

Рекомендации для авторов журнала «Безопасность и риск фармакотерапии» по описанию исследований на животных (подготовлены на основе руководства ARRIVE ^{1,2})

Выполнение этих рекомендаций позволит читателям и рецензентам убедиться в достоверности результатов исследования

Раздел	Необходимая информация	Примеры
РЕЗЮМЕ	Точно и кратко опишите: ВВЕДЕНИЕ. Что явилось предпосылкой для исследования? ЦЕЛЬ. Какая поставлена цель исследования? МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Каких видов, линий, пород и полов были животные? Какие ключевые методы применялись в рамках исследования? РЕЗУЛЬТАТЫ. Какие основные результаты получены (конкретные, с цифрами)? ВЫВОДЫ. Какие сделаны выводы?	См. шаблон оригинальной статьи

¹ <https://arriveguidelines.org/>

² <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.3000411>

РЕГИСТРАЦИЯ ПРОТОКОЛА ИССЛЕДОВАНИЯ		Был ли протокол исследования (включая гипотезу, ключевые особенности дизайна и план анализа) подготовлен до исследования? Был ли он зарегистрирован? Если да, то где?	Подробное описание всех протоколов доступно в рамках инициативы Registered Reports (Kandela et al., 2015). Дополнительная информация об экспериментах, данных и анализе доступна на сайте Open Science Framework (OSF) (RRID: SCR_003238) (https://osf.io/xu1g2/).
КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ		Какие у исследования были источники финансирования (перечислите все, укажите номера грантов)? Какую роль играли спонсоры в разработке дизайна, в анализе и в подготовке отчетов об исследовании?	При проведении исследования была получена спонсорская поддержка от компании Gubra ApS в виде материалов и заработной платы (авторы А.А., Б.Б., В.В., Г.Г. и Д.Д. работают в Gubra ApS, а Е.Е. и Ж.Ж. являются владельцами компании).
ФИНАНСИРОВАНИЕ		Какие у исследования были источники финансирования (перечислите все, укажите номера грантов)? Какую роль играли спонсоры в разработке дизайна, в анализе и в подготовке отчетов об исследовании?	Исследование проводилось при поддержке Министерства здравоохранения Италии: средства на ведение научно-исследовательской деятельности выделены автору 3.3. (PRC 2010/001, www.salute.gov.it). Финансирующая организация не принимала участия в разработке дизайна исследования, сборе и анализе данных, принятии решения о публикации или подготовке рукописи.
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	Лабораторные животные	Какие использовались животные (вид, линия/порода, пол, возраст/стадия развития, масса (при необходимости))?	Было использовано 119 самцов мышей линий C57BL/6OlaHsd (n = 59) и BALB/c OlaHsd (n = 60); обе линии получены от компании Harlan, Нидерланды. На момент проведения испытания «Приподнятый крестообразный лабиринт» возраст мышей составлял 13 недель, масса тела — $27,4 \pm 0,4$ г и $27,8 \pm 0,3$ г, соответственно (среднее значение $\pm$ среднеквадратическое отклонение).

	Условия размещения и содержания животных	Какие были условия размещения и содержания животных (комфортная или депривационная среда)? Было ли обогащение среды содержания животных?	Однополых животных из одного помета размещали вместе, по 2 или 4 штуки, в клетках с индивидуальной системой вентиляции. Всех мышей содержали при обычном цикле освещения (12 ч день и 12 ч ночь) со свободным доступом к пище (корм 7012 Harlan Teklad LM-485) и воде. В качестве подстилки использовали измельченные кукурузные початки. Для обогащения среды в клетки помещали материал для гнездования (Nestlets, Ancare, Bellmore, NY, USA), трубки из ПВХ и домики (Refuge XKA-2450-087, Ketchum Manufacturing Inc.). Животных содержали в исключаяющих проникновение специфических патогенов условиях в Центре работы с трансгенными мышами Корнельского университета, аккредитованном Международной ассоциацией оценки и аккредитации лабораторных исследований на животных.
	Гуманное содержание животных	Какие меры принимались для сокращения боли, страданий и дистресса (например, использование обезболивания, пути и схемы введения (с обоснованием выбора))? Как это отражено в протоколе эксперимента (и какие потребовались модификации)?	За час до операции мышам давали съесть 1 мг бупренорфина (Schering-Plough Europe) на 1 кг массы тела, смешанный с ореховой пастой Nutella. Мышей приучали к ореховой пасте без анальгетика в течение 2 дней до операции.

	Дизайн исследования	Кратко опишите дизайн исследования для каждого эксперимента, в том числе: Какие сравнивались группы? Была ли контрольная группа? Если нет, то почему?	Исследование DAV1 — однофакторное двухпериодное перекрестное исследование, в котором 16 поросят перорально получали амоксициллин в дозе 30 мг/кг или плацебо в 1-м периоде и только амоксициллин во 2-м периоде. Пробы для определения концентрации амоксициллина в плазме крови брали в одно и то же время в каждом из периодов: 0,5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 ч после введения препарата (плацебо).
		Что считалось экспериментальной единицей для статистического анализа (одно животное, помет, клетка)?	Рыб разделили на 2 группы в зависимости от веса (0,7–1,2 г и 1,3–1,7 г) и случайным образом распределили по 24 пластиковым аквариумам с 60 л воды (по 15 рыб на экспериментальную единицу).
	Размер выборки	Сколько точно экспериментальных единиц (<i>n</i>) было в каждой группе на момент начала исследования, в каждом эксперименте, и в исследовании в целом?	Изначально в группах было по 12 животных, но у некоторых развились опухоли, не связанные с исследуемым препаратом, и животные были исключены из эксперимента.
		Как принималось решение о размере выборки? Подробно опишите все предварительные расчеты размера выборки, если они проводились.	Было решено использовать небольшую выборку, так как в данном исследовании прототип биостекла для восстановления костей оценивался <i>in vivo</i> впервые, и целью было собрать первоначальные данные об использовании этого биоматериала в эксперименте со сложным дизайном.

	Критерии включения и невключения	По каким критериям животных или экспериментальные единицы включали или не включали в исследование при проведении эксперимента? Были ли критерии включения и невключения установлены заранее? Если нет, укажите, что не были. Если работали с данными, полученными для других целей, следует указать при описании критериев включения и невключения, как отбирали данные для анализа.	В исследование включали животных, перенесших окклюзию средней мозговой артерии (снижение мозгового кровотока) на $\geq 60\%$, подтвержденное с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. Животных исключали, если введение нити приводило к перфорации стенки сосуда, силиконовый наконечник нити смещался во время извлечения, или животное преждевременно погибало (и было невозможно собрать данные гистологии и оценить поведение).
		Были ли животные, экспериментальные единицы или данные, которые не учитывались в итоговом анализе? Если да, то почему? Если нет, укажите, что нет.	Экспериментальной единицей считался загон. Данные по одному загону были исключены из анализа как выброс, поскольку телята в этом загоне плохо росли как до, так и во время получения рактопамина гидрохлорида, из-за болезни, не связанной с исследуемым веществом. Данные считали выбросом, если расстояние Кука (D) было больше 0,5. Данные одного теленка были признаны выбросом по результатам биопсии печени на 48-й сут.
		Сколько точно экспериментальных единиц (<i>n</i>) учитывалось в итоговом анализе в каждой экспериментальной группе?	В 2010 году в группе F было 29 взрослых самцов и 58 взрослых самок (<i>n</i> = 87), а в 2011 году 32 взрослых самца и 66 взрослых самок (<i>n</i> = 98). Увеличение численности связано со взрослением молодых особей. Шесть макак среднего и низкого ранга умерли и были исключены из анализа, как и пять самцов среднего ранга, которые покинули группу в начале 2011 года.

	Рандомизация	Проводилась ли рандомизация при распределении экспериментальных единиц в контрольную и экспериментальную группы? Если да, какой метод для нее использовался?	Животных рандомизировали после перенесенной хронической ишемии/реперфузии с помощью компьютерного генератора случайных последовательностей.
		Какая применялась стратегия минимизации потенциальных искажающих факторов (например, очередность ведения исследуемого препарата или проведения измерений, расположение животного или клетки с животными)? Если эти факторы не контролировались, укажите это.	Быков разделили по весу на 4 блока по 905 животных, а затем животных из каждого блока случайным образом распределили на 4 группы лечения в рамках полностью рандомизированного блочного дизайна. Животных из полученных групп распределили по 20 загонам (181 бык в загоне, 5 загонов на вариант лечения).
	Ослепление данных	Кто из исследователей знал, как животные распределялись по группам, на разных этапах эксперимента (во время распределения по группам, проведения эксперимента, оценки результатов и анализа данных)?	Поскольку у животных развивались приступы, скрыть от специалиста, проводившего эксперимент, получило животное пилокарпин или физиологический раствор, было невозможно.

	Экспериментальные процедуры	Максимально подробно опишите процедуры, которые проводились в каждой экспериментальной группе, включая контрольную, чтобы можно было их воспроизвести, в том числе: Что и как делали (какими методами)?	Для получения модели алиментарного ожирения восьминедельным самцам мышей на 15 недель предоставляли свободный доступ к питьевой воде и стандартному корму (нормальная жирность, 10,9 кДж/г) или корму, имитирующему модель питания развитых стран (повышенная жирность; 22 кДж/г; 42% ккал из жиров, 43% из углеводов и 15% из белков.
		Когда и как часто?	Артериальное давление, частоту сердечных сокращений, насыщение крови кислородом и объем кровопотери регистрировали каждые 5 минут. Образцы крови брали до травмы, сразу после травмы, а также через 30 и 60 минут.
		Где (включая подробную информацию о периодах акклиматизации)?	Рыб содержали по отдельности в течение 1 недели, а затем в течение 2 дней на 20 минут помещали в непрозрачную емкость для адаптации шириной 20 см, высотой 15 см и длиной 30 см с 2,5 л аквариумной воды. На стенки на каждом конце емкости были нанесены пятна или полосы.
		С какой целью (обоснуйте необходимость процедуры)?	Из-за очень маленького диаметра хвостовых вен у мышей при внутривенных инъекциях ¹⁸ F-ФДГ в хвостовую вену часто встречается частично паравенозное введение. Поскольку это могло бы существенно исказить результаты сравнения биораспределения ¹⁸ F-ФДГ, для своего эксперимента по оценке влияния обращения с животными на биораспределение ¹⁸ F-ФДГ мы решили использовать внутрибрюшинное введение.

	Критерии оценки	Какие именно показатели оценивали (например, гибель клеток, молекулярные маркеры, изменения поведения)?	Оценивали внутрипузырное давление непосредственно перед мочеиспусканием и сразу после мочеиспускания, наибольшее внутрипузырное давление во время мочеиспускания, емкость мочевого пузыря (объем физраствора, необходимый для начала мочеиспускания), соотношение емкости мочевого пузыря и давления перед мочеиспусканием, и частоту сокращений при мочеиспускании и без него.
		Если речь об исследовании для проверки гипотезы, какая была первичная конечная точка?	Первичным конечным результатом этого исследования была оценка работы передних конечностей в лестничном тесте, а вторичными — способность удерживаться на вращающемся барабане, степень повреждения мозга (МРТ или гистология), результаты картирования нейронных связей (диффузионно-тензорная МРТ), оценка плотности нейронов и микроглии (гистология), и фагоцитарная активность.
	Методы статистического анализа	Какие статистические методы использовали для каждого анализа? Какое программное обеспечение?	Дисперсионный анализ проводили с помощью обобщенной линейной модели в программе SAS (SAS Inst., Cary, NC). В модели учитывали эффекты блока и рациона (5 рационов). Данные корректировали с учетом начальной массы тела. Результаты представлены как средние значения, полученные методом наименьших квадратов. Уровень значимости — $P < 0,05$.

		Какие методы применяли для оценки соответствия данных допущениям, принимаемым при моделировании? Что было сделано в случае несоответствия?	Допущения, принимаемые при моделировании, проверяли с помощью критериев Шапиро—Уилка (нормальность распределения) и Левене (однородность независимых выборок), а также путем визуального анализа графика зависимости остатков модели от подогнанных значений. Для некоторых переменных ответа потребовалось преобразование с помощью натурального логарифма, квадратного или кубического корня, но для визуализации значимых эффектов функции были преобразованы обратно.
		Какие еще характеристики лабораторных животных важны для исследования (условия получения животных, состояние их здоровья, иммунный статус, наличие генетических модификаций, генотипы, проводившиеся ранее процедуры)?	Мыши C57BL/6J (Jackson Laboratory) были получены от компании Charles River Laboratories, C57BL/6J0laHsd (Harlan) — от компании Harlan. Мыши конгенной линии на основе C57BL/6JCrI (возвратное скрещивание в 12 поколениях) с нокаутом по α -синуклеину были предоставлены профессором ... (Университет Кардиффа, Великобритания).
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	Результаты	По каждому проведенному эксперименту, включая независимые повторности, опишите: Какие сводные/описательные статистические данные получены для каждой экспериментальной группы? В соответствующих случаях укажите меру вариабельности (например, среднее значение и стандартное отклонение или медиану и размах).	Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, в скобках указан диапазон.

		Какой наблюдался размер эффекта? С каким доверительным интервалом?	Для всех черт, на которые значительно влиял генотип мышей линии <i>Usp47^{tm1b(EUCOMM)Wtsi}</i> (MGI:5605792), на рисунке представлен стандартизированный эффект генотипа с 95% ДИ для животных каждого из полов (без поправки на множественные сравнения). Статистически значимые оценки влияния генотипа на определенную черту выделены красным цветом.
	Интерпретация и научное значение результатов	Интерпретируйте результаты, принимая во внимание свои задачи и гипотезы, современную теоретическую базу и другие опубликованные исследования по теме.	Новый аппарат позволяет значительно снизить количество животных, используемых для выявления потери памяти на фоне приема лекарственных препаратов, с сохранением статистической мощности. За последние 5 лет для таких исследований понадобилось около 43 000 животных, но с применением аппарата, по нашим оценкам, это количество можно было бы сократить до 26 000.
		Какие ограничения существуют для проведенного исследования (включая потенциальные источники систематических ошибок, ограничения животной модели и неточность результатов)?	Во-первых, разработанная в ходе исследования фармакологическая модель воспаления не позволяет отличить действие прямой стимуляции рецепторов TLR9 в сердце от непрямых эффектов системного воспаления. Во-вторых, хотя некоторые системные воспалительные заболевания характеризуются нарушениями в системе врожденного иммунитета, а некоторые, в свою очередь, характеризуются нарушениями сигнализации через TLR9 <...> устойчивая стимуляция TLR9 не обязательно представляет собой клинически значимое воспалительное состояние.

	Возможность экстраполяции результатов	Можно ли распространить результаты этого исследования на другие виды животных или другие экспериментальные условия и как именно? Актуальны ли результаты с точки зрения биологии человека (в соответствующих случаях)?	Ранее сообщалось о супрессорной активности Gas1 в культурах клеток или в моделях опухолевых ксенотрансплантатов, однако это первая работа, в которой показана супрессорная активность мышиногo Gas1 в отношении первичных опухолей <i>in vivo</i> . Последние достижения в разработке безопасных векторов для доставки трансгенов <...> могут способствовать экстраполяции полученных нами результатов на человека, и таким образом сформируется перспективное направление для исследований в области опухолевых заболеваний печени.
ЗАЯВЛЕНИЕ О СОБЛЮДЕНИИ ЭТИЧЕСКИХ ПРИНЦИПОВ		Одобрил ли комитет по этике (или аналогичный орган) использование животных в исследовании? Какой? Предоставьте номера соответствующих разрешений или протоколов (если предусмотрены). Если этическое одобрение не запрашивалось или не было получено, объясните, почему.	Все процедуры проводились в соответствии с Законом Великобритании о проведении научных процедур с использованием животных от 1986 года. Исследование было одобрено комитетами по гуманному и этичному обращению с животными в Alderley Park и Babraham Institute (получены разрешения № 40/3729 и 70/8307).
ДОСТУП К ДАННЫМ		Доступны ли данные исследования для ознакомления? Если да, то как получить доступ?	Доступ к данным: все данные размещены в репозитории Figshare и доступны по ссылке http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1288935