakke terve looma eelnevalt mõjutamata ainevahetusega kudetest, ei ole teiste TTÜ vivaariumit kasutavate laborite ja meie labori teised samaaegsed katseplaanid hetkel sellised, mis võimaldaksid antud projekti käigus kasutada katsetes juba kasutatud loomi.
Vähendamine Selgitage, kuidas vähendatakse loomkatseprojekti kasutatavate katseloomade arvu miinimumini, ilma seejuures loomkatse eesmärke kahjustamata	Katseloomade hulk on minimaliseeritud, kasutades katsete põhjalikku eelnevat planeerimist. Ühest loomast eraldatakse samaaegselt erinevat tüüpi lihaskudet järgnevatel mõõtmiste teostamiseks. Katsete puhul, mis seda võimaldavad, koed külmutatakse ja kasutatakse vastavalt vajadusele pika aja jooksul. Mitmete inimeste kaasamine katseteks, mis eeldavad mõõtmisi mõne tunni jooksul pärast rakkude eraldamist, tagab eksperimentide samaaegse teostamise. Samuti tagab eraldatud kudede maksimaalse ärakasutamise külmutatud proovide kasutamine pikema aja jooksul katsetes, mis seda võimaldavad.
Täiustamine Selgitage loomaliigi valikut: mille poolest on kasutatav loomaliik kõige sobivam, pidades silmas loomkatse eesmärke. Selgitage, kuidas täiustatakse katseloomade pidamis- ja hooldamistingimusi ning loomkatses kasutatavaid meetodeid, kõrvaldades katseloomadele põhjustatava võimaliku valu, kannatused, stressi või püsivad kahjustused või vähendades neid miinimumini.	Antud projektis kasutatud täiskasvanud rotid on Wistar'i liinist, mis on rahvusvaheliselt aktsepteeritud katseloomad. Wistar liini rotid pärinevad firmalt Envigo ja paljundatakse TTÜ Geenitehnoloogia Instituudi vivaariumis (ettevõtte tunnustamise otsuse number ja kuupäev: KL0102, 19.08.2005). Rotid, kui sotsiaalsed loomad, peetakse grupidena EU Direktiivis sätestatud normidele vastavates puurides automaatiseeritud öö ja päev valgusrežiimis reguleeritud niiskusega ja temperatuuriga ruumides. Loomade elukeskkond mitmekesistatakse närimis- ja pesaehitusmaterjaliga ning neile tagatakse vaba liigipäas toidule ja puhtale veele. Manipulatsioonid teadvusel loomadega on viidud miinimumini. Otseseid kannatusi põhjustatakse katseloomadele paari sekundi jooksul anesteetikumi süstimise käigus. Juhul, kui looma käitumine viitab

Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus	Superkomplekside moodustumise ja oksüdatiivse fosforüülimise vaheline seos südame mitokondrites. vaevustele, mida ei ole võimalik kõrvaldada, looma elu lõpetatakse.
---------------------------------------	---

20 DNMT ja TET perekonna ensüümid kui uued biomarkerid ja terapeutilised sihtmärgid psühhostimulaatorite poolt indutseeritud ravimsõltuvuse raviks

Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus	Epigeneetilised ravimsõltuvuse mehhanismid																
Loomkatseprojekti kestus	Loomkatsete alguse kuupäev: 01.10.2016 Loomkatsete lõpu kuupäev: 31.12. 2020																
Loomkatseprojekti iseloomustavad märksõnad (maksimaalselt 5)	Psühhostimulaator, käitumuslik sensitisatsioon, epigeneetika, hiir																
Loomkatseprojekti läbiviimise eesmärk loomakaitseseaduse § 35 kohaselt	<table border="1"> <tr> <td>Alusuuring</td> <td>Jah</td> </tr> <tr> <td>Rakendusuuring</td> <td>Ei</td> </tr> <tr> <td>Õiguslike nõuete täitmisega seotud kasutus ja tavapärase tootmine (s.o loomakaitseseaduse § 35 punktides 2–4 nimetatud eesmärgil ravimite, toidu ning muude ainete ja toodete arendamine ja tootmine ning nende kvaliteedi, tõhususe ja ohutuse kontroll)</td> <td>Ei</td> </tr> <tr> <td>Loodusliku keskkonna kaitsmine inimese või looma heaolu või tervise huvides</td> <td>Ei</td> </tr> <tr> <td>Uuring, mille eesmärk on loomaliigi säilitamine</td> <td>Ei</td> </tr> <tr> <td>Kõrghariduse või kutsehariduse omandamine või täienduskoolitus</td> <td>Ei</td> </tr> <tr> <td>Kohtuekspertiisi uuring</td> <td>Ei</td> </tr> <tr> <td>Loomakaitseseaduse §-s 35 loetletud lubatud eesmärgil selliste väljakujunenud liini geneetiliselt muundatud loomade kolooniate säilitamine, keda ei kasutata muudes katsetes</td> <td>Ei</td> </tr> </table>	Alusuuring	Jah	Rakendusuuring	Ei	Õiguslike nõuete täitmisega seotud kasutus ja tavapärase tootmine (s.o loomakaitseseaduse § 35 punktides 2–4 nimetatud eesmärgil ravimite, toidu ning muude ainete ja toodete arendamine ja tootmine ning nende kvaliteedi, tõhususe ja ohutuse kontroll)	Ei	Loodusliku keskkonna kaitsmine inimese või looma heaolu või tervise huvides	Ei	Uuring, mille eesmärk on loomaliigi säilitamine	Ei	Kõrghariduse või kutsehariduse omandamine või täienduskoolitus	Ei	Kohtuekspertiisi uuring	Ei	Loomakaitseseaduse §-s 35 loetletud lubatud eesmärgil selliste väljakujunenud liini geneetiliselt muundatud loomade kolooniate säilitamine, keda ei kasutata muudes katsetes	Ei
Alusuuring	Jah																
Rakendusuuring	Ei																
Õiguslike nõuete täitmisega seotud kasutus ja tavapärase tootmine (s.o loomakaitseseaduse § 35 punktides 2–4 nimetatud eesmärgil ravimite, toidu ning muude ainete ja toodete arendamine ja tootmine ning nende kvaliteedi, tõhususe ja ohutuse kontroll)	Ei																
Loodusliku keskkonna kaitsmine inimese või looma heaolu või tervise huvides	Ei																
Uuring, mille eesmärk on loomaliigi säilitamine	Ei																
Kõrghariduse või kutsehariduse omandamine või täienduskoolitus	Ei																
Kohtuekspertiisi uuring	Ei																
Loomakaitseseaduse §-s 35 loetletud lubatud eesmärgil selliste väljakujunenud liini geneetiliselt muundatud loomade kolooniate säilitamine, keda ei kasutata muudes katsetes	Ei																
Kirjeldage loomkatseprojektiga saavutada soovitavaid tulemusi (nt teadusalaste probleemide lahendamine)	Antud projekti eesmärgiks on hinnata sõltuvuskäitumisega kaasnevaid epigeneetilisi muutusi ajus ja leukotsüütides.																

Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus	Epigeneetilised ravimsõltuvuse mehhanismid
Milline on selle loomkatseprojekti võimalik kasu (kuidas see edendab teadust või kuidas inimesed või loomad loomkatseprojektist kasu saavad)?	Antud uuringu tulemused aitavad paremini mõista sõltuvuskäitumise molekulaarseid mehhanisme inimesel, leida uusi diagnostilisi biomarkereid ning ravimite sihtmärke väljakujunenud ravimsõltuvuse (sh narkosõltuvuse) raviks.
Milliseid loomaliike ja kui palju loomi (ligikaudu) kavatakse kasutada?	Kogu projekti läbiviimiseks (2016 – 2020) läheb vaja 200 täiskasvanud C57BL/6 isast hiirt. Katseloomade arv on planeeritud varuga. Nii grupi siseses kui ka gruppide vahelise variatsiooni vähendamiseks enne katsete algust tuleb hiiri selekteerida ja sobimatud loomad katsetest välja arvata. Nende katseloomade hulgas on ka tagavara loomad, et asendada katse käigus katsest väljalangenud loomad.
Millised on katseloomadel rakendatavad menetlused ja nende eeldatav kahju loomadele? Milline on loomkatse tõenäoline/eeldatav raskusaste ja katseloomade saatus pärast loomkatseprojekti lõppu?	Katseloomad saavad intraperitoneaalseid ja -tserebraalseid süste. Katseloomade mootorikat hinnatakse videokaameraga varustatud kambris. Katseloomadele tekitatav kerge kuni mõõdukas kahju seisneb psühhostimulaatori, potentsiaalsete raviainete ning füsioloogilise lahuse korduvast manustamises. Katsegrupi loomadel areneb välja ravimsõltuvus. Kontroll grupi loomade kahju piirneb füsioloogilise lahuse süstidega. Katselõpus kõik loomad surmatakse ja koed analüüsitakse kasutades molekulaarbioloogilisi meetodeid
Loomkatseprojekti vastavus loomkatse asendamise, vähendamise ja täiustamise nõudele	
Asendamine Selgitage, miks on vaja kasutada elusloomi ja miks ei saa valida loomkatse asemel teaduslikult rahuldavat meetodit või katsestrateegiat, milles elusloomi ei kasutata	Antud katseid ei saa asendada <i>in vitro</i> katsetega, sest rakukultuuridel (näiteks primaarne närvirakkude kultuur) ei saa modelleerida psühhostimulaatorite poolt põhjustatud ravimsõltuvust. Samuti on katse eesmärk korreleerida katseloomade käitumiskatsetest saadud tulemusi (fenotüüp), katseloomade erinevates kudedes avalduvate geneetiliste ja epigeneetiliste muutustega. Edukas katseloomadel läbiviidud uuring on eelduseks kliiniliste uuringute algatamiseks.
Vähendamine Selgitage, kuidas vähendatakse loomkatseprojektis kasutatavate katseloomade arvu miinimumini, ilma seejuures loomkatse eesmärke kahjustamata	Loomkatsete arvu planeerimisel on arvesse võetud statistilisest analüüsist lähtuvat minimaalset gruppide suurust. Kõigil katseloomadel uuritakse nii käitumuslike kui biokeemilisi muutusi, vähendades katseloomade arvu umbes 50%.

Loomkatseprojekti kokkuvõttev nimetus	Epigeneetilised ravimsõltuvuse mehhanismid
<p>Täiustamine</p> <p>Selgitage loomaliigi valikut: mille poolest on kasutatav loomaliik kõige sobivam, pidades silmas loomkatse eesmärke. Selgitage, kuidas täiustatakse katseloomade pidamis- ja hooldamistingimusi ning loomkatses kasutatavaid meetodeid, kõrvaldades katseloomadele põhjustatava võimaliku valu, kannatused, stressi või püsivad kahjustused või vähendades neid miinimumini.</p>	<p>Hiired on sellisteks uuringuteks sobivam katseloom, sest nendega on varem sarnaseid uuringuid läbi viidud. Hiirtel uuringute teostamiseks on olemas sobiv aparatuur ja uuringute maksumus on väiksem kui teistel katseloomadel. Hiired elavad 6-8 puurides, keskkonna rikastamiseks on puurides puupulgad ja pesa materjalid. Stressi vähendamiseks harjutatakse katses osalevaid hiiri mõõtmiskambritega, harjutatakse kätlemist ja süstimist. Katse käigus läbi viidavad protseduurid toimuvad kindlatel kellaaegadel, suurendades rutiinsust.</p>