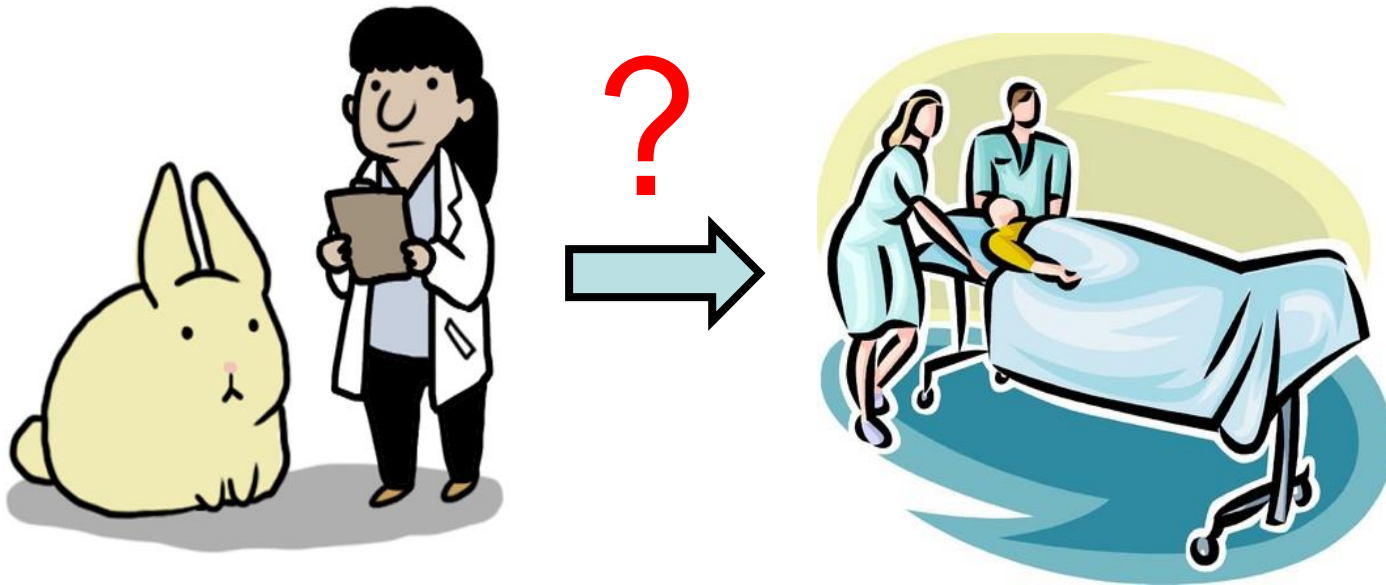
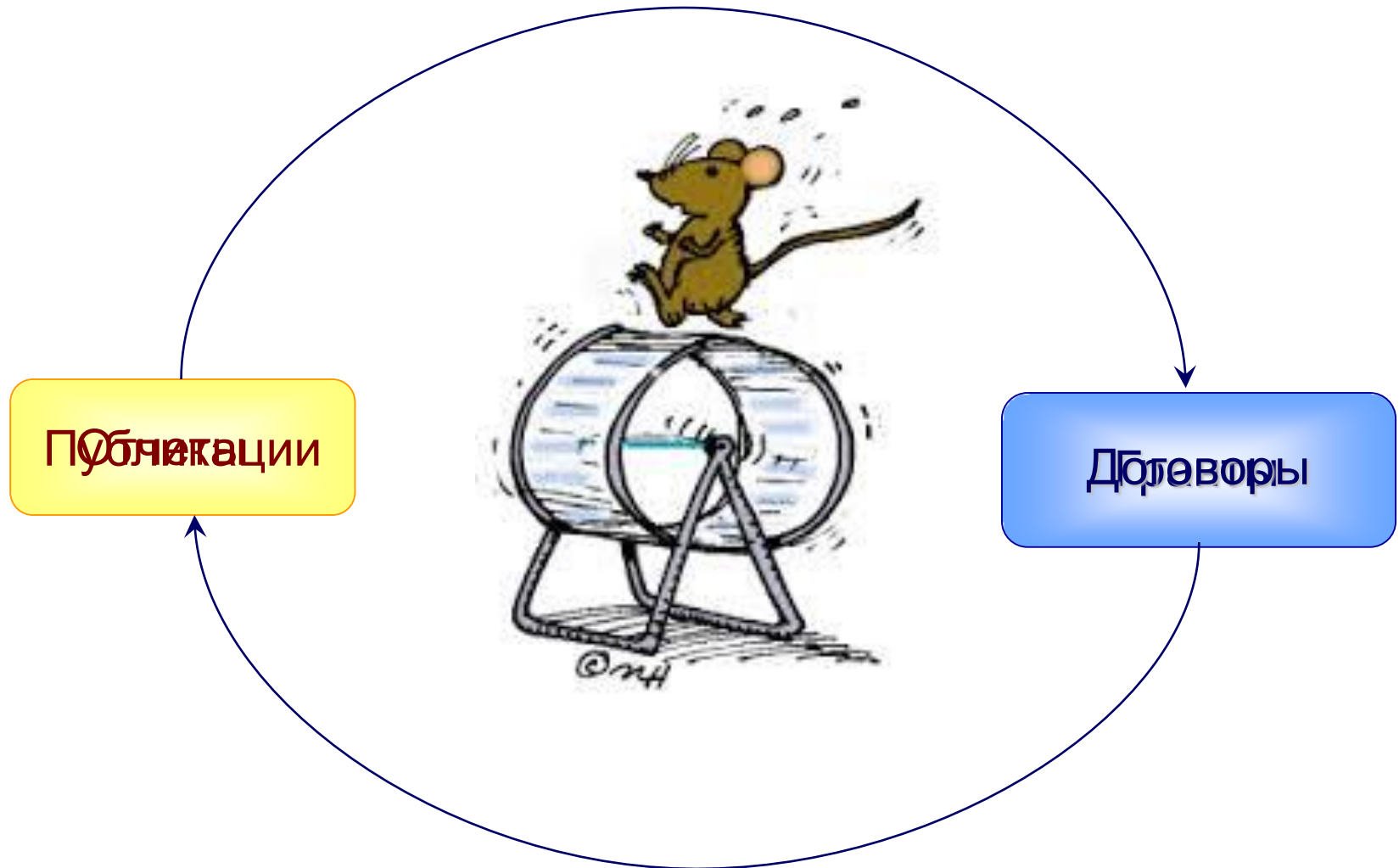


Галагудза М.М.

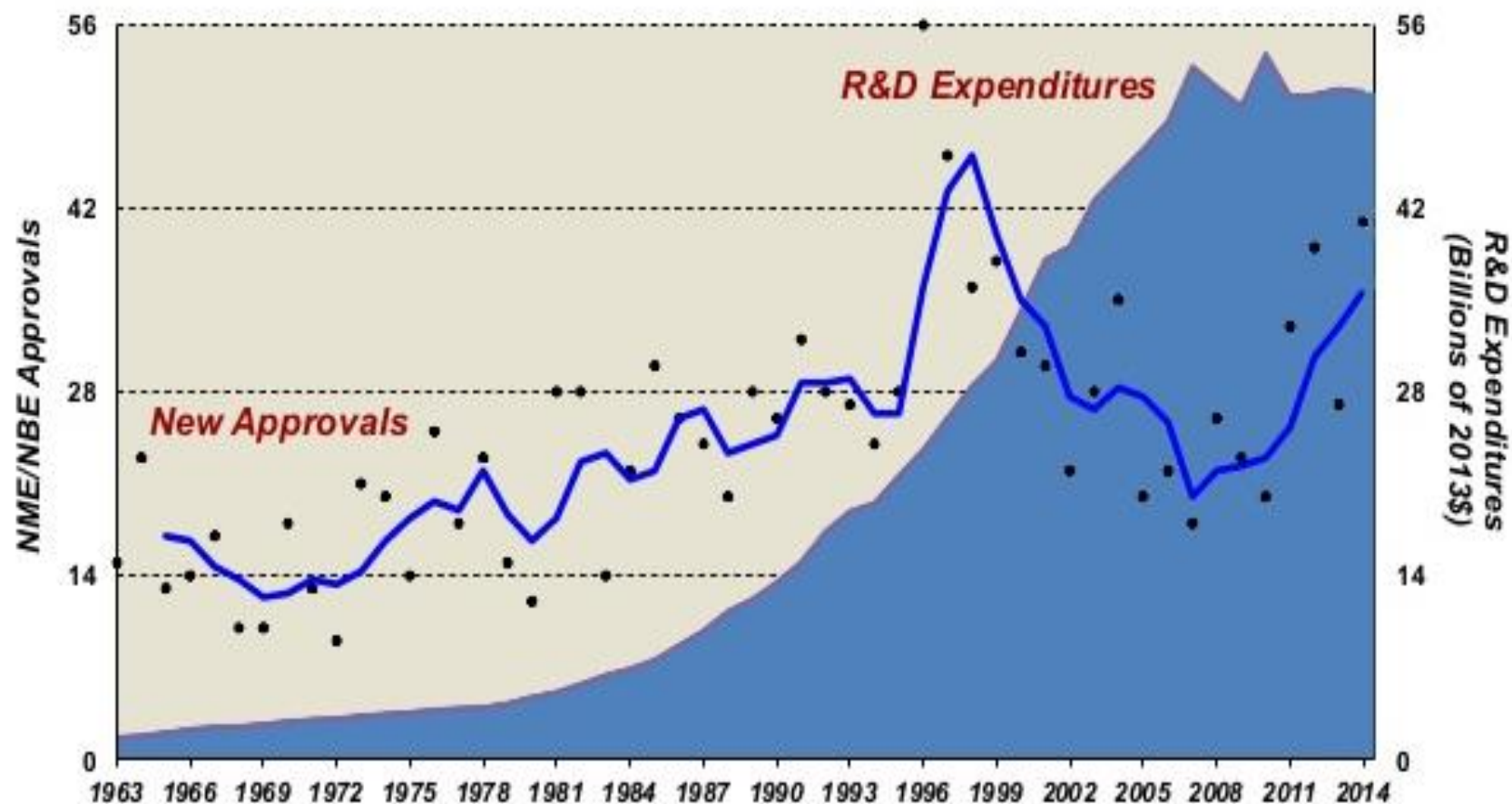
Экспериментальные исследования на животных в эпоху трансляционной медицины: какими им быть ?



Порочный круг в практике современного «успешного» ученого



New Drug and Biologic Approvals Are Not Keeping Pace with Rising R&D Costs



* Trend line is 3-year moving average; R&D expenditure adjusted for inflation

Source: Tufts CSDD, 2015; R&D expenditures from PhRMA

Special Article

Myocardial Protection at a Crossroads The Need for Translation Into Clinical Therapy

Roberto Bolli, Lance Becker, Garrett Gross, Robert Mentzer, Jr, David Balshaw, David A. Lathrop

Circ Res. 2004;95:125-134

doi: 10.1161/01.RES.0000137171.97172.d7

Disease Models & Mechanisms 3, 35-38 (2010) doi:10.1242/dmm.003855

Published by The Company of Biologists 2010

COMMENTARY

Cardiac preconditioning for ischaemia: lost in translation

Andrew J. Ludman¹, Derek M. Yellon¹ and Derek J. Hausenloy^{1,*}

SYMPOSIUM REVIEW

Protective conditioning of the brain: expressway or roadblock?

Philipp Mergenthaler and Ulrich Dirnagl

Center for Stroke Research Berlin, Charité and Departments of Neurology and Experimental Neurology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany

Review

Neuroprotection for ischaemic stroke: Translation from the bench to the bedside

Brad A. Sutherland^{1†}, Jens Minnerup^{2†}, Joyce S. Balami³, Francesco Arba¹,
Alastair M. Buchan^{1*‡}, and Christoph Kleinschnitz^{4‡}

Essay

Why Most Published Research Findings Are False

John P. A. Ioannidis



Востребованность и воспроизводимость экспериментальных данных

- 85% фундаментальных и клинических биомедицинских исследований фактически оказываются невостребованными вследствие ошибочного дизайна, отсутствия публикации и неадекватного представления данных (Chalmers I & Glasziou P, 2009)
- Это приводит к потере 100 млрд. долларов США в год из средств, ассигнованных на исследования
- Отсутствие воспроизводимости результатов отмечается в 51-89% случаев (Freedman LP & Gibson MC, 2015)

Возникающие проблемы

- Этическая проблема : крупномасштабное использование животных (>100 млн. в год) не приводит к пропорциональному улучшению результатов лечения у людей
- Экономическая проблема : вложенные в исследования средства не окупаются
- Социологическая проблема : снижение степени доверия к результатам экспериментальных исследований, в т.ч. у широкой общественности



Гипотеза

**Методология
экспериментирования**

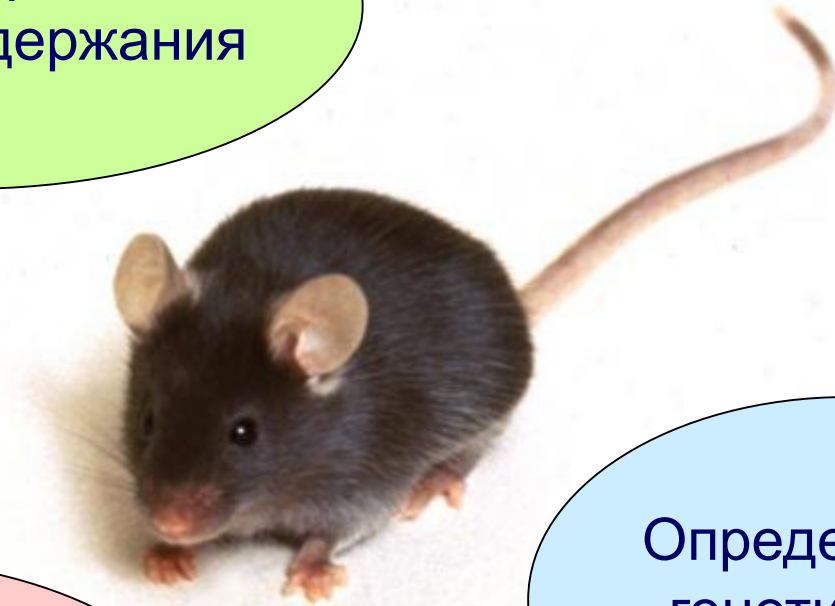
**Качество
лабораторных
животных**

Внутренняя валидность эксперимента



Компоненты качества лабораторных животных: *битва за уменьшение стандартного отклонения*

Стандартизированные
условия содержания



Контролируемая
микробиота

Определенный
генетический
статус

Влияние микроорганизмов на результаты эксперимента

- Измененный иммунный ответ (н-р, Ectromelia virus, mouse hepatitis virus)
- Измененный физиологический ответ в фармакологических и токсикологических исследованиях (н-р, Bacillus piliformis, Salmonella enteritidis)
- Измененная восприимчивость к другим инфекциям
- Канцерогенез или спонтанная неоплазия (вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус Сендай)
- Контаминация перевиваемых опухолей (н-р, Mycoplasma arthritidis, Mycoplasma pulmonis, Kilham rat virus)

Виды систематических ошибок, снижающих внутреннюю валидность эксперимента

- Ошибки отбора (selection bias)
- Ошибки, связанные с выполнением исследования (performance bias)
- Ошибки, связанные с отсевом (attrition bias)
- Ошибки детекции (detection bias)

Примеры ошибок отбора

Животные в контрольной и подопытной группах значительно отличаются по таким исходным характеристикам, как:

- масса тела
- возраст
- пол
- источник поступления
- партия поступления
- состав кишечного микробиома
- ...

Способы ликвидации ошибок отбора

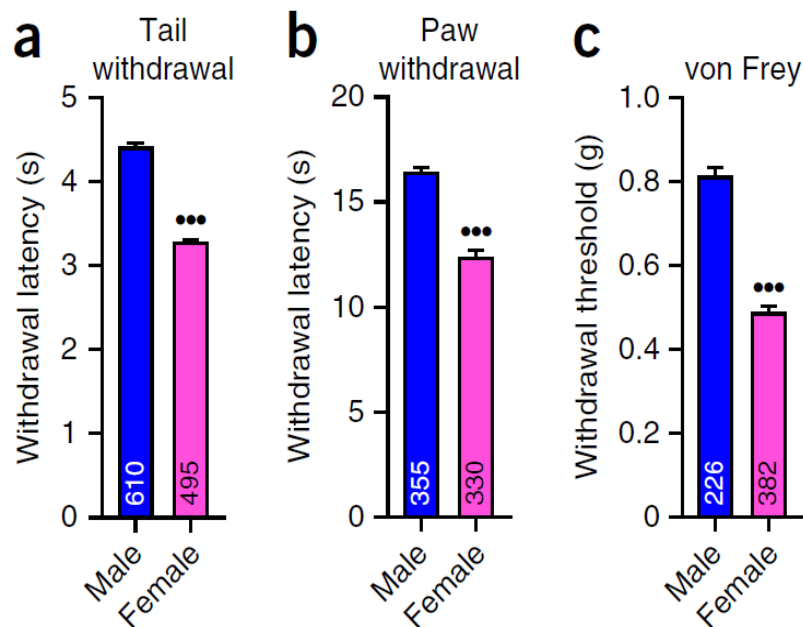
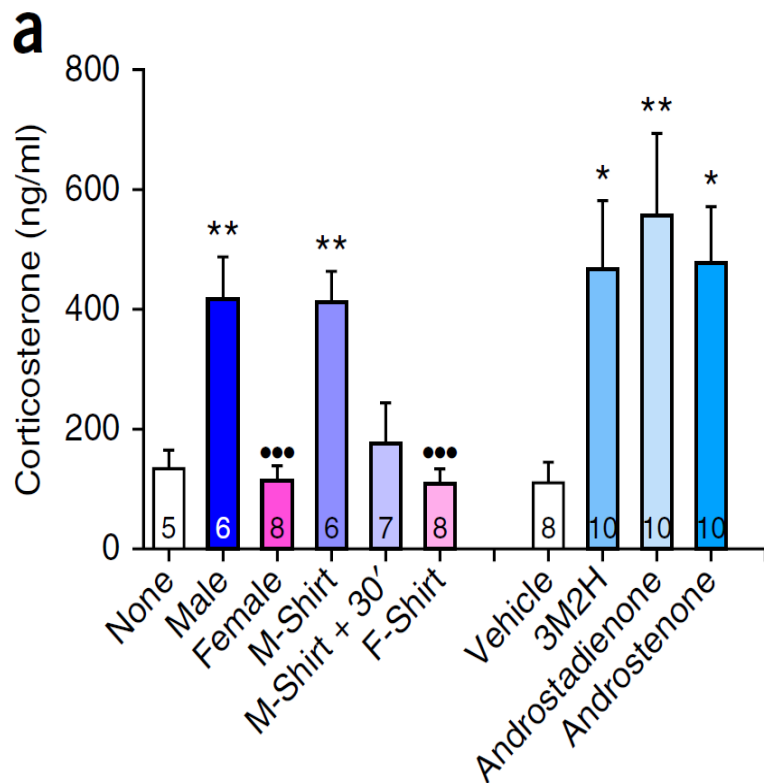
- Рандомизация (генерация последовательности случайных чисел):
 - регулярная проверка качества рандомизации
- Соккрытие порядка отнесения животного к той или иной группе
- Наличие критериев включения/исключения из группы:
 - критерии должны быть сформулированы до начала исследования

Ошибки, связанные с выполнением исследования

- Возникают в том случае, когда животные разных групп содержатся в неодинаковых условиях, получают неодинаковый уход или подвергаются воздействию факторов, отличающихся от тестируемого воздействия
- Контрольный вопрос: «Были ли условия содержания животных различных групп одинаковыми и был ли ослеплен персонал по уходу ?»
- Источники performance bias: разные типы клеток, разный корм, подстил, разная частота приручения, разный уровень освещенности, температуры, шума, разная техника выполнения хирургической модификации животных и пр.
- Пути устранения: ослепление, случайное размещение в комнате

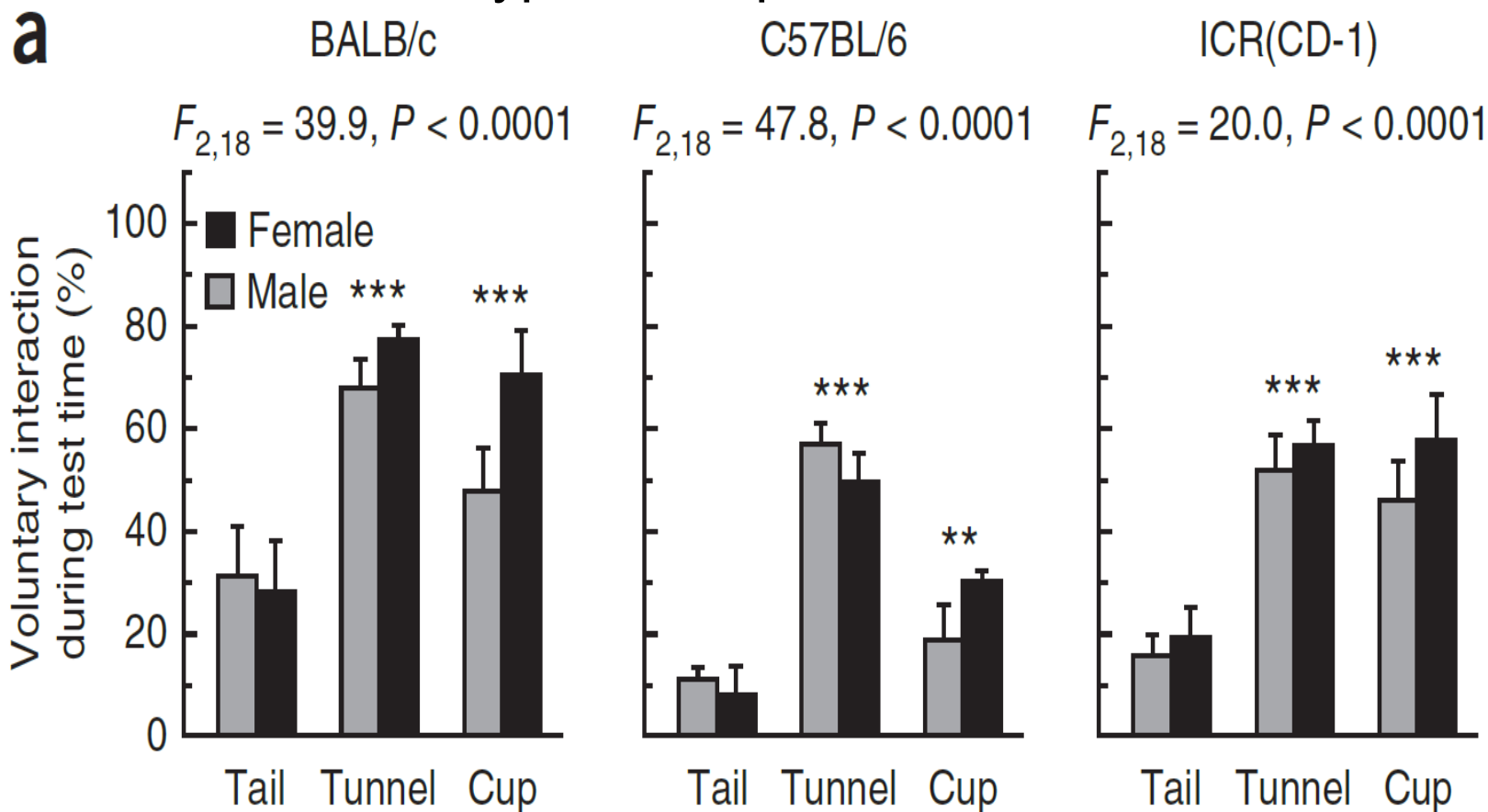
Пример ошибки, связанной с выполнением исследования

При обязательном контакте лабораторных мышей с самцами, включая мужчин-экспериментаторов и лаборантов, у них повышается уровень стресса и развивается стресс-опосредованная аналгезия



Пример ошибки, связанной с выполнением исследования

Тип хэндлинга у лабораторных мышей определяет уровень тревожности



Пример ошибки, связанной с отсевом

«24 животных были рандомизированы на 2 группы (по 12 животных в каждой группе). Средняя масса тела (\pm стандартное отклонение) мышей в группе А составила 25 ± 3 г ($n = 7$), а в группе Б – 24 ± 2 г ($n = 12$)».

Где еще 5 мышей из группы А ???

Пути устранения ошибок, связанных с отсевом

- Необходимо указывать, какое количество животных выбыло из эксперимента и по какой причине (гибель, соответствие критериям исключения и пр.).
- Идеальным вариантом является графическое представление данных о динамике количества животных в ходе эксперимента от момента включения в группу до завершения анализа всех конечных точек с указанием количества животных в каждой группе на каждом этапе эксперимента, а также динамики исключения/отсева с указанием причин.

Ошибки детекции и способы их устранения

- Ошибки детекции возникают при неодинаковом подходе к оценке исходов исследования
- Для полуколичественных конечных точек (например, гистологическая картина, степень активности животного), риск очень велик.
- Отсутствие ослепления исследователя, оценивающего исходы, приводит к увеличению степени различия между группами
- Способы устранения: ослепление исследователя, проводящего оценку исходов; кодировка животных/групп должна полностью исключать представление о характере воздействия

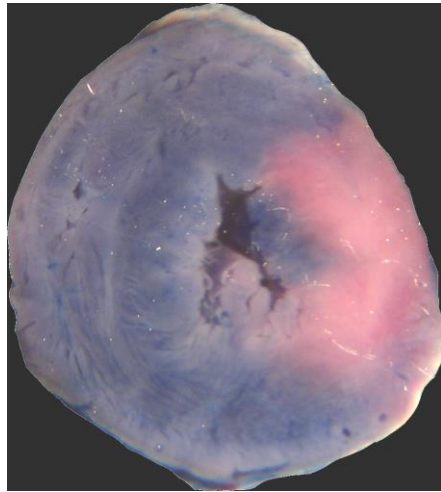
Пример ошибки детекции



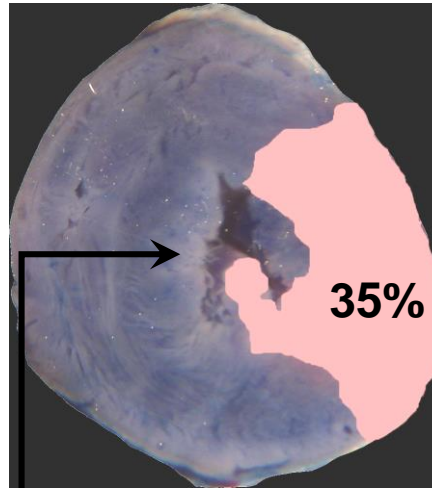
Задача персонала по уходу за животными: каждый день отмечать активность животных в баллах от 1 балла (неактивны) до 5 баллов (очень активны).

Результат ?

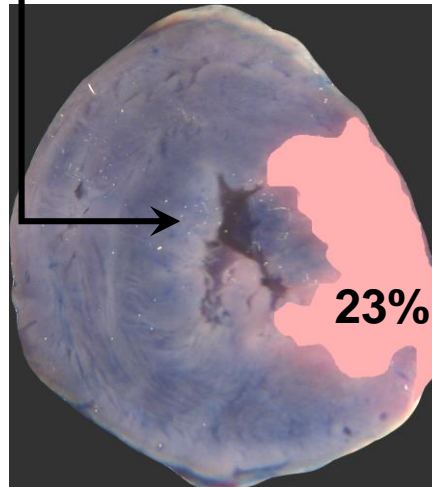
Ошибка детекции: субъективизм при оценке размера зоны ишемии миокарда



Исходное изображение



35%



23%

Количественные значения размера зоны ишемии, полученные разными экспериментаторами

Решение проблемы: оценка «вслепую», кодирование изображений, получение более качественных исходных изображений для анализа

Экспериментальные исследования на животных должны проводиться по тем же принципам, что и клинические исследования

- Многоцентровые
- Предварительная регистрация
- Доступ к первичным данным
- Ослепление
- Рандомизация
- ...

Рекомендации STAIR 1 (1999) по доклинической оценке нейропротекторов

- Гистологические и функциональные исходы должны оцениваться в раннем (1-3 дня) и позднем (7-30 дней) периоде
- Физиологический мониторинг (температура, АД, pO₂, pCO₂, pH)
- Рандомизированные, слепые исследования
- Сначала опыты на грызунах, затем – на гирэнцефальных видах
- Клинически приемлемое терапевтическое окно и кривая эффект-доза
- Оценка эффективности в 2 и более лабораториях

Рекомендации STAIR 2 (2009) по доклинической оценке нейропротекторов

- Использование критериев включения/исключения
- Статистическое обоснование объема выборки
- Декларирование конфликта интересов
- Дополнительные исследования на старых животных обоих полов с коморбидностью
- Исследования на фоне применения лекарств, широко применяемых у больных инсультом

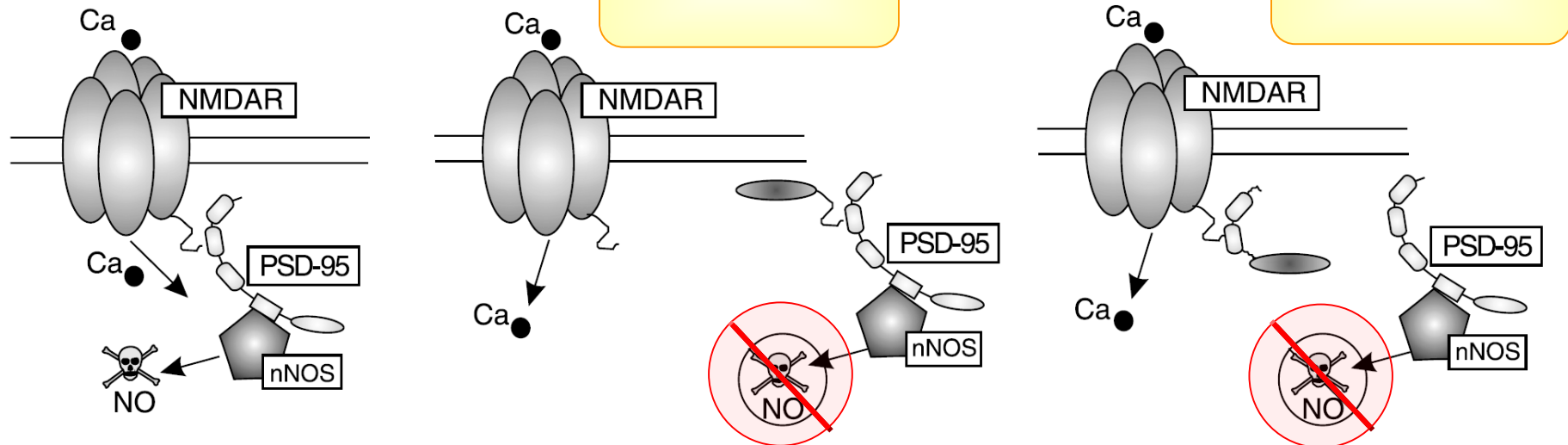
Проблемы трансляции экспериментальных данных о нейропротекции

- Только 5 из 550 лекарств с доказанным в эксперименте нейропротективным действием удовлетворяли критериям STAIR (O'Collins et al., Ann Neurol 2006 59: 467-77)
- Нет данных о том, что используемые в клинике препараты намного эффективнее в эксперименте, чем те, что тестируются только на животных (O'Collins et al., Ann Neurol 2006 59: 467-77)
- Нейропротективный эффект выше в исследованиях без применения рандомизации и ослепления (Lapchak et al., Transl Stroke Res 2012)
- Рандомизация, ослепление и анализ стат. мощности применяется лишь в 36, 29 и 3% публикаций
- Нет корреляции между качеством исследования и ИФ журнала

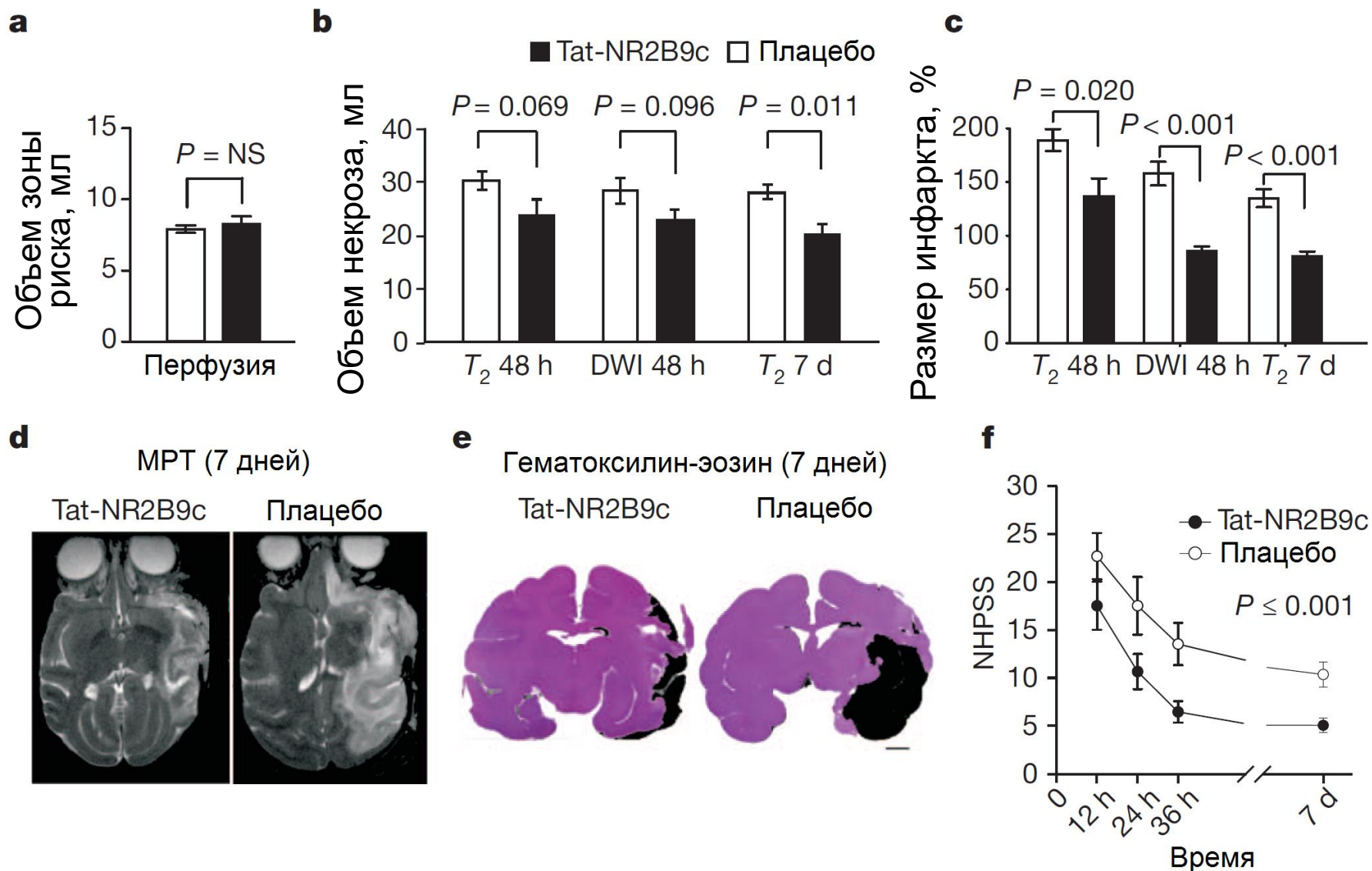
Белок PSD-95 является посредником между NMDA рецептором и нейрональной NO-синтазой

Активация NMDA рецепторов приводит к активации nNOS и оксидативному повреждению

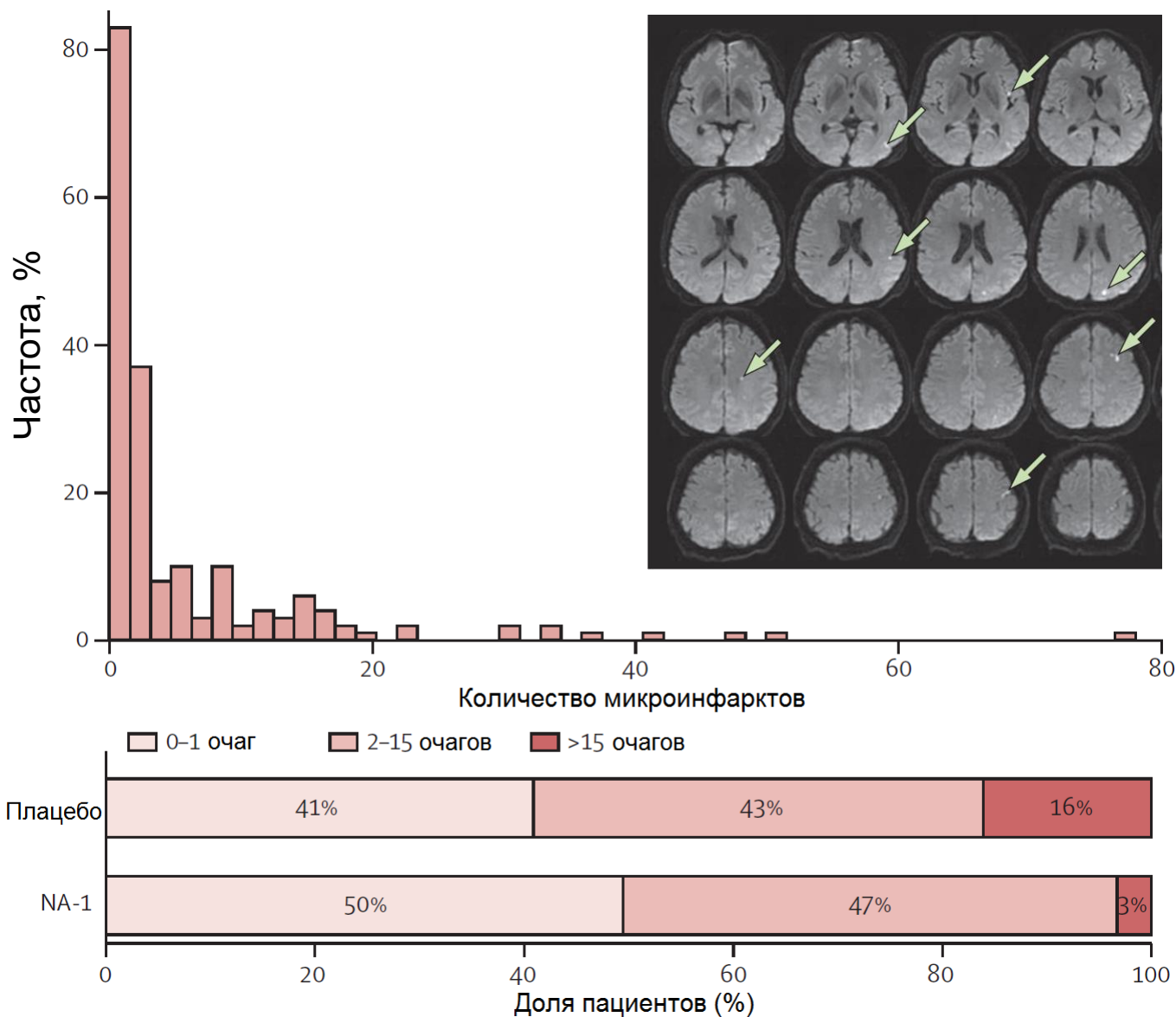
Tat пептиды блокируют каскад эксайтотоксичности



Ингибирование PSD-95 приводит к уменьшению повреждения головного мозга у приматов



Ингибирование PSD-95 приводит к уменьшению ятрогенного эмболического повреждения головного мозга у пациентов



Почему среди сотен предложенных методов кардиопротекции стандартом до сих пор стала только реваскуляризация миокарда?

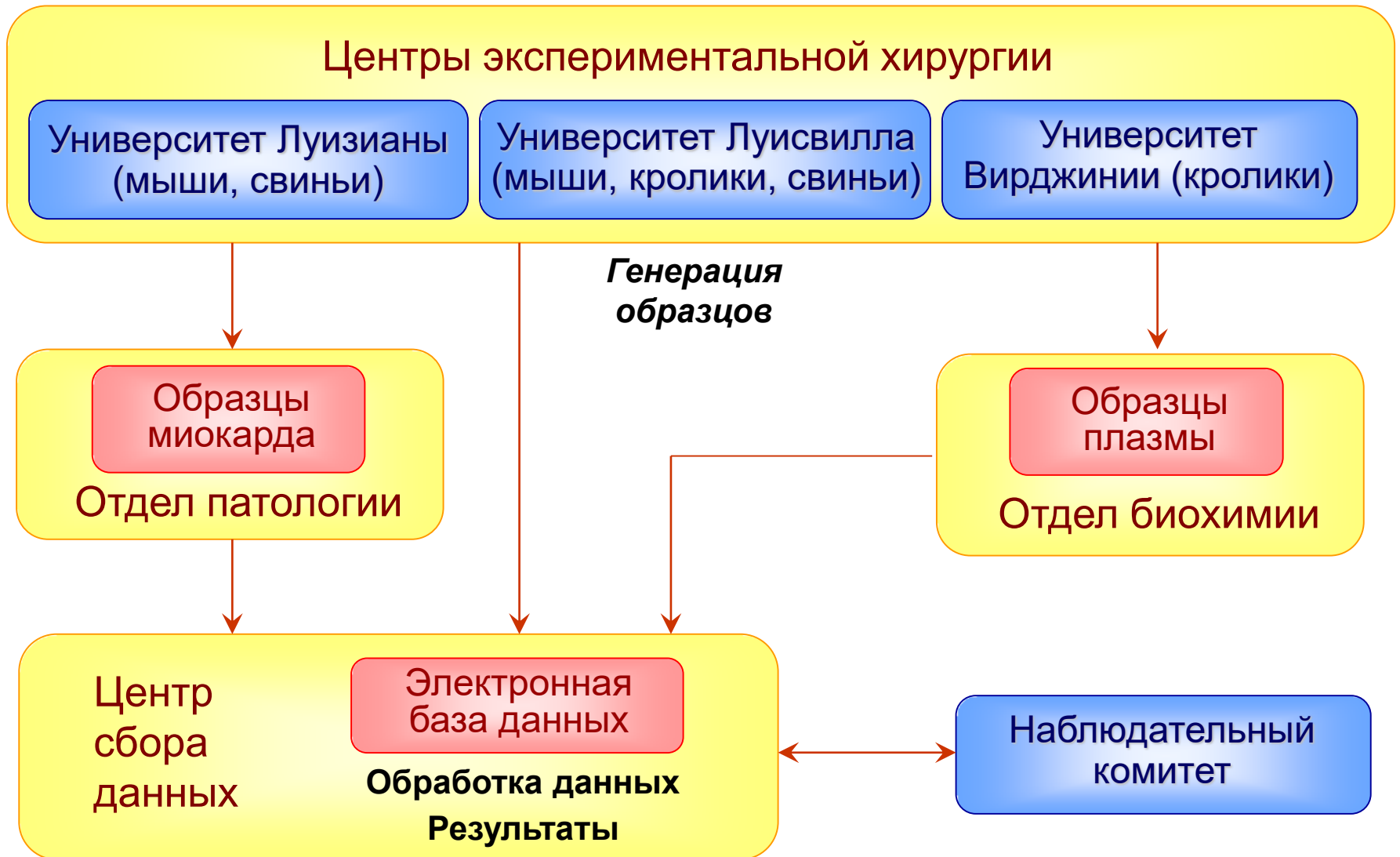
- Эффективны ли на самом деле тестируемые кардиопротективные препараты?
- Реваскуляризация дает максимально возможный защитный эффект?
- Некорректный дизайн клинических исследований?
- Эксперименты на животных не могут быть экстраполированы на клиническую практику?
- Сопутствующие заболевания нивелируют кардиопротективные эффекты препаратов?

Принципы доказательной медицины в доклинической сфере – путь к решению проблемы?

- Национальный институт здоровья США в 2011 г. создал Консорциум для доклинической оценки новых кардиопротективных воздействий (Consortium for Preclinical AssESsment of CARdioprotective Therapies (CAESAR));
- **Цель – преодоление трансляционных барьеров в кардиопротекции, получение воспроизводимых данных, обоснование проведения клинических исследований;**
- Четыре крупных научных учреждения проводят рандомизированные, слепые, статистически обоснованные экспериментальные исследования;
- Новые воздействия тестируются на трех видах животных (наркотизированные мыши, бодрствующие кролики и свиньи);
- Веб-сайт: www.nihcaesar.org



Организационная структура Консорциума НИИ для доклинической оценки кардиопротективных воздействий



Текущие проекты Консорциума NIH CAESAR по оценке эффективности кардиопротективных воздействий

Фактор/воздействие	Эффект	Публикация
Ишемическое прекондиционирование	+	Jones et al. Circ Res. 2015; 116: 572-86.
Нитрит натрия	-	Lefer et al. FASEB J., 2014; 28: LB645
Силденафил	-	Kukreja et al. FASEB J., 2014; 28: LB650
Пароксетин	Текущее исследование	Нет
Хлорамфеникола сукцинат	Текущее исследование	Нет
Модифицированный протеин С (АРС 3К3А)	Текущее исследование	Нет
Вещество G-1	Текущее исследование	Нет

Пути повышения качества экспериментальных исследований

- Использование чеклистов и рекомендаций
- Использование систематических обзоров и мета-анализов
- Статистическое обоснование размера выборки и подробное описание статистических методов до начала исследования; неприменимость избирательного статистического анализа
- «Обратная трансляция» неудачных клинических исследований
- Изменение политики грантодающих фондов, редакций журналов, администрации учреждений

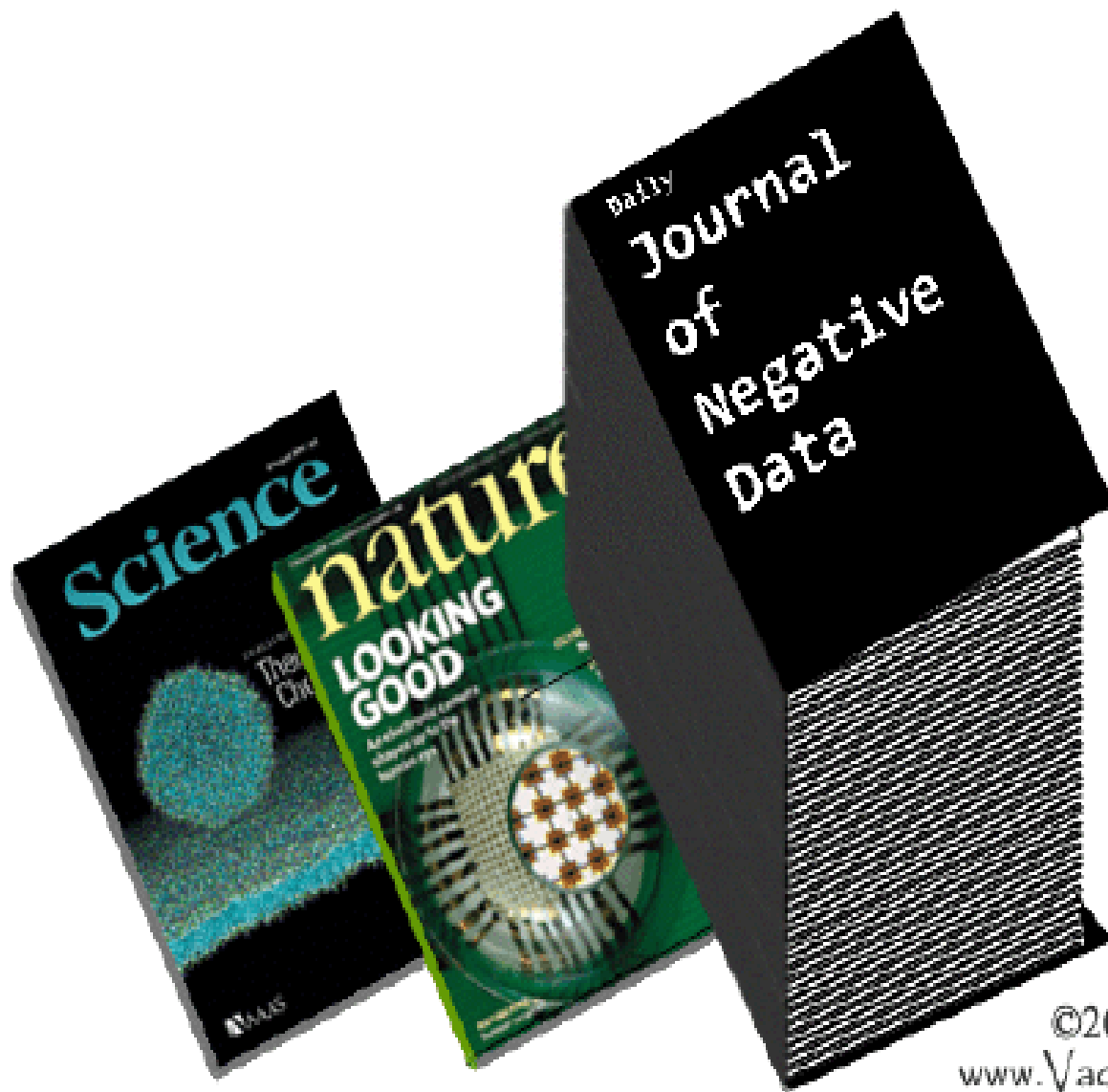
A Gold Standard Publication Checklist to Improve the Quality of Animal Studies, to Fully Integrate the Three Rs, and to Make Systematic Reviews More Feasible

Carlijn R. Hooijmans, Marlies Leenaars and Merel Ritskes-Hoitinga

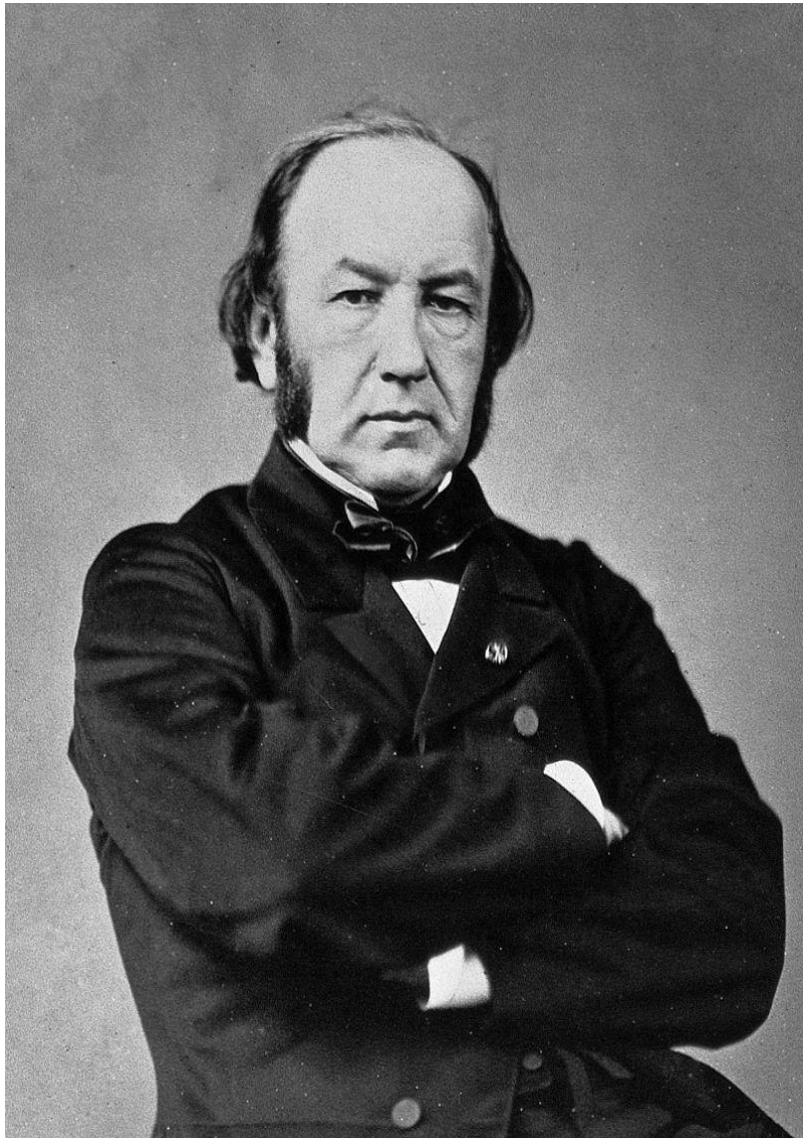
Radboud University Nijmegen Medical Centre, Central Animal Laboratory and 3R Research Centre, Nijmegen, The Netherlands

Роль редакций журналов

- Обязательное использование чеклистов и рекомендаций
- Создание стимулов, вознаграждающих **качество** научных исследований
- Поддержка публикаций, направленных на валидацию реактивности и экспериментальных методик и построенных по принципам надлежащей лабораторной практики
- Осторожность при рассмотрении рукописей, в которых приводится большое количество экспериментов с значимым результатом
- Поддержка в публикации «повторительных» исследований
- Принятие решения о судьбе рукописи на основе количественных критериев (баллы)



©2008 VP
www.Vadlo.com



“...Искусство получения точных фактов среди бесчисленных источников ошибок, связанных с патологическим состоянием, вивисекцией и употреблением инструментов разного сорта, - это искусство ... носит название экспериментирования и составляет в некотором роде исполнительную часть экспериментального метода”

Клод Бернар