

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЖИВОТНЫХ В ЭПОХУ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ. КАКИМИ ИМ БЫТЬ?

Александров И. В.¹, Егорова Е. И.¹, Васина Е. Ю.^{1,2},
Новиков В. К.¹, Матыко П. Г.¹, Галагудза М. М.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский
центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова»
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация

Галагудза Михаил Михайлович
ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Пархоменко, д. 15 лит. Б, Санкт-
Петербург, Россия, 194156.
E-mail: galagudza@almazovcentre.ru

*Статья поступила в редакцию 05.03.2017
и принята к печати 17.05.2017.*

Резюме

В настоящее время лабораторные животные используются в биомедицинских исследованиях для проверки гипотез о патогенезе заболеваний, поиска новых мишеней для фармакотерапии, доказательств механизма действия, доказательств эффективности и подтверждения безопасности новых лекарств. Однако результаты исследований при сложившейся практике их планирования и выполнения не всегда обеспечивают достаточный уровень доказательности для перехода к выполнению клинических исследований. Ключевыми понятиями, позволяющими обеспечить анализ сложившейся ситуации и наметить пути выхода из кризиса, являются понятия внутренней и внешней валидности, а также систематической ошибки. В настоящем обзоре кратко рассмотрены основные виды систематических ошибок, снижающих валидность экспериментальных исследований.

Инструментами, способствующими повышению трансляционного потенциала экспериментальных исследований, являются систематические обзоры и мета-анализы, международные рекомендации и проверочные списки, а также «обратная» трансляция неудачных клинических исследований.

Рекомендации и чеклисты, помогающие исследователям оценить соответствие планируемых и проводимых исследований «золотому стандарту», должны внедряться на различных уровнях, начиная с подготовки кадров, грантодающих организаций, комиссий по биоэтике и редакций научных журналов.

Предварительная регистрация экспериментальных работ и обеспечение доступа широкого круга исследователей к первичным данным после публикации результатов позволят сделать процесс проведения исследований более открытым и, следовательно, объективным.

Предложенные подходы могут способствовать преодолению кризиса транслируемости результатов экспериментальных исследований в практику и возвращению доверия широких кругов общественности к результатам экспериментальных биомедицинских исследований.

Ключевые слова: экспериментальные исследования, лабораторные животные, трансляционная медицина, систематические ошибки, внутренняя и внешняя валидность, систематические обзоры, мета-анализы.

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2017; 4(2): 52–70.

ANIMAL EXPERIMENTS IN THE ERA OF TRANSLATIONAL MEDICINE. WHAT WOULD THEY BE?

Aleksandrov I. V.¹, Egorova E. I.¹, Vasina E. Yu.^{1,2}, Novikov V. K.¹,
Matyko P. G.¹, Galagudza M. M.^{1,2}

¹ Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg,
Russia

² Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Mikhail M. Galagudza
Federal Almazov North-West Medical
Research Centre
Parkhomenko str. 15-B, Saint Petersburg,
Russia, 194156
E-mail: galagudza@almazovcentre.ru

Received 05 March 2017; accepted 17 May
2017.

Abstract

Currently, laboratory animals are used in biomedical research to test hypotheses about the mechanisms of development and progression of the diseases, to search the new targets for pharmacotherapy, to test the safety and efficacy of new drugs. However, the results of experimental studies, with the established practice of their planning and performing, do not provide a sufficient level of evidence to go to performance of clinical trials. Key concepts, that allow the analysis of the current situation and outline the way out of the crisis, are the concepts of internal and external validity and bias. This review briefly describes the main types of systematic errors that reduce the validity of experimental research. Tools, that improve the translational potential of experimental studies, are systematic reviews and meta-analyzes, international guidelines and checklists, as well as the «reverse» translation of failed clinical trials. Guidelines and checklists that help researchers to assess the compliance of the planned and ongoing research to «gold standard», should be implemented at various levels, starting with the grantmaking organizations, bioethics committees and editorial boards of scientific journals. Pre-registration of experimental works and access of a wide range of researchers to the primary data after publication should make the research process more open and therefore objective. The above approaches might help to overcome the crisis of translatability of experimental results in practice and regain the trust of the general public to the results of biomedical experimental studies.

Key words: experimental studies, laboratory animals, translational medicine, systematic errors, internal and external validity, systematic reviews, meta-analyzes

For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2017; 4 (2): 52–70.

Введение

Использование лабораторных животных для изучения физиологических процессов и моделирования заболеваний человека сформировало фундамент современной экспериментальной медицины. В настоящее время животные используются в биомедицинских исследованиях для тестирования гипотез о патогенезе заболеваний, поиска новых мишеней для фармакотерапии, тестирования безопасности и эффективности новых лекарств. В основе использования животных в исследовательской

практике лежит положение о том, что результаты, полученные на экспериментальных моделях, при успешных результатах клинических исследований в дальнейшем могут быть перенесены на клиническую практику. В последние несколько десятилетий данное положение, ранее казавшееся незыблемым, стало подвергаться серьезной критике. Накапливается все больше данных о том, что результаты тестирования новых методов терапии на животных обладают низкой прогностической ценностью в отношении эффективности этих методов в кли-

нических исследованиях. Особенно наглядно свидетельствует о кризисе транслируемости данных преклинических исследований в клинику ситуация в области нейропротективной терапии при ишемическом инсульте. Так, в экспериментальных исследованиях к настоящему времени доказана нейропротективная эффективность более 1000 соединений/воздействий, ни одно из которых не показало убедительного эффекта в клинических исследованиях [1]. Проблема низкой трансляции особенно очевидна при получении негативных результатов II и III фаз клинических исследований [2]. По некоторым оценкам, 80-85% лекарств с доказанной эффективностью у животных оказываются неэффективными у человека, а 30% лекарств, успешно прошедших тестирование безопасности в доклинических исследованиях, обладают побочными эффектами у человека [3]. Помимо очевидных различий устройства организмов человека и животных, причиной этого может являться сложившаяся практика планирования и выполнения экспериментов в целом, что не обеспечивает достаточного уровня доказательности для перехода к выполнению клинических исследований.

Низкий коэффициент транслируемости экспериментальных исследований порождает две основные проблемы — этическую и экономическую. Этическая проблема состоит в том, что продолжающееся активное использование животных в биомедицинских исследованиях не приводит к появлению пропорционального количества новых методов диагностики и терапии социально значимых заболеваний. В 2009 г. в журнале *Lancet* был опубликован обзор, в котором было подсчитано, что 85% фундаментальных и клинических биомедицинских исследований фактически оказываются невостребованными вследствие ошибочного дизайна, отсутствия публикации и неадекватного представления данных [4]. Это приводит к потере 100 млрд. долларов США в год из средств, ассигнованных на исследования. Существенной проблемой является отсутствие воспроизводимости результатов, которое отмечается в 51-89% случаев, что также приводит к существенным экономическим убыткам [5]. Нередко результаты не могут быть воспроизведены самими авторами работы, например, если они повторяют тот же эксперимент, но с применением ослепления (маскирования вмешательства) [6]. Воспроизводимость зависит от двух ключевых факторов: 1) точного и подробного описания всех ключевых параметров, влияющих на исход исследования, а также деталей экспериментальной модели и вмешательства, 2) открытого доступа к первичным данным и использованным протоколам и методикам.

Несмотря на огромный прогресс технологий, затраты времени и финансовых средств на создание новых лекарственных препаратов постепенно увеличиваются. Для получения разрешения на клиническое применение и вывод препарата на рынок необходимо почти 15 лет [7] и сумма около 1,3 млрд. долларов США [8]. Существует множество различных объективных и субъективных факторов, которые могут лежать в основе низкой транслируемости результатов экспериментов на животных в клинику. Ключевыми понятиями, позволяющими обеспечить анализ сложившейся ситуации и наметить пути выхода из кризиса, являются понятия внутренней и внешней валидности, а также систематической ошибки. Под валидностью в данном контексте следует понимать обоснованность и пригодность применения методик и результатов исследования в конкретных условиях. В настоящем обзоре кратко рассмотрены основные виды систематических ошибок, снижающих валидность. Также приведены данные о различных организационных и методических подходах, направленных на повышение пригодности результатов экспериментальных исследований к дальнейшему использованию. В частности, освещена роль систематических обзоров и мета-анализов, различных шкал и проверочных списков для оценки качества публикаций, статистических подходов, «обратной» трансляции результатов неудачных клинических исследований, а также роль грантодающих фондов и редакций журналов в обеспечении соблюдения этих правил.

Внутренняя и внешняя валидность в экспериментальных исследованиях

Понятия внутренней и внешней валидности являются ключевыми в области анализа трансляционного потенциала экспериментальных исследований. Под внутренней валидностью обычно понимают степень снижения систематических ошибок за счет использования правильного дизайна исследования, надлежащего выполнения исследования и адекватного анализа данных. Чем выше внутренняя валидность исследования, тем выше вероятность, что полученное в эксперименте изменение исследуемого параметра вызвано именно тестируемым воздействием, а не иными неконтролируемыми факторами.

Например, в эксперименте по оценке нейропротективной эффективности вещества «X» максимальная внутренняя валидность будет наблюдаться в случае, когда уменьшение размера инфаркта головного мозга в подопытной группе вызвано исключительно влиянием тестируемого вещества, а не иными факторами (различными характеристиками животных в контрольной и подопытной

Таблица 1. Систематические ошибки, влияющие на внутреннюю валидность эксперимента, и способы их уменьшения [9]

Тип ошибки	Определение	Путь уменьшения ошибки
Ошибка отбора (selection bias)	Неслучайное распределение животных в группы	Рандомизация; сокрытие порядка отнесения животного к той или иной группе
Ошибки, связанные с ходом исследования (performance bias)	Систематическая ошибка в уходе за животными разных групп	Ослепление (включая вспомогательный персонал)
Ошибки детекции (detection bias)	Систематическое искажение результатов исследования, связанное с тем, что исследователь, оценивающий исходы, знает принадлежность животного к той или иной группе	Ослепление
Ошибки, связанные с отсевом (attrition bias)	Неодинаковая частота возникновения отклонений от протокола и отсутствие тактики в таких случаях	Ослепление

группах, различными условиями их содержания, различной техникой моделирования ишемии головного мозга, подсознательным или сознательным занижением размера инфаркта при планиметрическом анализе и пр.).

При этом наиболее часто на внутреннюю валидность эксперимента влияют 4 типа систематических ошибок: 1) ошибки отбора, 2) ошибки, связанные с отсевом, 3) ошибки, связанные с ходом исследования, 4) ошибки детекции [9]. В последующих разделах будут рассмотрены примеры влияния различных систематических ошибок на внутреннюю валидность эксперимента.

Внешняя валидность характеризует соответствие исследования изучаемой объективной реальности. Применительно к экспериментальным исследованиям, внешняя валидность подразумевает возможность воспроизведения результатов исследования в условиях одной или нескольких лабораторий, а также возможность экстраполяции данных, полученных на одном виде животных, на другие биологические виды, включая человека. Внешняя валидность во многом определяется характеристиками модели заболевания [10, 11]. Считается, что «идеальная» модель заболевания человека на животном должна удовлетворять следующим критериям: 1) сходная генетическая основа (в случае, если речь идет о биомодели), 2) сходство исходных анатомо-физиологических характеристик лабораторного животного и человека, 3) сходный механизм развития (патогенез) заболевания, 4) сходные фенотипические проявления, включая биохимические, функциональные и морфологические признаки, 5)

наличие терапевтического эффекта от применения известных лекарств. Парадоксальным образом, повышение внутренней валидности экспериментов за счет использования максимально стандартизированных выборок животных, например, линейных животных или животных, свободных от специфической микрофлоры, может способствовать снижению внешней валидности, то есть применимости полученных данных к гетерогенной популяции пациентов. В связи с этим для повышения внешней валидности исследований на животных в последнее время рекомендовано использование животных разных возрастных групп и пола, а также животных с сопутствующей патологией [12, 13].

Разновидности систематических ошибок

Систематическая ошибка (англ. bias) — это ошибка или погрешность, стабильно искажающая истинные значения результата. При систематических ошибках всегда имеет место либо увеличение, либо уменьшение результата измерения. Основное отличие систематической ошибки от случайной состоит в том, что систематические ошибки не могут быть устранены за счет увеличения размера выборки. В биомедицинских исследованиях были описаны 235 различных типов систематических ошибок [14]. Внутренняя валидность может снижаться под влиянием четырех типов систематических ошибок, которые рассмотрены ниже (табл. 1).

Ошибки отбора

Ошибки отбора возникают в том случае, когда между группами животных имеются значимые

исходные различия. Для их выявления могут быть использованы следующие контрольные вопросы: «Являются ли исходные (стартовые) параметры во всех группах одинаковыми? Могут ли различия, полученные в результате эксперимента, быть связаны с различием в исходных параметрах, а не с эффектом тестируемого воздействия?» Примеры факторов, которые должны быть одинаковыми в группах, являются пол животных, возраст, масса тела, условия содержания, источник и дата поступления и пр. В последнее время к стандартным параметрам, характеризующим качество лабораторных животных, добавился количественный и качественный состав кишечного микробиома. Существуют обоснованные предложения о включении данных о составе кишечной микробиоты в гигиеническую стандартизацию у лабораторных животных. Это связано с тем, что мыши одной и той же линии, полученные из разных питомников, имеют различный состав кишечной микрофлоры [15]. В свою очередь, состав кишечного и кожного микробиома оказывает существенное влияние на фенотип как у обычных лабораторных животных, так и у генетически модифицированных мышей [16, 17].

Важнейшими приемами, способствующими уменьшению ошибок отбора, являются рандомизация и сокрытие порядка отнесения животных к той или иной группе. При правильной рандомизации различия между группами сводятся к случайной ошибке [18]. Доказано, что результаты рандомизированных и нерандомизированных исследований отличаются, то есть рандомизация уменьшает систематическую ошибку [19]. Способность рандомизации уменьшать вклад известных и неизвестных искажающих факторов снижается по мере уменьшения размеров выборки. В большинстве своем эксперименты на животных характеризуются относительно небольшими группами ($n=5-10$). Поэтому необходимо стимулировать применение более сложных методов рандомизации, например, блоковой или стратифицированной. Наилучшим методом рандомизации является использование генераторов случайных чисел. Даже использование гомогенных популяций животных не является основанием для невыполнения рандомизации. Так, индивидуальные различия у линейных мышей могут быть выше в пределах одной линии, чем у животных разных линий. По данным Международного консорциума по фенотипированию мышей (International Mouse Phenotyping Consortium, IMPC), одна и та же линия в зависимости от условий содержания может иметь существенные фенотипические различия [20].

Ошибки отбора также могут возникать в случае отсутствия или недостаточно четкой формулировки

критериев включения. Они должны быть сформулированы до начала исследования. Критерии исключения имеют особенно важное значение при выполнении хирургических экспериментов, поскольку в ходе хирургического вмешательства даже при наличии достаточного уровня подготовки хирурга возможно отклонение физиологических параметров от нормы различной степени выраженности. В настоящее время рандомизация и сокрытие порядка отнесения животных к той или иной группе описываются менее чем в 30% публикаций. Рандомизация была описана в 29% исследований, сокрытие порядка отнесения животных к той или иной группе — в 15% исследований, ослепление при оценке исходов — в 35% исследований [21]. Еще в одном анализе, в который вошло 271 исследование, было показано, что рандомизация была упомянута в тексте статьи в 12% работ, а подробное описание метода рандомизации присутствовало лишь в 9% публикаций [22]. Отсутствие рандомизации, сокрытия порядка отнесения животных к той или иной группе и ослепления сопровождаются увеличением выраженности эффекта тестируемого воздействия. Суррогаты рандомизации, например, «случайный» отбор животных из клетки, нельзя рассматривать как истинную рандомизацию.

Ошибки, связанные с выполнением 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 [23]. Примеры факторов, которые могут приводить к формированию ошибки, связанной с выполнением исследования, включают разные типы клеток, разный корм, подстил, разную частоту приручения, разный уровень освещенности, температуры, шума, разную технику выполнения хирургической модификации животных и пр. Примером ошибки, связанной с выполнением исследования, является различная методика выполнения эксперимента и разная техника обращения с животными. Например, различная техника захвата животного может приводить к разной степени выраженности стресса у мышей [24]. В последние годы обнаружены достаточно курьезные факторы, оказывающие влияние на исход экспериментов в ходе их выполнения. Так, при обонятельном контакте лабораторных грызунов с самцами животных, а также с мужчинами-экспериментаторами и лаборантами, у них повышается уровень стресса и развивается стресс-опосредованная аналгезия [25].

Пути снижения систематической ошибки, связанной с выполнением исследования, включают случайное размещение животных в комнате содержания, ослепление персонала по уходу за животными и исследователей относительно того, какое вмешательство выполнялось каждому животному. Ослепление считается полным в том случае, если не только исследователь, но и весь прочий персонал, вовлеченный в эксперимент (лаборанты viva-рия, статистики), не имеют доступа к данным о том, к какой группе относится то или иное животное.

Ошибки, связанные с выявлением исхода

Данный тип ошибок возникает при неодинаковом подходе к оценке исходов исследования. Лица, оценивающие исходы, должны быть ослеплены относительно принадлежности животных к той или иной группе. Отсутствие ослепления исследователя, оценивающего исходы, приводит к увеличению степени различия между группами [26]. Для более объективных конечных точек (например, гибель животного) риск ошибки, связанной с выявлением исхода, минимален. Для других, особенно полуколичественных, конечных точек (например, гистологическая картина, степень активности животного), риск очень велик. Кодировка групп должна полностью исключать представление о характере воздействия. Например, недостаточно обозначать группы А и В, так как тенденция, отмеченная в начале оценки исходов в группе А, может оказать влияние на последующие процедуры оценки исходов в той же группе.

Ошибки отсева

Возникают при неодинаковых подходах к исключению животных из экспериментальных групп. Проблема заключается в том, что исход не фиксируется для всех животных, которые были рандомизированы в группу. Необходимо указывать, какое количество животных выбыло из эксперимента и по какой причине (гибель, соответствие критериям исключения и пр.). Рекомендуется также использовать такие конечные точки, которые в меньшей степени страдают от ошибок отсева. 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 представления данных

Данный тип ошибки возникает в том случае, когда авторы приводят не все результаты, которые

предусматривалось получить согласно описанию дизайна эксперимента и его конечных точек в разделе «Материалы и методы». Это может быть связано с невозможностью анализа данных, их полной или частичной утратой, а также субъективным нежеланием авторов представлять отрицательные результаты либо результаты, которые не укладываются в формат основной гипотезы исследования.

Ошибки вследствие формирования пула неопубликованных данных

Согласно имеющимся оценкам, лишь около 50% данных, полученных в исследованиях на животных, оказываются опубликованными в академической научной среде. В индустрии публикуется лишь 10% данных [27]. Это приводит к формированию значимого трансляционного барьера. Рекомендуется публиковать все результаты независимо от исходов. При этом редакции журналов должны создавать привлекательные условия для авторов публикаций, описывающих отрицательные результаты или результаты, не подтверждающие рабочую гипотезу исследования.

Систематические обзоры и мета-анализы

Систематический обзор — это обзор литературы, направленный на поиск ответа на конкретный вопрос, и состоящий в поиске, критическом анализе и синтезе всей имеющейся информации по данному вопросу. Систематические обзоры представляют собой мощный инструмент для повышения трансляционного потенциала экспериментальных исследований [28]. Необходимо отметить, что систематические обзоры в экспериментальных исследованиях на животных пока еще не стали рутинной практикой, но осведомленность научного сообщества о преимуществах такого подхода неуклонно растет. Необходимость проведения систематических обзоров исследований на животных неоднократно подчеркивалась в литературе последних лет [29]. Отмечается некоторое увеличение числа подобных анализов, но при этом их количество продолжает оставаться незначительным в сравнении с систематическими обзорами клинических исследований [30]. По некоторым оценкам, в настоящее время имеется более 7 млн. опубликованных исследований с использованием животных, из которых 5 млн. включены в базу данных PubMed [31]. При этом в период с 2005 по 2012 гг. был опубликован всего лишь 91 систематический обзор исследований на животных [32]. Качество первичных исследований, вошедших в указанные систематические обзоры (n=2280), к сожалению, оставляет желать лучшего, так как, в частности, только 20% иссле-

Таблица 2. Рекомендации SYRCLE для оценки риска систематических ошибок в исследованиях на животных [34]

№	Тип ошибки	Сфера	Описание сферы	Сигнальные вопросы
1	Ошибки отбора	Генерирование последовательности	Опишите использованные методы генерирования последовательности отбора животных в группы; описание должно показать, насколько использованная методика давала возможность получить сравнимые группы	Была ли адекватно разработана и применена методика назначения животных в группы?
2	Ошибки отбора	Исходные характеристики	Опишите все возможные характеристики животных и прогностические факторы, которые сравнивали для того, чтобы уверенно судить о том, являлись ли одинаковыми группы контроля и вмешательства в момент начала эксперимента	Были ли группы одинаковыми исходно или были ли они скорректированы с учетом приводящих факторов при анализе?
3	Ошибки отбора	Скрытие порядка отнесения животных к той или иной группе	Опишите метод сокрытия порядка отнесения животного к той или иной группе в деталях, достаточных для того, чтобы понять, возможно ли было предвидеть воздействие на данное животное в ходе набора групп	Был ли адекватно сокрыт способ отнесения животных к той или иной группе?
4	Ошибки, связанные с ходом исследования	Случайное размещение животных	Опишите все мероприятия по случайному размещению животных в комнате содержания	Были ли животные случайным образом размещены в ходе эксперимента?
5	Ошибки, связанные с ходом исследования	Ослепление	Опишите все мероприятия по ослеплению персонала по уходу за животными и исследователей относительно того, какое вмешательство выполнялось каждому животному. Дайте информацию об эффективности проведенных мероприятий	Знали ли лаборанты и исследователь, какое именно вмешательство выполнялось каждому животному в ходе эксперимента?
6	Ошибки, связанные с выявлением исхода	Случайная оценка исходов	Опишите, были ли животные случайным образом отобраны для оценки исходов	Были ли животные случайным образом отобраны для оценки исходов?
7	Ошибки, связанные с ходом исследования	Ослепление	Опишите мероприятия, предпринятые для исключения ситуации, при которой лицо, оценивающее исход, знает о том, к какой группе принадлежит данное животное	Были ли ослеплены лица, оценивающие исходы?
8	Ошибки, связанные с отсевом	Неполные данные об исходах	Опишите полную историю исхода для каждого основного исхода, включая данные об отсевах/исключении экспериментов из анализа. Укажите, каким образом документируются случаи исключения из анализа, а также повторного включения исключенных случаев	Были ли адекватным образом решены проблемы с неполными данными?
9	Ошибки представления данных	Избирательное представление данных	Укажите, как определяли наличие избирательного/неполного представления данных	Свободны ли публикации/отчеты от избирательного представления данных?
10	Прочее	Другие источники ошибок	Укажите любые другие важные проблемы, не указанные в других сферах	Отсутствуют ли в исследовании другие проблемы, которые могут привести к высокому риску ошибок?

Рисунок 1. Последовательность операций при выполнении систематического обзора и мета-анализа экспериментальных исследований



дований содержали ключевую информацию, позволяющую контролировать систематические ошибки и оценивать внешнюю и внутреннюю валидность исследований. Рандомизация использовалась в 24,6% первичных исследований, ослепление исследователей — в 14,6%, ослепление при оценке исходов — в 23,9%.

Кокрейновское сотрудничество разработало рекомендации по оценке риска систематических ошибок (Risk of Bias tool, RoB), обеспечивающие постоянство в оценке качества проведения рандомизированных клинических исследований [33]. В 2014 г. Hooijmans et al. [34] адаптировали эти рекомендации к использованию для оценки качества проведения исследований эффективности вмешательств на животных и назвали их SYstematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE) (табл. 2). Относительно рекомендаций RoB, в рекомендации SYRCLE добавлен пункт о случайном размещении животных в комнате содержания. Это связано с тем, что положение клет-

ки на стеллаже определяет такие параметры среды, как освещенность, температура и влажность, а эти параметры, в свою очередь, влияют на метаболизм и исходы токсикологических исследований. Неприемлемой является ситуация, при которой животные, принадлежащие к одной группе, занимают фиксированное место на стеллаже.

Мета-анализ следует за систематическим обзором и отличается подключением статистического метода для компилирования и суммирования результатов большой коллекции независимых исследований, отобранных на первом этапе по принципу наибольшей релевантности. Последовательность операций при проведении систематического обзора и мета-анализа представлена на рисунке 1.

В целом исследователи в большей степени проявляют интерес к проведению новых исследований и разработке новых экспериментальных моделей, чем к критическому анализу уже проведенной работы и существующих моделей [35]. Нередко имеет место ситуация, при которой экспериментальные

Таблица 3. Чеклист для проверки качества экспериментального исследования на этапе подачи рукописи в рецензируемый журнал [36]

Введение
<p><i>Исходная информация</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - описание литературы по теме публикации, включая краткое описание того, каким образом были получены результаты - описание пробелов в массиве знаний по теме публикации - цель или задача настоящего исследования
<p><i>Ключевой вопрос исследования или рабочая гипотеза</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - конкретный и четко сформулированный - в формулировке должны присутствовать следующие элементы: <ul style="list-style-type: none"> • вид животных • вмешательство (или воздействие) • группа сравнения (контроль) • оценочный критерий • продолжительность воздействия (если применимо)
<p><i>Клиническая значимость исследования</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - обоснование выбора конкретной экспериментальной модели - специфические характеристики выбранной модели
Материалы и методы
<p><i>Дизайн эксперимента</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - полная рандомизация - блочная рандомизация - факторный тип исследования - дизайн с повторными измерениями - последовательное испытание
<p><i>Экспериментальные и контрольные группы</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - карантин/адаптация животных после транспортировки - вид животных - обозначение стока/линии (точный генетический статус, н-р, инбредная линия, гибриды первого поколения, трансгены, нокауты и т.п.) - происхождение и источник животных - единица содержания (изоляция либо при групповом содержании количество животных в клетке) - количество животных в группе (включая методику расчета размера выборки) - пол - возраст (в начале и в конце эксперимента) - масса тела (в начале эксперимента) - микробиологический статус: <ul style="list-style-type: none"> • конвенциональные животные/SPF категория/гнотобионты • мероприятия по поддержанию микробиологического статуса (открытые клетки, класс чистоты помещений, индивидуально вентилируемые клетки, изоляторы) - комнаты содержания: <ul style="list-style-type: none"> • температура (среднее ± стандартное отклонение) • относительная влажность (среднее ± стандартное отклонение) • вентиляция (кратность воздухообмена, градиенты давления) • освещение (интенсивность, фотопериод, время включения, наличие системы «закат-рассвет») • шум (музыка и пр.) - клетки: <ul style="list-style-type: none"> • тип и размер • количество животных в клетке • подстил (тип и наличие сертификата) • наличие и тип элементов обогащения среды • частота замены клеток • частота приручения - кормление: <ul style="list-style-type: none"> • тип корма • состав корма (ссылка на производителя) • обработка • режим кормления (<i>ad libitum</i>, ограничение, принудительное кормление и т.п.)

<p>- поение:</p> <ul style="list-style-type: none"> • тип воды (наличие результатов анализа и методика верификации качества) • обработка (закисление, минерализация и т.п.) • режим поения (<i>ad libitum</i>, частота подачи воды) • частота замены поилок • поилки или автоматизированная система поения <p>- методика отнесения животных к группе: рандомизация</p> <p>- описание того, каким образом подтверждается наличие заболевания/вмешательства у животного</p> <p>- описание причин исключения животного из исследования</p> <p>- описание контрольных групп и пояснение того, почему именно данные контрольные группы необходимы для ответа на ключевой вопрос исследования</p>
<p><i>Нормативы и этика</i></p> <p>- описание соответствия локальным нормативным принципам</p> <p>- описание этической экспертизы (например, комиссией по биоэтике)</p>
<p><i>Воздействие</i></p> <p>- временной режим:</p> <ul style="list-style-type: none"> • день и время воздействия • время между воздействием и взятием образцов/их обработкой <p>- тип воздействия</p> <p>- описание хирургического вмешательства и других техник эксперимента</p> <p>- доза и частота воздействия (если применимо)</p> <p>- путь введения (энтеральный/парентеральный/трансдермальный)</p> <p>- препараты (название, производитель, концентрация, объем введения)</p> <p>- прочие использованные продукты (название, производитель, концентрация)</p> <p>- методика и время взятия биологического материала (кровь, моча и т.п.)</p> <p>- анестезия (тип, препарат, метод)</p> <p>- аналгезия (тип, препарат, метод)</p> <p>- эвтаназия (тип, препарат, метод)</p> <p>- описание общего благополучия животных в ходе эксперимента и при его завершении (при наличии проблем — какие меры были приняты для нормализации)</p>
<p><i>Исход</i></p> <p>- описание параметров, которые измеряются, а также методики их измерения</p> <p>- описание методики ослепления персонала относительно типа вмешательства и оценки исхода</p> <p>- описание статистических методов</p>
<p>Результаты</p>
<p>- описание важнейших результатов</p> <p>- количество животных, погибших до завершения эксперимента, включая причину гибели</p> <p>- исключенные животные (количество и причина исключения)</p> <p>- общее количество животных, включенных в статистическую обработку</p> <p>- краткое описание животных, включенных в обработку, но имевших отклонения, не предусмотренные критериями исключения</p> <p>- анализ мощности после пересчета на исключенных/заболевших животных</p> <p>- описание наиболее важных физиологических параметров в ходе вмешательства (физиологический мониторинг), включая наличие/отсутствие значимых различий в этих параметрах между группами</p>
<p>Обсуждение</p>
<p>- обсуждение важнейших результатов</p> <p>- обсуждение клинической значимости/перспектив практического применения результатов</p> <p>- обоснование того, являются ли необходимыми исследования с пролонгированным наблюдением</p>

исследования эффективности какого-либо препарата продолжают инициироваться и проводиться параллельно с текущими клиническими исследованиями. В то же время, гораздо более логичной практикой следовало бы признать получение разрешения на проведение первой фазы клинического исследо-

вания после выполнения систематического обзора всех имеющихся экспериментальных данных.

Проверочные списки и рекомендации

В настоящее время даже престижные журналы, публикующие результаты исследований на живот-

ных, не требуют от авторов описания дизайна эксперимента, процедур рандомизации и ослепления, а также описания критериев включения/исключения. Для улучшения качества экспериментальных исследований, повышения их воспроизводимости и облегчения проведения систематических обзоров Nooijmans et al. В 2010 г. предложили оригинальный проверочный список, направленный на проверку подготовленной рукописи на соответствие «золотому стандарту» [36] (табл. 3). Он рекомендован для широкого использования всеми исследователями, занимающимися исследованиями на животных. По мнению авторов, этот проверочный список будет способствовать соблюдению правила трех R. Несмотря на жесткие лимиты количества печатных знаков в журнальных статьях, все необходимые детали могут быть приведены в электронных приложениях к статье, объем которых не ограничивается. Предоставление подробной информации об особенностях исследования может стать рутинной практикой только в том случае, если редакции журналов начнут требовать эту информацию для принятия статьи в печать.

Валидность данных рандомизированных клинических исследований (РКИ) существенно повысилась после внедрения рекомендаций CONSORT в 1996 г [37]. Поскольку базовые принципы проведения РКИ и исследований на животных в целом совпадают, в 2010 г. на основе рекомендаций CONSORT были разработаны аналогичные рекомендации ARRIVE [38]. Сравнительная характеристика рекомендаций CONSORT и ARRIVE приведена в таблице 4. По некоторым оценкам, несмотря на наличие рекомендаций ARRIVE, в настоящее время качество проведения и представления результатов экспериментальных исследований по-прежнему существенно отстает от РКИ. В связи с этим, предлагается ряд дополнительных улучшений к ARRIVE. На момент выхода рекомендаций ARRIVE, только 59% из 271 опубликованных исследований содержали информацию о гипотезе/цели исследования, количестве использованных животных и их характеристиках. Случайное распределение животных в группы имело место лишь в 13% работ, ослепление при оценке исходов — в 14%. Удовлетворительное описание статистических методов имелось в 70% публикаций [22]. Существующий разрыв между РКИ и преclinical исследованиями в качестве представления данных может являться одним из значимых трансляционных барьеров.

Muhlhausler и соавт. в 2013 г. предложили ряд дополнений к рекомендациям ARRIVE, учитывающих специфику проведения экспериментальных исследований [39]:

1. Упорядочивание критериев включения/исключения на этапе включения в исследование.
2. Более подробное и четкое описание метода рандомизации, в частности, способа генерации последовательности случайных чисел.
3. Указание исходных характеристик в группах после рандомизации и статистическая верификация отсутствия различий, что является также проверкой успешности рандомизации.
4. Указание метода ослепления персонала, выполняющего рандомизацию, сбор и обработку данных, а также анализ результатов, относительно принадлежности животных к той или иной группе.
5. Упорядоченное представление данных по отсеvu. В большинстве РКИ количество пациентов, которым выполняется оценка исхода, меньше количества при рандомизации. В экспериментальных исследованиях иногда наблюдается обратное — в разделе «Результаты» указаны более высокие значения, чем в разделе «Методы». В связи с этим рекомендуется использовать блок-схему, иллюстрирующую количество животных на следующих этапах эксперимента: 1) в момент их получения, 2) после акклиматизации, 3) после рандомизации в каждой группе, 4) на момент оценки исходов.
6. Недопущение добавления животных в группы «до момента появления значимого отличия». Необходимость представления методики расчета размера выборки *a priori*.
7. Критерии исключения в ходе исследования, если они сформулированы заранее, могут служить законным основанием для исключения «выбросов» и их замены другими экспериментами. Более того, это поможет получить более гомогенные данные.

В последние годы появились «отраслевые» дополнения к рекомендациям ARRIVE. Так, например, в 2016 г. предложены рекомендации MINPERA по представлению данных гистопатологических исследований в экспериментальных работах [40]. Таким образом, более широкое использование чеклистов при подготовке и рассмотрении рукописей статей, а также соблюдение рекомендаций по планированию и проведению экспериментальных исследований на животных могут способствовать решению проблемы воспроизводимости данных и повышению валидности экспериментов.

Определение размера выборки и некоторые аспекты статистического анализа

Важным мероприятием, уменьшающим риск систематических ошибок, является расчет размера выборки. Он должен быть проведен на этапе планирования исследования и подачи протокола исследова-

Таблица 4. Сравнительная характеристика рекомендаций CONSORT и ARRIVE [39]

Раздел	CONSORT	ARRIVE
Введение		
Состояние вопроса и цели	Состояние вопроса и обоснование настоящего исследования (2a)	Включите достаточное описание состояния вопроса (включая ссылки на ранее выполненные исследования) для обоснования цели настоящей работы и дайте пояснения относительно экспериментальных подходов (3a); Поясните, каким образом и почему предложенная модель на определенном виде животных поможет добиться поставленной цели и, где уместно, насколько это соответствует биологии человека (3b)
	Конкретные задачи или гипотезы (2b)	Четко опишите первичную и, при наличии, вторичные задачи исследования, а также конкретные гипотезы, которые будут проверяться (4)
Методы		
Описание дизайна исследования	Описание дизайна исследования (например, исследование с параллельными группами или факторный тип исследования), включая соотношение распределения испытуемых по группам (3a)	Укажите количество экспериментальных и контрольных групп (6a); четко опишите детали всех выполняемых процедур (7); дайте обоснование методов (7d)
	Опишите изменения в методах, возникшие после начала исследования (3b)	Опишите любые изменения, предпринятые для уменьшения нежелательных исходов (16)
Участники	Описание критериев соответствия (4a)	Опишите любую существенную информацию, например, источник животных, название стока/линии в соответствии с международной номенклатурой, генетический статус (н-р, нокаут), генотип и пр. (8b)
	Условия и место сбора данных (4b)	Укажите, когда и где происходил сбор данных (7b,c); опишите детали системы содержания животных (9a,b)
Вмешательства	Описание вмешательств для каждой группы должно позволить воспроизвести исследование и должно включать указание способа введения лекарства и времени введения (5)	Для каждой экспериментальной серии и каждой группы, включая контроль, дайте подробное описание всех выполненных процедур (7)
Исходы	Полное описание заранее сформулированных первичных и вторичных критериев эффективности, включая указание способа и времени их оценки (6a)	Четко опишите первичные и вторичные конечные точки эксперимента, которые будут оцениваться (например, клеточная гибель, молекулярные маркеры, поведенческие изменения) (12)
	Любые изменения критериев эффективности после начала исследования с указанием причин изменения (6b)	Нет требований
Размер выборки	Описание, каким образом был определен размер выборки (7a)	Поясните, как определили требуемое количество животных; опишите детали метода расчета размера выборки (10b)
	Если уместно, объяснение любых промежуточных анализов и правил прекращения исследования (7b)	Нет требований
Рандомизация		
Генерация номерной последовательности	Метод генерации номерной последовательности, позволяющей обеспечить случайный порядок отнесения пациента к той или иной группе (8a)	Нет требований
	Тип рандомизации, включая любые ограничения (блоковую рандомизацию и размер блока) (8b)	Опишите методику отнесения животного к той или иной группе, включая рандомизацию или подбор соответствия (11a); опишите порядок, в котором проводились воздействия и оценка исходов у животных различных групп (11b)

Механизм сокрытия порядка отнесения к той или иной группе	Механизм, использованный для обеспечения случайного порядка отнесения пациента к той или иной группе (шаги, предпринятые для сокрытия порядка отнесения к группе) (9)	Любые шаги, предпринятые для минимизации эффектов субъективности при отнесении животных к воздействию (н-р, процедура рандомизации) и при оценке результатов (н-р, кто был ослеплен и когда) (6b)
Выполнение	Кто генерировал последовательность случайных чисел, кто включал пациентов, кто назначал пациентам лечение (10)	Не указано
Ослепление	Кто был ослеплен после назначения вмешательств (11a)	Любые шаги, предпринятые для минимизации эффектов субъективности при оценке результатов (опишите, кто и когда был ослеплен) (6b)
Анализ		
Статистика	Статистические методы, использованные для сравнения групп по первичным и вторичным исходам (12a)	Опишите подробно статистические методы, использованные для каждого анализа (13a); укажите единицу анализа для каждого набора данных (13b); опишите методы, используемые для того, чтобы убедиться, что данные соответствуют статистическому подходу (13c)
	Методы дополнительного анализа, такие как анализ подгрупп и сглаженный анализ (12b)	Не указано
Отсев	Для каждой группы указать количество пациентов, которые были случайным образом распределены в группу, получили вмешательство, и были проанализированы на предмет первичной конечной точки – рекомендуется схема (13a)	Укажите общее количество животных в каждой серии и в каждой группе (10a); укажите количество независимых повторов для каждого эксперимента, если уместно (10c)
	Для каждой группы, потери и исключения после рандомизации, включая причины (13b)	Если в анализ были включены не все животные, пояснить почему (15b)
Исходные данные	Таблица, показывающая исходные демографические и клинические характеристики каждой группы (15)	Подробная характеристика использованных животных, включая вид, линию/сток, пол, стадию развития и массу (8a); укажите существенные характеристики и статус здоровья животных до вмешательства (14)
Проанализированные количества	Для каждой группы укажите число пациентов, включенных в каждый тип анализа, и проводился ли анализ в соответствии с исходным распределением групп (16)	Укажите количество животных в каждой группе, включенной в каждый тип анализа (15a)
Исходы и их оценка	Для каждого первичного и вторичного исхода следует указать результат по каждой группе, равно как и силу эффекта и его точность (н-р, 95%-ный доверительный интервал) (17a)	Приведите результаты каждого выполненного анализа с указанием меры точности (н-р, стандартное отклонение или доверительный интервал)
	Для дихотомических данных, рекомендуется представление как абсолютных, так и относительных данных о величине эффекта (17b)	Не указано
Негативные эффекты	Все нежелательные эффекты в каждой группе должны быть указаны (19)	Опишите негативные эффекты в каждой группе (17a)

ния в комиссию по биоэтике на основе следующих исходных данных: 1) ожидаемая величина эффекта тестируемого воздействия, 2) ожидаемая вариабельность ключевого параметра (стандартное отклонение), 3) уровень значимости и 4) установленная статистическая мощность. В настоящее время менее 2% публикаций с использованием животных содержат описание расчета размера выборки [41].

Чем меньше величина эффекта, тем более объемная выборка потребуется для его выявления. Этот

параметр устанавливается на основе предшествующих исследований самой лаборатории либо анализа литературы, а также исходя из того уровня различий, который будет клинически значимым. Чем больше стандартное отклонение, тем более значимый размер выборки потребуется для выявления эффекта. Малое стандартное отклонение свидетельствует о высокой внутренней валидности эксперимента. Величину стандартного отклонения можно определить на основе опыта лаборатории, пилотных экс-

периментов либо данных литературы, если пилотные опыты невозможны. Статистическая мощность обычно устанавливается на уровне от 0,8 до 0,9, так как дальнейшее ее повышение приводит к резкому увеличению размера выборки. Уровень значимости обычно принимается менее 0,05, иногда — менее 0,01. Некоторые авторы считают, что различия следует считать значимыми только при уровне значимости менее 0,005 или даже 0,001 [42]. Процедура расчета размера выборки облегчается наличием большого количества онлайн-калькуляторов (например, <http://www.sample-size.net/sample-size-means/>). Интересным методом валидации экспериментальных исследований является анализ статистической мощности исследования уже после его завершения. При этом все вариативные параметры, которые необходимы для расчета размера выборки *a priori*, становятся уже известными (выраженность эффекта, стандартное отклонение, и собственно сам размер выборки).

Проведение исследований как на заниженных, так и на завышенных выборках животных, является неэтичным. Количество животных в группе, превышающее необходимое для получения статистически значимого результата, противоречит широко известному правилу трех R, а именно, уменьшению (*reduction*) числа используемых животных. Гораздо чаще, однако, встречаются исследования с заниженным размером выборки, что не позволяет выявить значимых различий и приводит к бессмысленному использованию животных и трате средств.

Данные исследований в области кардио- и нейропротекции убедительно показали, что многие опубликованные научные результаты являются ложноположительными. К причинам можно отнести избирательный статистический анализ и избирательное представление данных. При избирательном статистическом анализе для анализа используются различные статистические методы/критерии и затем для публикации выбирается тот из них, который дает самый значимый результат. При избирательном представлении данных из совокупности измеренных параметров выбираются те, которые значимо изменились под влиянием тестируемого воздействия. Во избежание подобных проблем до начала исследования должны быть представлены первичные и вторичные конечные точки, а также методы статистического анализа.

Проведение экспериментальных исследований на животных с применением принципов доказательной медицины

Несмотря на то, что экспериментальные исследования имеют ряд существенных отличий от РКИ

(табл. 5), более широкое внедрение в экспериментальную практику основополагающих принципов доказательной медицины продолжает оставаться одной из приоритетных задач по повышению качества биомедицинских исследований. В частности, исследования на животных должны стать многоцентровыми. Еще в начале 1990-х годов эффективность такого подхода была продемонстрирована в многоцентровом исследовании кардиопротективной эффективности ибупрофена и верапамила в экспериментах на собаках и крысах, которое выявило, что в одном из центров данные были сфабрикованы [43]. Многоцентровые исследования снижают различия, обусловленные различными условиями в разных лабораториях. Также многоцентровые исследования позволяют набрать необходимое для уверенной статистической обработки количество наблюдений. Еще одним важным мероприятием должно стать внедрение системы регистров экспериментальных исследований по аналогии с такими базами РКИ, как www.clinicaltrials.gov и др. Это позволит обеспечить оперативный доступ к первичным данным исследования, увеличит степень ответственности исследователей и сделает процесс сбора и анализа данных более прозрачным.

Примером успешной реализации концепции проведения экспериментальных исследований с использованием стандартов доказательной медицины является создание в 2011 г. Национальным институтом здоровья (США) консорциума для доклинической оценки новых кардиопротективных воздействий (*Consortium for Preclinical Assessment of CARDioprotective Therapies* (CAESAR)). Целью организации данного консорциума является преодоление трансляционных барьеров в области кардиопротекции, получение воспроизводимых данных и обоснование проведения клинических исследований. В консорциум входят четыре крупных университета, на базе которых проводятся рандомизированные, слепые, статистически обоснованные экспериментальные исследования [44]. Организационная структура консорциума CAESAR представлена на рисунке 2. Кардиопротективные воздействия тестируются на трех видах животных в различных модельных условиях (наркотизированные мыши, бодрствующие кролики и свиньи) в центрах экспериментальной хирургии. Получаемые биологические образцы подвергаются анализу в отделе биохимии и отделе патологии. В центре сбора данных ведется электронная база данных, осуществляются обработка первичных данных и статистический анализ. Примечательно, что из нескольких протестированных к настоящему времени кардиопротективных воздействий кон-

Таблица 5. Сравнительная характеристика рандомизированных клинических исследований и исследований на животных.

Рандомизированное клиническое исследование (РКИ)	Исследование на животных
Цель – демонстрация эффективности терапии/ вмешательства в клинике	Цель – понимание патогенеза заболевания и описание мишеней для последующего применения в клинике; изучение эффективности и безопасности терапии/ вмешательства
Заболевание наступило естественным путем	Используется модель заболевания (степень соответствия заболеванию человека переменна)
Время назначения терапии/ вмешательства относительно момента начала заболевания существенно варьирует	Терапия/ вмешательство осуществляется в фиксированное время относительно момента индукции патологии
Группы пациентов часто гетерогенны (например, различные факторы риска и сопутствующие заболевания)	Гомогенная популяция животных (стандартизация пола, генотипа, условий содержания, микробиоты и пр.)
Размер выборки больше по сравнению с исследованиями на животных	Размер выборки меньше; метод оценки необходимого размера выборки не указывается
В целом, сравнительно высокая внутренняя валидность в силу рандомизации и ослепления	В целом, более низкая внутренняя валидность (в сравнении с РКИ); рандомизация и ослепление не являются стандартом
В слепых исследованиях пациенты не знают, какое лечение они получают	Применительно к животным, нет необходимости проводить ослепление
Сравнительно высокая внешняя валидность (экстраполяция в пределах одного вида)	Низкая внешняя валидность (экстраполяция между различными видами)
Сравнительно большая команда исследователей	Обычно меньшая команда исследователей
Вмешательство и оценку исходов производит разный персонал	Один и тот же исследователь часто отвечает за выполнение вмешательства, оценку исходов и анализ данных
Чаще всего нет данных аутопсии	Данные аутопсии доступны
Исходы являются клинически релевантными	Исходы часто представляют собой суррогатные критерии, которые трудно экстраполировать в клиническую практику
Имеются четкие рекомендации по представлению данных и контролю качества проведения	Рекомендации по представлению данных и контролю качества проведения формируются

сорциумом CAESAR была верифицирована только инфаркт-лимитирующая эффективность классического ишемического прекодиционирования [45].

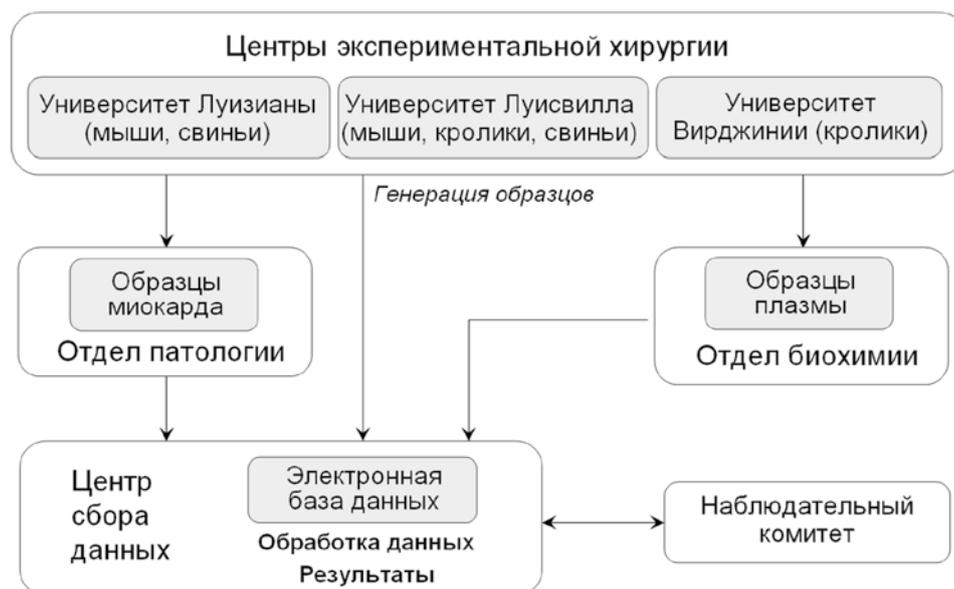
Роль грантодающих фондов, редакций научных журналов и научно-исследовательских организаций

«Жизненный цикл» большинства научно-исследовательских работ начинается с подачи заявки на грант и завершается публикацией полученных результатов в рецензируемых журналах. Учитывая это обстоятельство, целесообразно вводить новые правила оценки качества исследований на животных уже на этапе рассмотрения заявок на гранты

или иные формы финансирования. В настоящее время разработаны специальные шкалы для рецензентов грантов и экспертов [46].

В сложившейся практике организации и проведения научных исследований существует ряд системных факторов, которые невозможно игнорировать. Так, основным мерилем успеха, в том числе финансового, того или иного исследователя является количество публикаций и их суммарный импакт-фактор. Такая практика может приводить к стремлению опубликовать максимально возможное количество работ. Ресурсов на доведение исследования до нужного уровня совершенства в реальной жизни не хватает из-за жестких сроков за-

Рисунок 2. Организационная структура Консорциума для доклинической оценки новых кардиопротективных воздействий (Consortium for Preclinical AssESsment of CARdioprotective Therapies (CAESAR))



вершения работ по грантам и контрактам. В целом наибольший резонанс получают «сенсационные» исследования, опубликованные в журналах с высоким импакт-фактором, которые при этом могут иметь многочисленные методические дефекты и в силу этого часто являются невозпроизводимыми. Четко сформулированная гипотеза, наличие сведений о линии/стоке, массе тела (возрасте) и поле животных, а также данные о количестве использованных животных, согласно данным анализа С. Kilkenney et al. [22], присутствовали в 59% проанализированных публикаций. Это также вносит свой вклад в формирование пула публикаций недостаточного качества. В связи с этим важной инициативой могла бы быть рекомендация редакторам и рецензентам принимать решение о принятии/отклонении рукописи на основе количественных критериев оценки. Однако, ужесточение правил рассмотрения и приема рукописей само по себе не может решить такую комплексную проблему. Самым трудным вызовом является создание стимулов, вознаграждающих качество научных исследований, и разработка системы подобных критериев. Например, предпочтение должно отдаваться заявкам/публикациям научных коллективов, могущих подтвердить высокие стандарты качества проводимых исследований результатами независимых аудитов. Немаловажным фактором при принятии решения должно стать наличие информации о том, что результаты научной группы ранее были воспроизведены другими исследователями. Необходимо поддерживать проекты, направленные на вали-

дацию реагентки и экспериментальных методик и построенные по принципам надлежащей лабораторной практики (ослепление, наличие позитивных и негативных контролей, рандомизация и пр.).

Редакторам и рецензентам следует с осторожностью относиться к рукописям, в которых приводится большое количество экспериментов со значимым результатом. Даже если гипотеза исследования верна, такое совпадение маловероятно без дополнительных манипуляций с данными. Также необходимо осознание тезиса о том, что повторное проведение опубликованного исследования с целью верификации его результатов и проверки воспроизводимости (внешней валидности) является столь же важным с научной точки зрения, сколь и исходное исследование. Такие «повторительные» исследования должны поддерживаться финансово и находить положительный отклик у редакторов, рецензентов и экспертов.

Ответственность за соблюдение существующих нормативов и стандартов, а также за качество проводимых исследований, лежит на исследовательской группе и учреждении, в котором выполнена работа. Администрация учреждений должна стимулировать исследователей, которые следуют существующим руководствам и требованиям грантодающих организаций. Также администрации рекомендуется вводить обязательное ежегодное обучение для руководителей исследований, в котором освежать знания об основах планирования эксперимента, использовании контролей, валидации реагентов, статистике и пр.

«Обратная трансляция» неудачных клинических исследований

Одной из ключевых задач трансляционных исследований является уменьшение риска неудачи при тестировании новых субстанций, показавших высокую эффективность в экспериментах на животных, в клинических исследованиях. Для решения этой проблемы может применяться подход, названный «обратной трансляцией» [47, 48]. В этом случае на этапе выявления отсутствия эффекта в клиническом исследовании производится тщательный анализ всего массива данных преคลินิกеских исследований с поиском возможных причин, повлекших за собой неудачу. Примером «обратной трансляции» служит история исследований клинической эффективности gefитиниба, противоопухолевого препарата, блокирующего сигнальный путь рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). В ходе первичных клинических исследований было установлено, что препарат высокоэффективен лишь у части пациентов. Позднее было показано, что наличие терапевтического эффекта связано с мутацией гена *EGFR*, сопряженной с более высокой чувствительностью белка-мишени к препарату, что привело к разработке генетической тест-системы, обеспечивающей персонализацию терапии gefитинибом [49].

Заключение

Процедура проведения клинических исследований претерпела существенные изменения в последние несколько десятилетий. Удалось достичь консенсуса о том, что рандомизация, ослепление и регистрация исследований являются необходимыми мероприятиями, а невыполнение этих требований приводит к невозможности публикации результатов в большинстве журналов. Аналогичные практики должны со временем стать общепринятыми и в сфере доклинических исследований. Примеры надлежащей организации отдельных элементов экспериментальных исследований в настоящее время также имеются в наличии. Это, например, работа комиссий по биоэтике, нормативы по обращению с радиоактивными веществами, ретровирусами, эмбриональными стволовыми клетками и др.

Эксперименты на животных остаются важнейшим этапом трансляционных биомедицинских исследований. В то же время, требуются значительные организационные усилия, направленные на повышение внутренней и внешней валидности преคลินิกеских исследований. Доклинические исследования требуют особенно тщательной валидации, так как они представляют собой фундамент, на котором строятся дальнейшие

исследования эффективности лекарств и других воздействий [50]. Критическая оценка результатов систематических обзоров и мета-анализов перед планированием экспериментов, «обратная» трансляция неудачных клинических исследований, а также рутинное применение проверочных списков и международных рекомендаций в сфере доклинических исследований способны повысить трансляционный потенциал экспериментальных исследований. Рекомендации и проверочные списки, помогающие исследователям оценить соответствие планируемых и проводимых исследований принятому в настоящее время международным научным сообществом «золотому стандарту», должны внедряться на различных уровнях, начиная с грантодающих организаций, комиссий по биоэтике и редакций научных журналов. Предварительная регистрация экспериментальных работ и обеспечение доступа широкого круга исследователей к первичным данным позволят сделать процесс проведения исследований более открытым и, следовательно, объективным. Рассмотренные подходы могут способствовать преодолению кризиса транслируемости результатов экспериментальных исследований в практику и вернуть доверие широких кругов общественности к классическому экспериментальному методу получения новых знаний в медицине.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Cook DJ, Tymianski M. Translating promising preclinical neuroprotective therapies to human stroke trials. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2011; 9(4):433-449.
2. Arrowsmith J. Trial watch: Phase II failures: 2008-2010. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(5):328-329.
3. Collins F. Of Mice, Men, and Medicine. <http://directorsblog.nih.gov/2013/02/19/of-mice-men-and-medicine/> (19 February 2013).
4. Chalmers I, Glasziou P. Avoidable waste in the production and reporting of research evidence. *Lancet.* 2009; 374(9683): 86-89.
5. Freedman LP, Gibson MC. The impact of preclinical irreproducibility on drug development. *Clin Pharmacol Ther.* 2015; 97(1):16-18.
6. Begley CG, Ellis LM. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature.* 2012; 483(7391):531-533.
7. Herper M. The Truly Staggering Cost Of Inventing New Drugs <http://www.forbes.com/sites/matthewherper/2012/02/10/the-truly-staggering-cost-of-inventing-new-drugs/> (10 February 2012).

8. Deloitte and Thomson Reuters. Measuring the return from pharmaceutical innovation: weathering the storm: Annual Report. London: Deloitte LLP, 2013.
9. van der Worp HB, Howells DW, Sena ES et al. Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med.* 2010; 7(3):e1000245.
10. Shcherbak NS, Galagudza MM. Experimental models of ischemic stroke. *Bulletin of Federal Almazov Medical Research Centre.* 2011; 3:39-46. In Russian [Щербак Н. С., Галагудза М. М. Экспериментальные модели ишемического инсульта. Бюллетень Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова. 2011; 3:39-46].
11. Galagudza MM, Kostareva AA. Experimental models of restrictive cardiomyopathy. *Regional Haemodynamics and Microcirculation.* 2015; 14(3):14-21. In Russian [Галагудза М. М., Костарева А. А. Экспериментальные модели рестриктивной кардиомиопатии. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2015; 14(3):14-21].
12. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke.* 2009; 40(6):2244-2250.
13. Galagudza MM, Nekrasova MK, Syrenskii AV et al. Cardioprotective effect of anti-ischemic and metabolic preconditioning in experiment. *Russian Journal of Physiology.* 2006; 92(3):284-291. In Russian [Галагудза М. М., Некрасова М. К., Сыренский А. В. и др. Устойчивость миокарда к ишемии и эффективность ишемического preconditionирования при экспериментальном сахарном диабете // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2006; 92(3):284-291].
14. Chavalarias D, Ioannidis JP. Science mapping analysis characterizes 235 biases in biomedical research. *J Clin Epidemiol.* 2010; 63(11):1205-1215.
15. Ericsson AC, Davis JW, Spollen W et al. Effects of vendor and genetic background on the composition of the fecal microbiota of inbred mice. *PLoS One.* 2015; 10(2):e0116704.
16. Treuting PM, Clifford CB, Sellers RS et al. Of mice and microflora: considerations for genetically engineered mice. *Vet Pathol.* 2012; 49(1):44-63.
17. Borshchev YuYu., Minasian SM, Burovenko IYu et al. Influence of probiotic strain *E. faecium L3* on myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in the model of antibiotic-induced intestinal dysbiosis. *Russian Journal of Physiology.* 2016; 102(11):1323-1332. In Russian [Борщев Ю. Ю., Минасян С. М., Буровенко И. Ю. и др. Влияние пробиотического штамма *E. faecium L3* на устойчивость миокарда к ишемии-реперфузии в модели антибиотик-индуцированного дисбиоза кишечника. Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2016; 102(11):1323-1332].
18. Altman DG, Bland JM. How to randomise. *BMJ.* 1999; 319(7211):703-704.
19. Pedder H, Vesterinen HM, Macleod MR et al. Systematic review and meta-analysis of interventions tested in animal models of lacunar stroke. *Stroke.* 2014; 45(2):563-570.
20. Simon MM, Greenaway S, White JK et al. A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol.* 2013; 14(7):R82.
21. Hirst JA, Howick J, Aronson JK et al. The need for randomization in animal trials: an overview of systematic reviews. *PLoS One.* 2014; 9(6):e98856.
22. Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS One.* 2009; 4(11):e7824.
23. O'Connor AM, Sargeant JM. Critical appraisal of studies using laboratory animal models. *ILAR J.* 2014; 55(3):405-417.
24. Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods.* 2010; 7(10):825-826.
25. Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA et al. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods.* 2014; 11(6):629-632.
26. Minnerup J, Wersching H, Diederich K et al. Methodological quality of preclinical stroke studies is not required for publication in high-impact journals. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010; 30(9):1619-1624.
27. ter Riet G, Korevaar DA, Leenaars M et al. Publication bias in laboratory animal research: a survey on magnitude, drivers, consequences and potential solutions. *PLoS One.* 2012; 7(9):e43404.
28. Peters JL, Sutton AJ, Jones DR et al. A systematic review of systematic reviews and meta-analyses of animal experiments with guidelines for reporting. *J Environ Sci Health B.* 2006; 41(7):1245-1258.
29. Nuffield Council on Bioethics. The ethics of research involving animals. London: Nuffield Council on Bioethics, 2005.
30. Korevaar DA, Hooft L, ter Reit G. Systematic reviews and meta-analyses of preclinical studies: publication bias in laboratory animal experiments. *Lab Anim.* 2011; 45(4):225-230.
31. Leenaars M. Systematic reviews of preclinical animal studies: current state of affairs. Webinar. <http://www.youtube.com/watch?v=FxdRIJ1RfWY> (19 June 2014).
32. van Luijk J, Bakker B, Rovers MM et al. Systematic reviews of animal studies; missing link in translational research? *PLoS One.* 2014; 9(3):e89981.
33. Higgins JP, Altman DG, Gotzsche PC et al. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ.* 2011; 343:d5928.
34. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol.* 2014; 14:43.
35. Evans I, Thornton H, Chalmers I. Testing treatments: better research for better healthcare. London: The British Library, 2006.
36. Hooijmans CR, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M. 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. *Altern Lab Anim.* 2010; 38(2):167-182.
37. Altman DG. Better reporting of randomised controlled trials: the CONSORT statement. *BMJ.* 1996; 313(7057):570-571.
38. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010; 8(6):e1000412.
39. Muhlhausler BS, Bloomfield FH, Gillman MW. Whole animal experiments should be more like human randomized controlled trials. *PLoS Biol.* 2013; 11(2):e1001481.
40. Scudamore CL, Soilleux EJ, Karp NA et al. Recommendations for minimum information for publication of experimental pathology data: MINPEPA guidelines. *J Pathol.* 2016; 238(2):359-367.

41. Al-Shahi Salman R, Beller E, Kagan J et al. Increasing value and reducing waste in biomedical research regulation and management. *Lancet*. 2014; 383(9912):176-185.

42. Johnson VE. Revised standards for statistical evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(48):19313-19317.

43. Bailey KR. Detecting fabrication of data in a multicenter collaborative animal study. *Control Clin Trials*. 1991; 12(6):741-752.

44. Lefer DJ, Bolli R. Development of an NIH consortium for preclinical Assessment of CARDioprotective therapies (CAESAR): a paradigm shift in studies of infarct size limitation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011; 16(3-4):332-339.

45. Jones SP, Tang XL, Guo Y et al. The NHLBI-sponsored Consortium for preclinical assessment of cARDioprotective therapies (CAESAR): a new paradigm for rigorous, accurate, and reproducible evaluation of putative infarct-sparing interventions in mice, rabbits, and pigs. *Circ Res*. 2015; 116(4):572-586.

46. Ioannidis JP, Khoury MJ. Assessing value in biomedical research: the PQRST of appraisal and reward. *JAMA*. 2014; 312(5):483-484.

47. Ledford H. Translational research: the full cycle. *Nature*. 2008; 453(7197):843-845.

48. 't Hart BA. Reverse translation of failed treatments can help improving the validity of preclinical animal models. *Eur J Pharmacol*. 2015; 759:14-18.

49. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ et al. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25(5):587-595.

50. McGonigle P, Ruggeri B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation. *Biochem Pharmacol*. 2014; 87(1):162-171.

Информация об авторах:

Александров Илья Вадимович, младший научный сотрудник НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Егорова Елена Игоревна, младший научный сотрудник НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Васина Елена Юрьевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, старший научный сотрудник НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда Центра экспериментального биомоделирова-

ния Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Новиков Владимир Константинович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Матыко Павел Геннадьевич, младший научный сотрудник НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Галагудза Михаил Михайлович, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, профессор кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России.

Author information:

Ilya V. Aleksandrov, Junior Researcher at the Department of Microcirculation and Myocardial Metabolism, Centre of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Elena I. Egorova, Junior Researcher at the Department of Microcirculation and Myocardial Metabolism, Centre of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Elena Yu. Vasina, PhD, Associate Professor of the Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; Senior Researcher at the Department of Microcirculation and Myocardial Metabolism, Centre of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Vladimir K. Novikov, MD, PhD, Professor, Chief Researcher at the Department of Bioprosthesis and Cardiac Protection, Centre of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Pavel G. Matyko, Junior Researcher at the Department of Bioprosthesis and Cardiac Protection, Centre of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Mikhail M. Galagudza, MD, PhD, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director of the Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre; Professor of the Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.