

Использование ARRIVE 2.0 в научно-исследовательской практике на примере экспериментальной оценки развития толерантности к стимулирующему действию ингибиторов фосфодиэстеразы 10А на двигательную активность крыс

Ключевые моменты ARRIVE 2.0 в случае работы, выполненной на экспериментальных животных

- Дизайн эксперимента;
- Размер выборки и его обоснование,
- Рандомизация,
- Процедура ослепления,
- Измеряемые переменные,
- Статистические методы,
- Животные и условия их содержания,
- Экспериментальные процедуры,
- Детальное описание результатов.

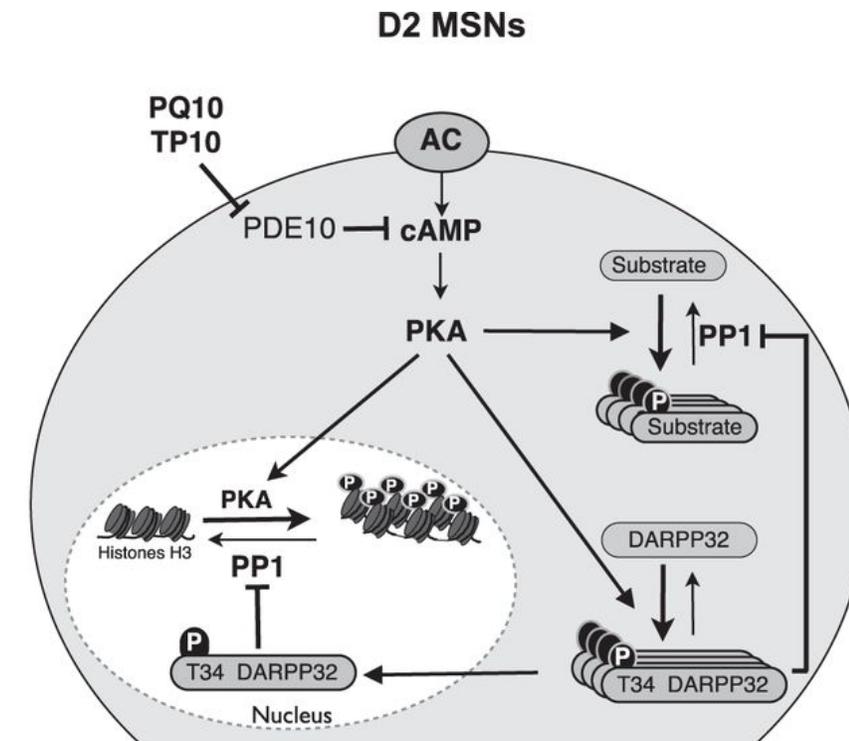
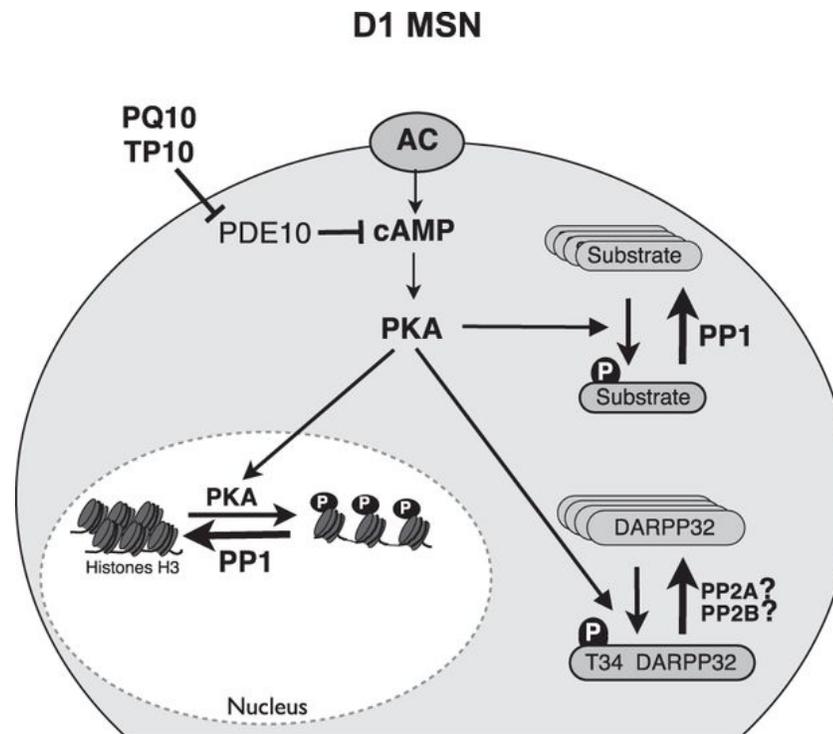
ARRIVE Essential 10		
Study design	1	For each experiment, provide brief details of study design including: a. The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. b. The experimental unit (e.g., a single animal, litter, or cage of animals).
Sample size	2	a. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any a priori sample size calculation, if done.
Inclusion and exclusion criteria	3	a. Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established a priori. If no criteria were set, state this explicitly. b. For each experimental group, report any animals, experimental units, or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. c. For each analysis, report the exact value of n in each experimental group.
Randomisation	4	a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.
Blinding	5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).
Outcome measures	6	a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g., cell death, molecular markers, or behavioural changes). b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e., the outcome measure that was used to determine the sample size.
Statistical methods	7	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.
Experimental animals	8	a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.
Experimental procedures	9	For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including: a. What was done, how it was done, and what was used. b. When and how often. c. Where (including detail of any acclimatisation periods). d. Why (provide rationale for procedures).
Results	10	For each experiment conducted, including independent replications, report: a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g., mean and SD, or median and range). b. If applicable, the effect size with a confidence interval.

Рекомендации ARRIVE 2.0 в случае работы, выполненной на экспериментальных животных

Recommended Set		
Abstract	11	Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions.
Background	12	a. Include sufficient scientific background to understand the rationale and context for the study, and explain the experimental approach. b. Explain how the animal species and model used address the scientific objectives and, where appropriate, the relevance to human biology.
Objectives	13	Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested.
Ethical statement	14	Provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study, and any relevant licence or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification.
Housing and husbandry	15	Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment.
Animal care and monitoring	16	a. Describe any interventions or steps taken in the experimental protocols to reduce pain, suffering, and distress. b. Report any expected or unexpected adverse events. c. Describe the humane endpoints established for the study, the signs that were monitored, and the frequency of monitoring. If the study did not have humane endpoints, state this.
Interpretation/scientific implications	17	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory, and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations, including potential sources of bias, limitations of the animal model, and imprecision associated with the results.
Generalisability/translation	18	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to generalise to other species or experimental conditions, including any relevance to human biology (where appropriate).
Protocol registration	19	Provide a statement indicating whether a protocol (including the research question, key design features, and analysis plan) was prepared before the study, and if and where this protocol was registered.
Data access	20	Provide a statement describing if and where study data are available.
Declaration of interests	21	a. Declare any potential conflicts of interest, including financial and nonfinancial. If none exist, this should be stated. b. List all funding sources (including grant identifier) and the role of the funder(s) in the design, analysis, and reporting of the study.

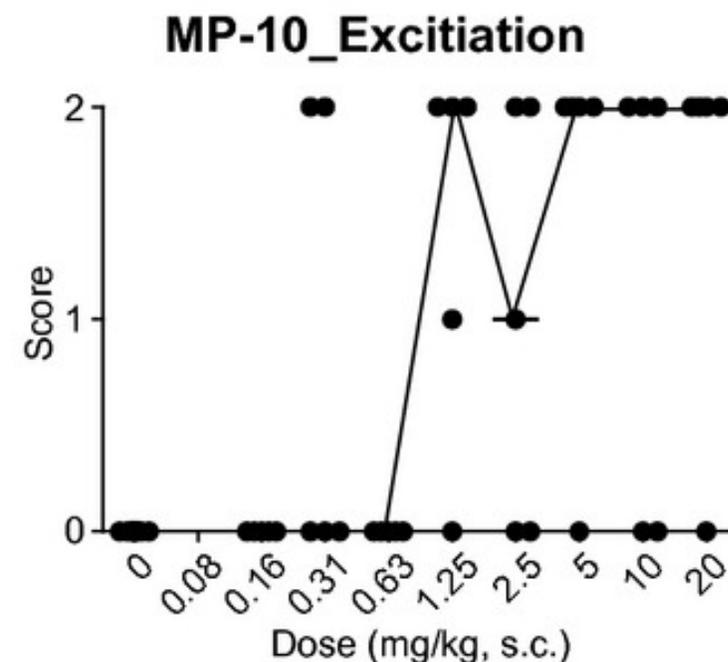
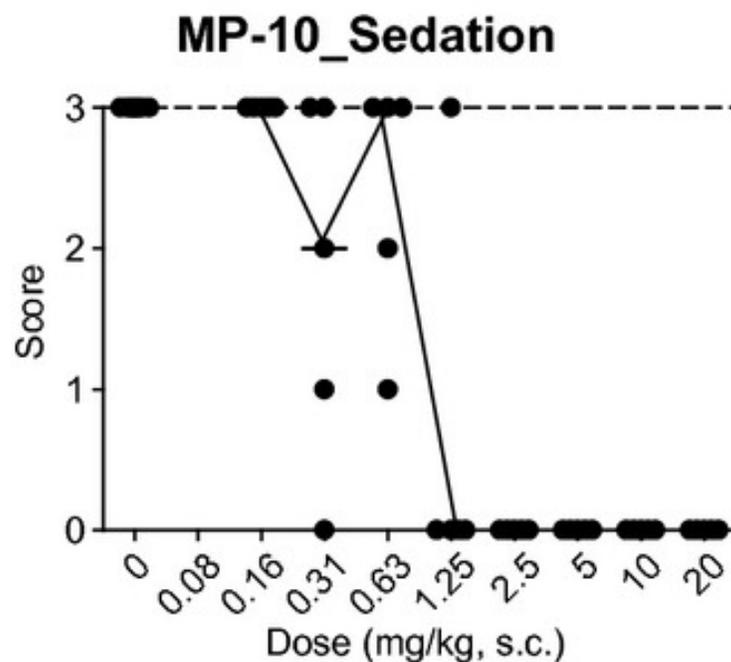
Фосфодиэстераза 10А как фармакологическая мишень

- Экспрессируется в MSNs;
- Ингибирование приводит к накоплению цАМФ;
- Ингибирование = «D1-агонисты» и «D2-антагонисты»;
- Использование как антипсихотиков или антипаркинсонических средств?



Парадоксальный стимулирующий эффект на двигательную активность

- В обычных условиях угнетающее «D2-антагонистическое» действие;
- «D1-агонистическое» действие только в условиях сниженной дофаминергической нейротрансмиссии.



Цель



Оценить развитие толерантности к стимулирующему действию ингибиторов фосфодиэстеразы 10А на двигательную активность крыс

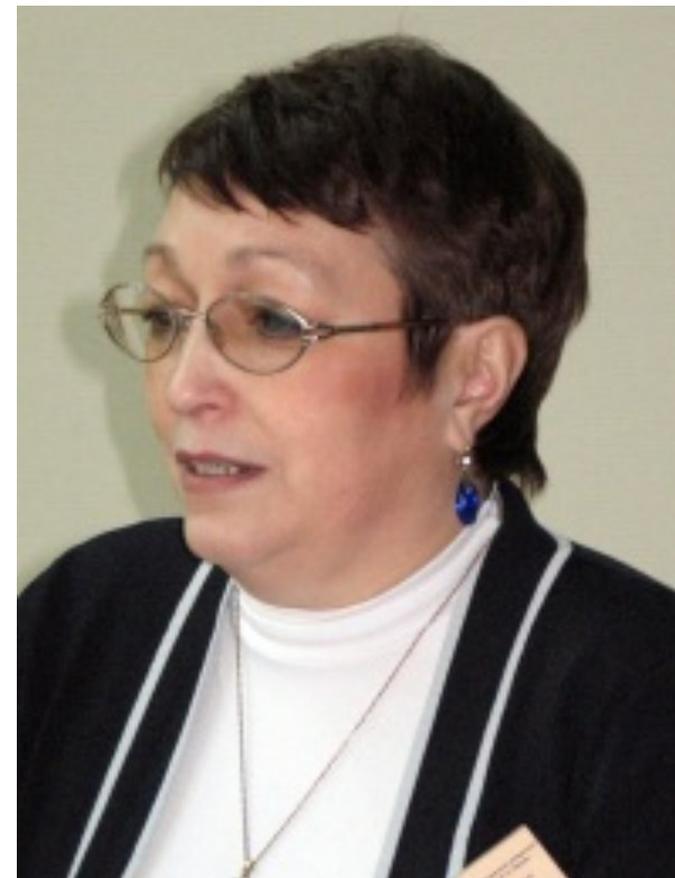
Материалы и методы

- Самцы крыс стока Вистар (200-400 г, 2-4 мес), групповое содержание в клетках TIV, вода и пища ad libitum, 12-ч световой цикл;
- Установка «Актометр» для оценки двигательной активности;
- Продолжительность экспериментальной сессии – 60 мин (+ возможность разбить на 5-мин отрезки);
- Измеряемый показатель: число последовательных пересечений пар фотодатчиков (ambulation).

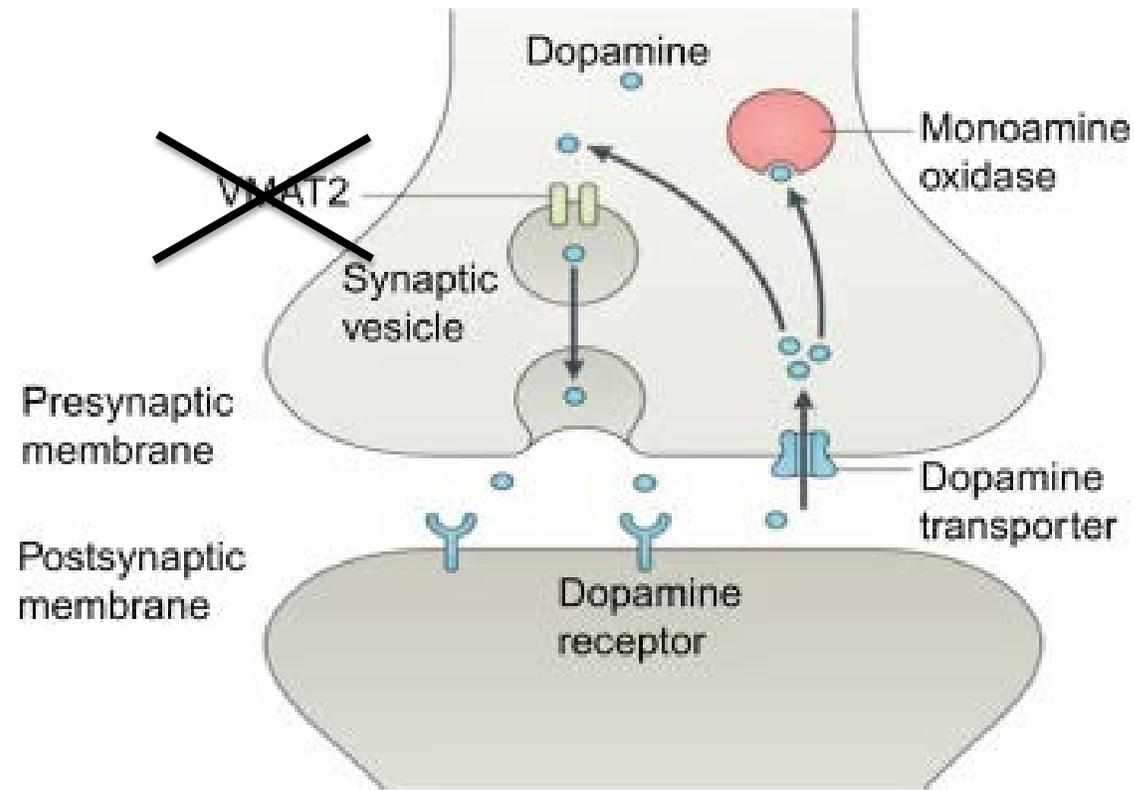


Материалы и методы

- Непараметрические методы:
 - U-test,
 - Kruskal — Wallis test (post-hoc: Dunnett's test, Tukey's test),
 - ANOVA on ranked data (post-hoc: Bonferroni's test);
- Статистические методы одобрены Е.В. Вербицкая перед началом экспериментов,
- Номер протокола Локального комитета ПСПбГМУ по работе с экспериментальными животными: #100_ИФ1_012017/3_900

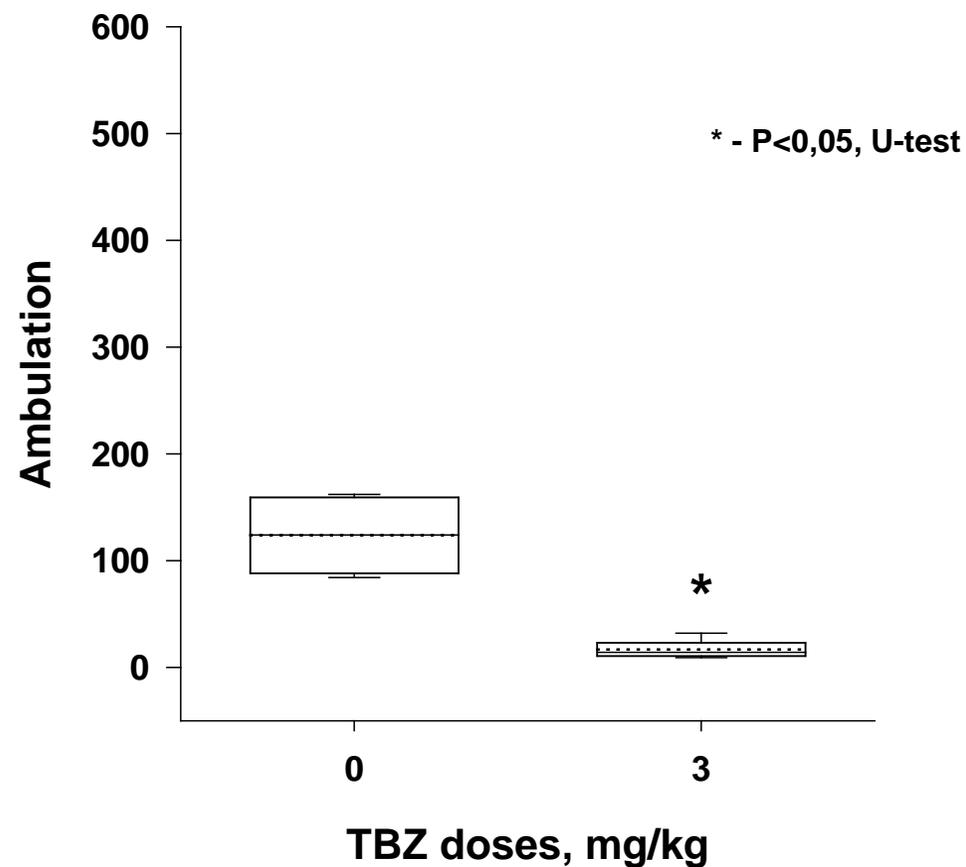


Модель гиподофаминергии: крысы, находящиеся под действием тетрабеназина



Эксперимент 1: валидация модели

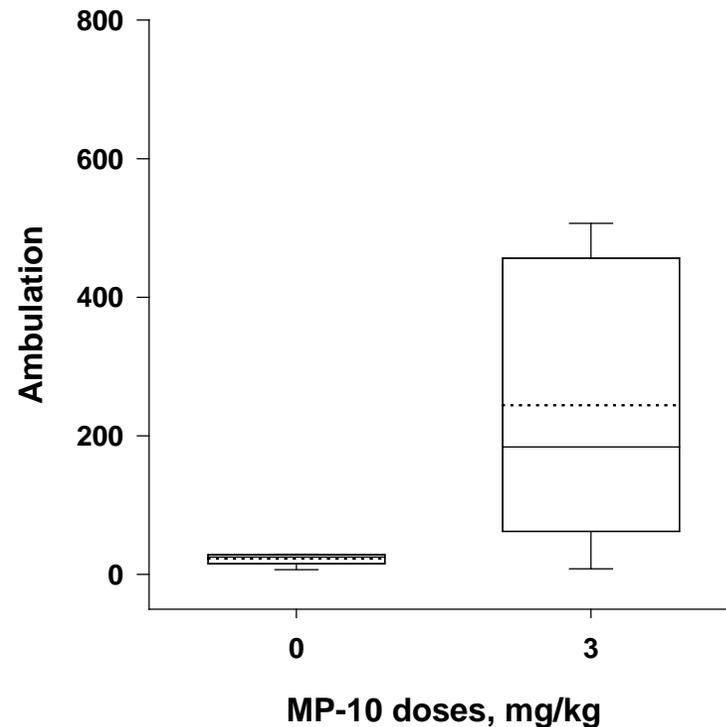
- Доза TBZ – 3 мг/кг;
- Время введения: 30 мин до начала экспериментальной сессии;
- N=11 (группа «растворитель» - 5; группа «TBZ» - 6);
- Нет пререгистрации;
- Без ослепления и рандомизации.



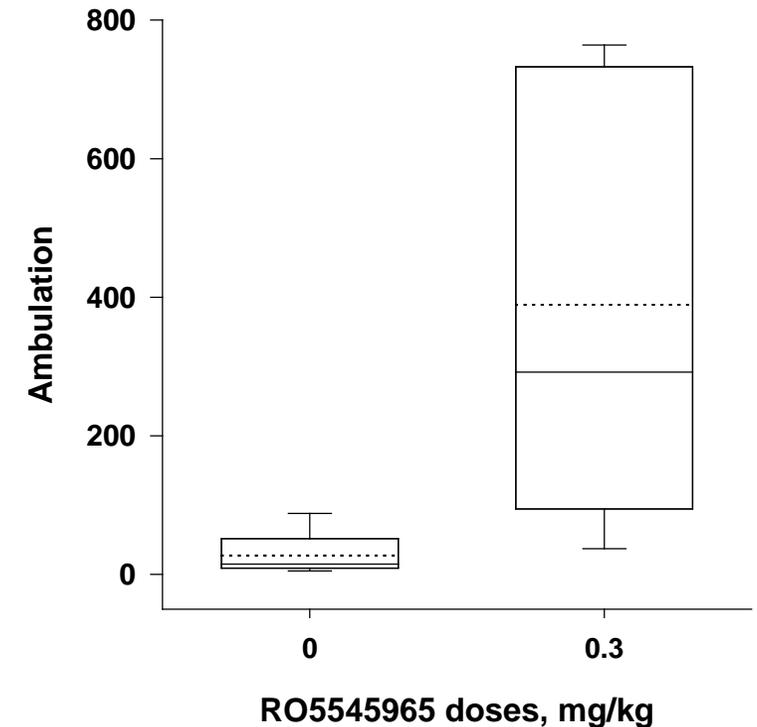
Эксперимент 2,3 (пилот): стимулирующее действие ФДЭ10Аи при однократном введении

- ФДЭ10А ингибиторы: МР-10 и RO5545965;
- Эксперимент 2: N=10 (группа «растворитель» - 5; группа «МР-10» - 5);
- Эксперимент 3: N=10 (группа «растворитель» - 5; группа «RO5545965» - 5);
- Нет пререгистрации;
- Без ослепления и рандомизации.

Эксперимент 2



Эксперимент 3



Расчёт выборки: стимулирующее действие ФДЭ10Аи при однократном введении

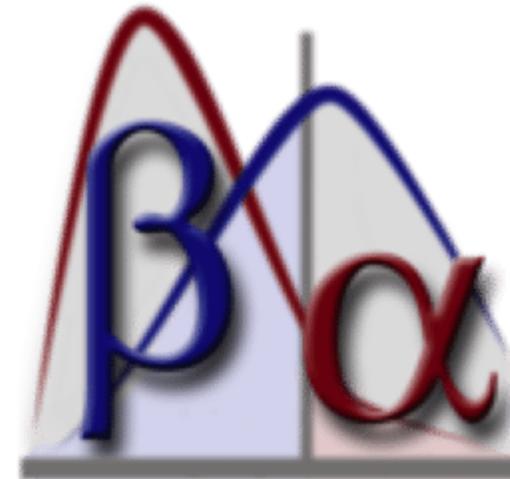
➤ G*Power 3.1;

➤ 4 группы;

➤ Расчёт выборки:

Для $\alpha=0.01$ и $\beta=0.8 \rightarrow 12$ крыс в группе

Для $\alpha=0.05$ и $\beta=0.8 \rightarrow 9$ крыс в группе.



Эксперимент 4,5,6 (подтверждающие): стимулирующее действие ФДЭ10Аи при однократном введении

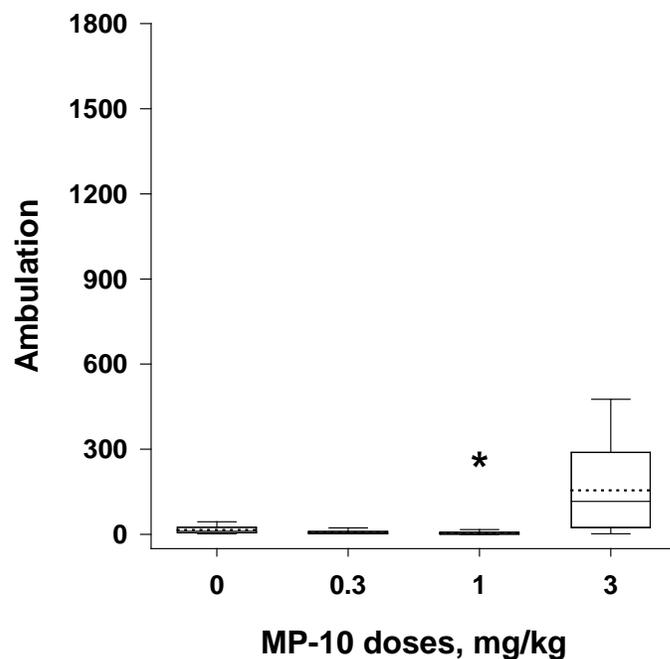
- Пререгистрация: preclinicaltrials.eu
 - Эксперимент 4: PCTE0000173
 - Эксперимент 5: без предрегистрации
 - Эксперимент 6: PCTE0000182
- Ослепление
 - введение растворов,
 - помещение животных в экс. установку,
 - перенос данных и их первоначальная обработка;
- Простая рандомизация (Excel, RAND);
- Эксперимент 4: MP-10 (0; 0,3; 1; 3 мг/кг), N=36;
- Эксперимент 5: MP-10 (0; 1; 3; 5 мг/кг), N=48;
- Эксперимент 6: RO5545965 (0; 0,03; 0,1; 0,3 мг/кг), N=36.



Эксперимент 4,5,6 (подтверждающие): стимулирующее действие ФДЭ10Аи при однократном введении

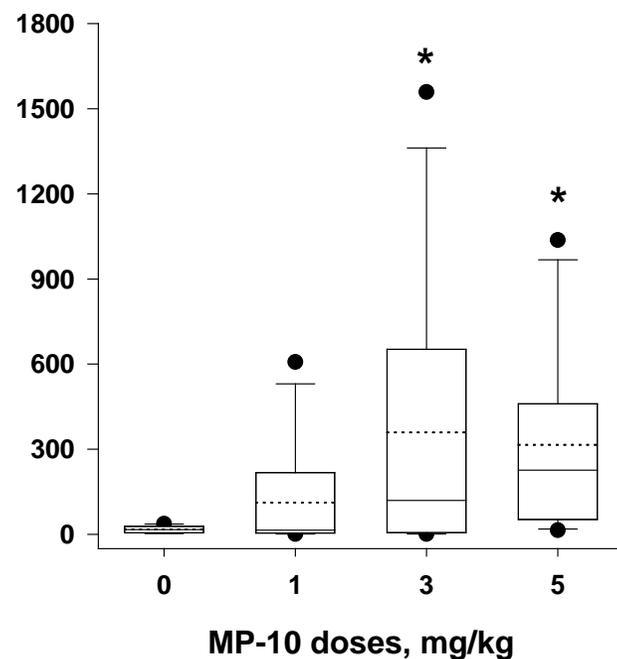
* - P<0.05, Dunnett's test

Эксперимент 4



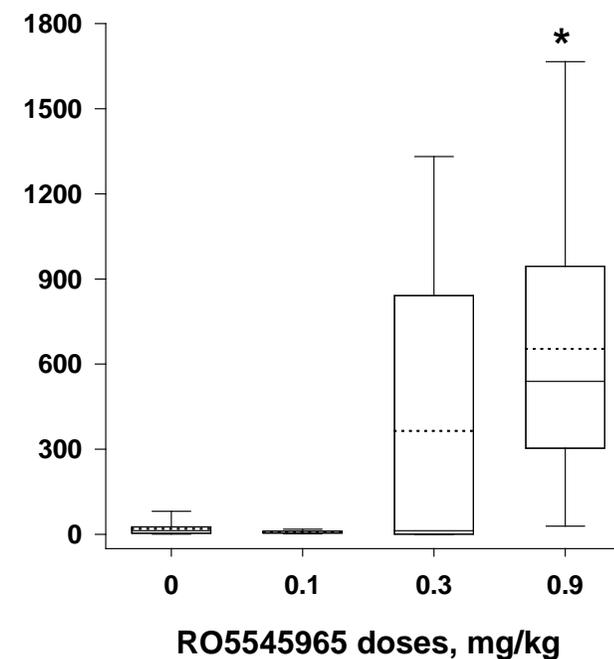
H = 15.0, df = 3, P = 0.002

Эксперимент 5



H = 11.9, df = 3, P = 0.008

Эксперимент 6



H = 14.2, df = 3, P = 0.003

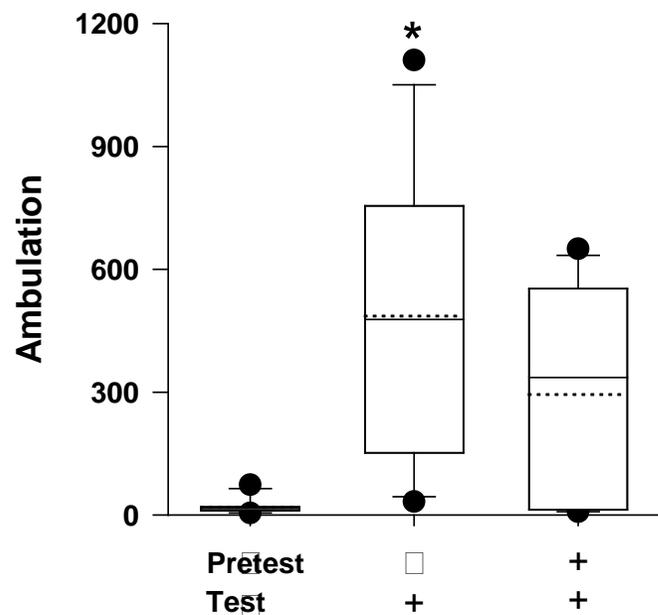
Эксперимент 7 (пилот): стимулирующее действие МР-10 при повторном введении

- Пререгистрация: РСТЕ0000181;
- Ослепление;
- Простая рандомизация;
- 5 введений: МР-10 3 мг/кг или р-ритель;
- N=33, 3 группы.

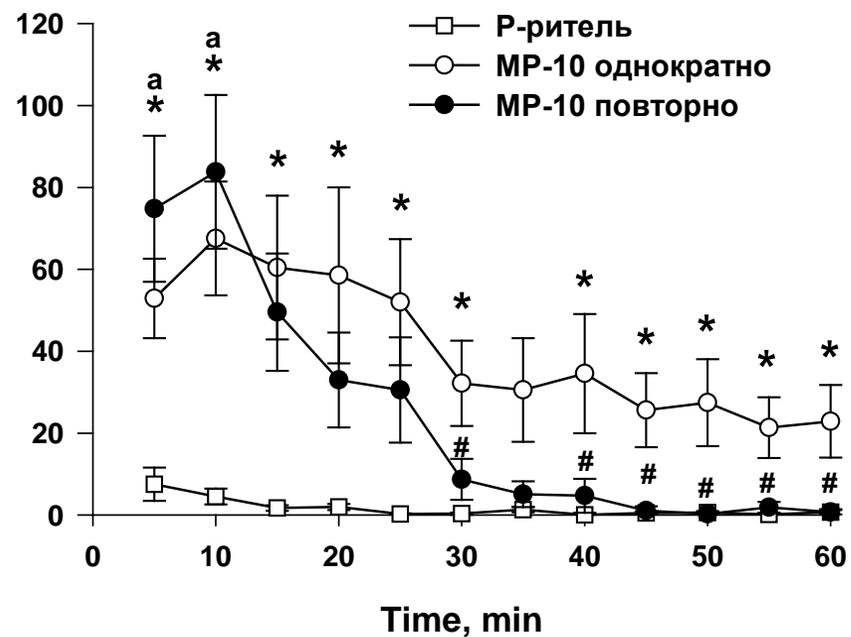
Группа	Р-ритель	МР-10 однокр	МР-10 повт
4-дневный претест	Р-ритель	Р-ритель	МР-10
Тест	Р-ритель	МР-10	МР-10

Эксперимент 7 (пилот): стимулирующее действие МР-10 при повторном введении

* - $P < 0.05$, МР-10 повторно vs Р-ритель
 а - $P < 0.05$, МР-10 однократно vs Р-ритель
 # - $P < 0.05$, МР-10 повторно vs МР-10 однократно
 Tukey's test или Bonferroni's test



$H = 15.8$, $df = 2$, $P < 0.001$



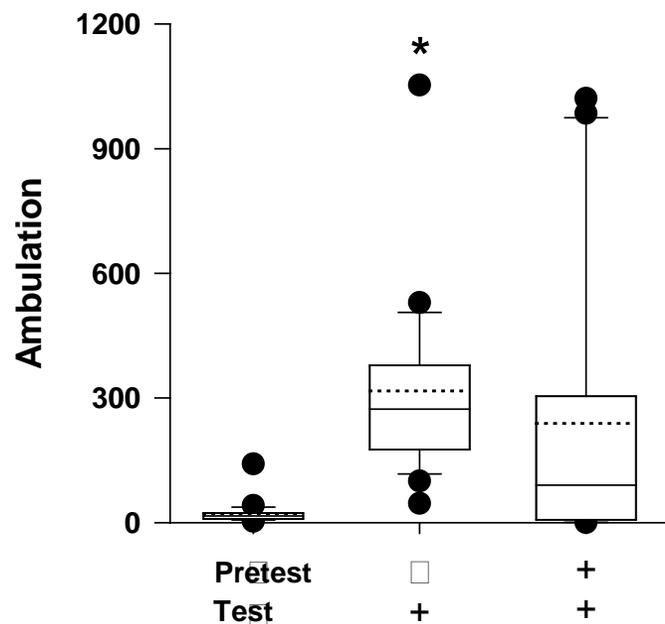
'group' x 'time': $F(22,49) = 2.2$, $P = 0.01$

Эксперимент 8 (подтверждающий): стимулирующее действие RO5545965 при повторном введении

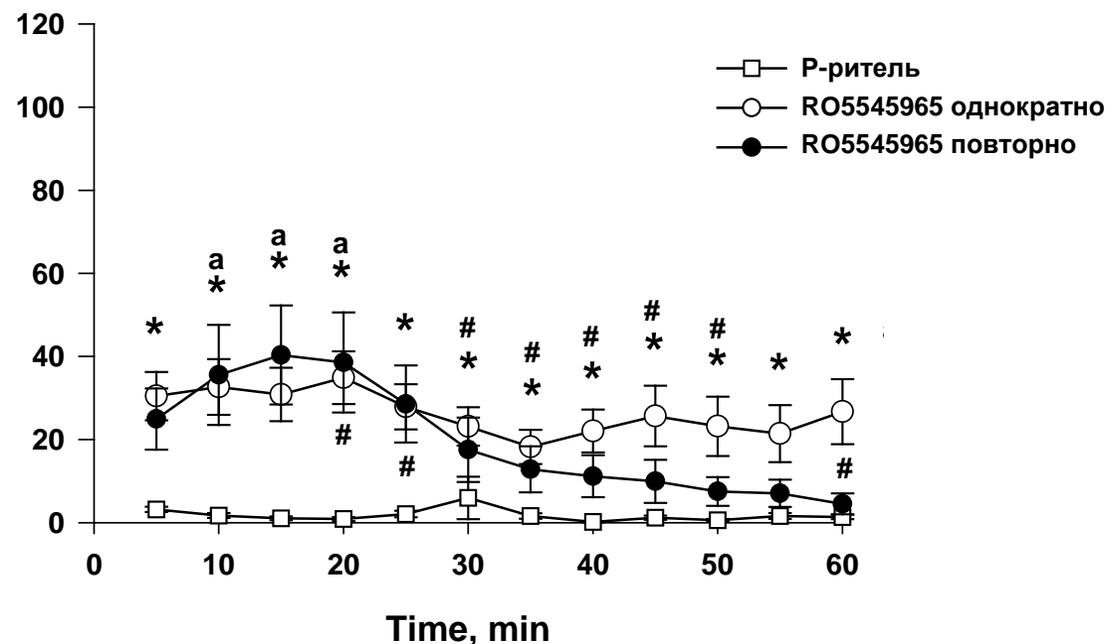
- Пререгистрация: PCTE0000218;
- Оценка выборки: R-language
Для $\alpha=0.025$ и $\beta=0.8$, 25 крыс в группе;
- Ослепление;
- Простая рандомизация;
- 10 введений: RO5545965 0,9 мг/кг или р-ритель;

Группа	P-ритель	RO5545965 однокр	RO5545965 повт
9-дневный претест	P-ритель	P-ритель	RO5545965
Тест	P-ритель	RO5545965	RO5545965

Эксперимент 8 (подтверждающий): стимулирующее действие RO5545965 при повторном введении



H = 15.7, df = 2, P < 0.001



'group' x 'time': F(22,98) = 2.0, P = 0.01

* - P<0.05, RO5545965 повторно vs P-ритель
a - P<0.05, RO5545965 повторно vs P-ритель
- P<0.05, MP-10 повторно vs RO5545965 однократно
Tukey's test или Bonferroni's test

Эксперимент 9 (подтверждающий): стимулирующее действие МР-10 при повторном введении

➤ Пререгистрация: РСТЕ0000244;

➤ Оценка выборки: R-language

25 крыс в группе;

➤ Ослепление;

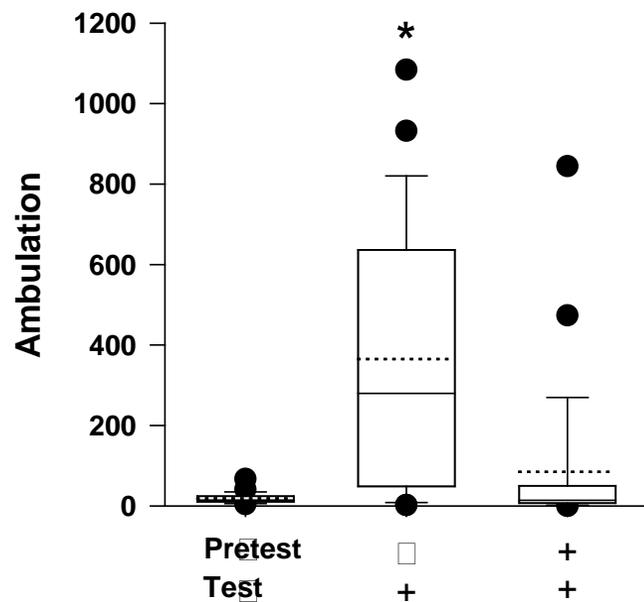
➤ Блочная рандомизация (R-language):

4 блока по 21 крысе;

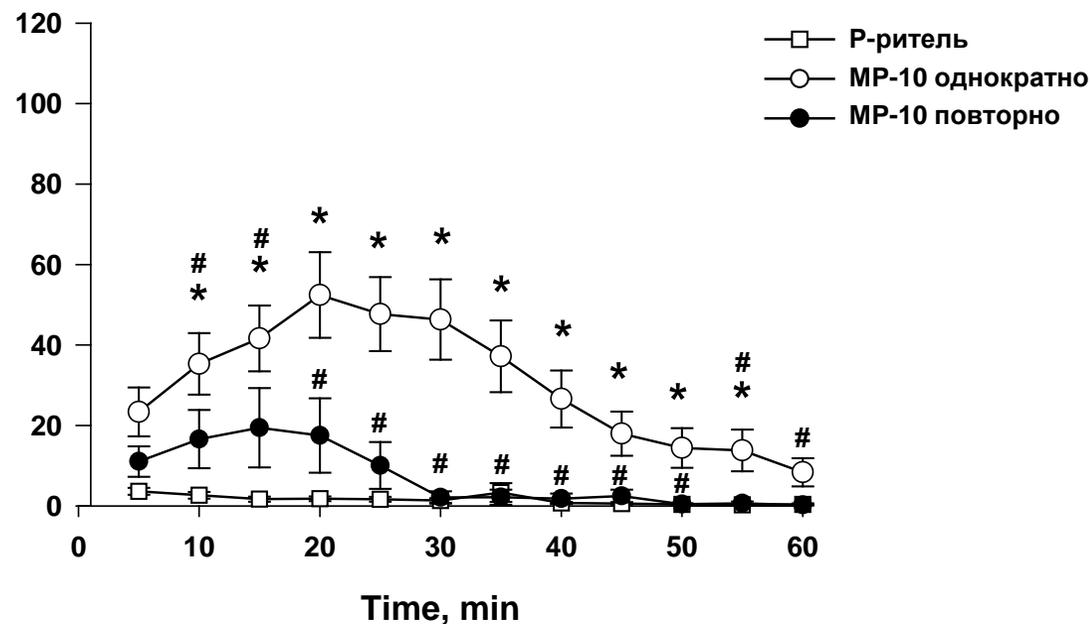
➤ 10 введений: МР-10 3 мг/кг или р-ритель;

Группа	Р-ритель	МР-10 однокр	МР-10 повт
9-дневный претест	Р-ритель	Р-ритель	МР-10
Тест	Р-ритель	МР-10	МР-10

Эксперимент 9 (подтверждающий): стимулирующее действие МР-10 при повторном введении



H = 23.3, df = 2, P < 0.001



'group' x 'bin': F(22,134) = 2.2, P = 0.003

* - P<0.05, МР-10 повторно vs P-ритель
- P<0.05, МР-10 повторно vs МР-10 однократно
Tukey's test или Bonferroni's test

Заключение



Повторное введение ингибиторов фосфодиэстеразы 10А сопровождается развитием толерантности к их стимулирующему действию на двигательную активность крыс.

Конфликт интересов



Автор декларирует отсутствие какого-либо конфликта интересов.

