

Načela eksperimentalnih (intervencijskih) istraživanja



Miroslav Benić* i Željko Mihaljević

Sažetak

U članku su iznesena načela eksperimentalnih istraživanja u epidemiologiji. Opisani su osnovni koraci u dizajniranju i provedbi istraživanja o kojima istraživač mora voditi računa. Navedene su prednosti i nedostaci eksperimentalnih istraživanja te mogući uzroci otklona rezultata koje istraživač mora imati na umu tijekom provedbe samog istraživanja i u analizi prikupljenih rezultata. Aktivna uloga istraživača u intervencijskim studijama ogleda se u dodjeljivanju jedinki prikladnih za studiju

u eksperimentalnu i kontrolnu skupinu (randomizacija), upoznavanju odabranih jedinki (ili vlasnika) s načelima studije i dobivanje njihovog pristanka za sudjelovanje, osiguranjem dovoljno dugog perioda praćenja odabranih jedinki te nepristranim odnosom prema sudionicima istraživanja, neovisno o pripadnosti skupini što se postiže ako je istraživanje temeljeno na načelima slijepog ili dvostruko slijepog pokusa.

Ključne riječi: epidemiologija, intervencijske studije, slučajni odabir

Uvod

Eksperimentalne studije su istraživanja u kojima sudjeluju dvije skupine jedinki: izložena i neizložena. Suštinska razlika između opservacijskih i intervencijskih studija je u tome što u eksperimentalnim studijama istraživač svojom voljom podvrgava jednu skupinu čimbeniku čiji učinak istražuje. Prednost ovog dizajna u odnosu na opservacijske studije ogleda se u činjenici što postiže puno veću validnost rezultata, pod uvjetom da su odabrane jedinke slučajnim odabirom razvrstane u skupine te ako je uzorak dovoljno velik. Intervencijskim studijama najčešće se istražuje učinak

nekeg lijeka ili postupka u terapiji i prevenciji bolesti.

Malo kada novi lijek ili postupak ima jasne i nesumnjive rezultate kao što je npr. imao penicilin na smanjenje broja smrtnih slučajeva od pneumokokne pneumonije (s 95 na 15 %). Intervencijska studija učinkovitosti činila se nepotrebnom, a i etički upitnom, budući je smrtnost višestruko smanjena upravo zbog lijeka. Puno češći je slučaj u praksi da je učinak lijeka ili preventivne mjere blag do umjeren sa svega 10-20 % razlike između terapijane/prevenirane i kontrolne skupine jedinki (Hennekens

Dr. sc. Miroslav BENIĆ*, dr. med. vet., (dopisni autor, e-mail: benic@veinst.hr), znanstveni savjetnik, naslovni docent, dr. sc. Željko MIHALJEVIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

i Buring, 1987.). Takav blagi učinak od interesa je za javno zdravstvo ako se radi o liječenju/prevenciji bolesti koje su česte u populaciji, a izazivaju visoku smrtnost. Ovako male razlike između dviju skupina teško je pouzdano utvrditi opservacijskim studijama budući da mogu biti posljedica utjecaja nekog drugog nekontroliranog čimbenika (engl. *confounding*). Intervencijske studije u osnovi se mogu podijeliti u terapijske i preventivne.

Terapijski pokusi provode se na pacijentima koji boluju od određene bolesti prateći učinak primjene novog lijeka ili terapijskog postupka na ublažavanje simptoma, remisiju bolesti i/ili smanjenje stope smrtnosti.

Preventivnim pokusima istražuje se učinak lijeka/postupka na smanjenje rizika od nastanka određenih bolesti među jedinkama koje su slobodne od te bolesti na početku pokusa. Istraživanje preventivnog učinka može se provesti na zdravim jedinkama koje su izložene uobičajenoj razini rizika za razvoj neke bolesti ili su pripadnici skupine koja je izložena visokom riziku za nastanak neke bolesti. Pokusi u kojima se istražuje terapijski učinak lijeka/postupka prividno se uvijek provode na jedinkama, dok se preventivni pokusi mogu provoditi na jedinkama i na cijelim populacijama (Hennekens i Buring, 1987.).

Uloga istraživača

U opservacijskim studijama uloga istraživača je pasivno promatranje. U intervencijskim studijama istraživač preuzima aktivnu ulogu budući da raspoređuje odabrane jedinke u pokusnu i kontrolnu skupinu.

Eksperimentalne se studije mogu provoditi u strogo kontroliranim uvjetima okoliša (klasični pokus) ili u stvarnim životnim uvjetima (kontrolirani terenski ili klinički pokus). U laboratorijskim uvjetima pokus se može izvoditi *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* pokus podrazumijeva

provedbu pokusa u umjetno stvorenom okolišu izvan živog organizma. Premda su *in vitro* pokusi važni za prikupljanje dokaza o uspješnosti liječenja/terapije koja je predmet istraživanja ipak predstavljaju samo preliminarni korak u istraživačkom procesu. *In vivo* pokusi mogu se izvoditi na ciljanoj vrsti na koju se namjerava primijeniti istraživani lijek ili na životinjskim modelima, na primjer laboratorijskim miševima (Sargeant, 2014.).

Intervencijske studije koje se provode na ljudima suočavaju se i s etičkom dimenzijom istraživanja. Naime u slučaju testiranja novog lijeka mora postojati dovoljna sumnja u njegovu djelotvornost da ga se uskrati polovici pacijenata, a s druge strane mora postojati dovoljno snažno uvjerenje u učinak lijeka da mu se izloži polovica sudionika koji su osim toga prikladni za studiju i voljni sudjelovati u istraživanju. Štetnim tvarima i postupcima istraživač ne smije izlagati pacijente, međutim može se istraživati učinak uskraćivanja ili prestanka korištenja određenih štetnih tvari, npr. učinak odricanja od pušenja na pojavu bolesti. U skladu s prethodnim je i pravilo da dokazano korisna terapija ne smije biti uskraćena niti jednom pacijentu. U mnogim je slučajevima nedovoljno podataka bilo u jednom ili drugom smjeru. Stoga u slučajevima kada nema pouzdanog odgovora o učinku neke terapije nema dvojbe oko etičnosti provođenja pokusa nego oko toga je li etično ne nastaviti istraživanje.

Izvedivost studija ponekad je upitna zbog primjene mjera/postupaka koji postaju općeprihvaćeni u široj populaciji čak i kada nema pouzdanih dokaza u korisnost takvih mjera. Na primjer uzimanje vitaminsko-mineralnih dodataka prehrani postalo je prošireno zbog uvjerenja da smanjuju rizik od nekih bolesti premda za to nema čvrstih medicinskih dokaza. Tržište ovim proizvodima tako brzo raste, a broj jedinki koje svakodnevno uzimaju ovakve pripravke svakog se

dana povećava do te mjere da će navika uzimanja ovih pripravaka postati opće-prihvaćena pa intervencijske studije o učinkovitosti više neće biti moguće.

Troškovi izvođenja kliničkih pokusa u prošlosti su bili puno veći od troškova provođenja opservacijskih studija (Pfeiffer, 2010.). Naime, zdravstveno stanje odabranih jedinki i terapija prosuđivano je pojedinačno, podvrgavani su periodično opsežnim medicinskim pretragama u klinikama i bolnicama, što je bitno utjecalo na troškove istraživanja. Suvremeni pristup eksperimentalnim studijama na većem broju jedinki uz strogo propisane protokole, smanjuje troškove i vrijeme pa je cijena izvođenja ovih studija ujednačena s cijenom opservacijskih studija iste veličine uzorka.

Odabir jedinki

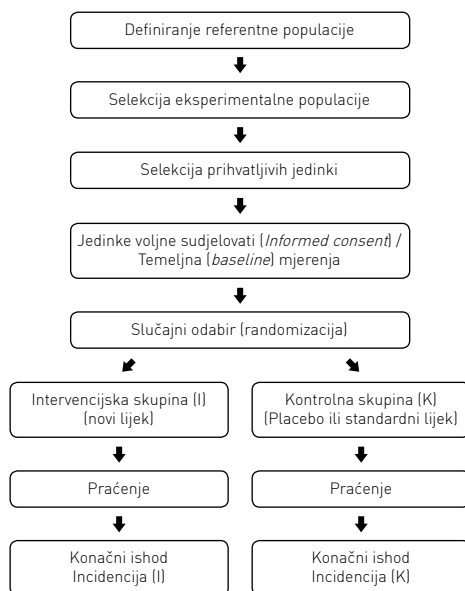
Referentnom populacijom smatra se općenita skupina u kojoj istraživač predviđa primjenjivost dobivenih rezultata. Referentna populacija može uključivati cjelokupnu populaciju jedinki ukoliko istraživač smatra da će rezultati biti univerzalno primjenjivi na sve članove. Međutim, referentna populacija može biti reducirana na jedinke s određenog geografskog područja, određene dobi, jednog spola ili neke druge značajke za koju se zna da može modificirati učinak lijeka/postupka koji je predmet istraživanja.

Eksperimentalna populacija je skupina jedinki na kojoj se istraživanje provodi. Ova se skupina ne bi smjela od referentne skupine razlikovati na način koji bi kasnije onemogućio primjenjivost rezultata na referentnu skupinu. Eksperimentalna skupina mora biti dovoljno velika da je iz nje moguće uzeti dovoljno veliki uzorak za pokus (Thrusfield, 1995.).

Analogno tome, eksperimentalna populacija mora biti dovoljno velika da bi iznjedrila dovoljan broj ishoda od interesa (engl. *outcomes*) za istraživanje koji će omogućiti usporedbu različitih

režima tretiranja/postupaka u razumnom vremenskom roku. Veliki izazov u izvođenju kliničkih pokusa je i odabir eksperimentalne skupine koju je moguće pratiti za vrijeme trajanja pokusa. Izvođenje dugotrajnog pokusa u skupini jako mobilnih jedinki može rezultirati napuštanjem pokusa od strane većeg broja uključenih jedinki, što krajnje rezultate čine nemogućim interpretirati.

Nakon što je eksperimentalna skupina definirana, članove skupine treba detaljno upoznati sa studijom, ciljem, procedurom i mogućim rizicima i koristima od sudjelovanja u studiji. Subjekte voljne sudjelovati tada treba prosuditi odgovaraju li prema prethodno definiranim kriterijima. Razlog za isključenje nekih jedinki može biti ako je u povijesti bolesti jedinke već zabilježen neki od ishoda koji će se pratiti u studiji. Konačnu populaciju koja će stvarno biti uključena u studiju čine jedinke koje su voljne sudjelovati i ispunjavaju prethodno zadane kriterije (dos Santos Silva, 1999.).



Grafikon 1. Koraci u dizajnu eksperimentalnih (intervencijskih) istraživanja

Prednosti eksperimentalnih studija

Odabrane jedinice prikladne za studiju i voljne sudjelovati u studiji dodjeljuju se pokusnoj i kontrolnoj skupini slučajnim odabirom (randomizacija). Slučajni odabir u ovom slučaju znači da svaki sudionik ima jednaku vjerojatnost biti dodijeljen u neku od skupina koje su podvrgnute različitim tretmanima te da je vjerojatnost da će ta jedinka biti dodijeljena u određenu skupinu neovisna o vjerojatnosti da će u istu skupinu biti dodijeljena neka druga jedinka (Süt, 2014.). Razvrstavanje u skupine provodi se pomoću tablice slučajnih brojeva ili primjenom računalne aplikacije. Ako ishod koji se prati u studiji različit između podskupina npr. između spolova ili varira između jedinki, ovisno o npr. stanju uznapredovalosti bolesti, učinkovitost studije može se unaprijediti na način da se formiraju ujednačene podskupine u odnosu na takve značajke. U tom slučaju randomizacija jedinki nešto je složenija i naziva se blokiranje pri čemu se svaka jedinka klasificira u odnosu na značajku, a potom dodjeljuje pokusnoj ili kontrolnoj skupini unutar podskupine (Pfeiffer, 2010.).

Prednost randomizacije nad ostalim načinima dodjeljivanja pojedinim skupinama ogleda se u tome što, ako je pravilno provedena, nitko od uključenih istraživača ne zna kojoj skupini je jedinka priključena, počevši od osobe koja je utvrđivala prikladnost jedinice za studiju pa do osobe koja je odgovorna za dodjeljivanje pojedinim skupinama u studiji. Time je isključena mogućnost otklona rezultata istraživanja (engl. *bias*) i istraživač na kraju može biti siguran da opažena razlika između skupina nije rezultat selektivnog dodjeljivanja jedinice skupini s određenim tretmanom. Drugi načini dodjeljivanja jedinice nekoj od skupina uključenih u istraživanje skloni su otklonu rezultata. Npr. ako su u isto vrijeme dvije jedinice prikladne za uključivanje u

studiju i voljne sudjelovati, ali s različitim prognozama bolesti, liječnik/veterinar može ih, svjesno ili nesvjesno, razvrstati tako da teže bolesnu jedinku dodijeli pokusnoj skupini koja dobiva lijek za koji unaprijed vjeruje da je učinkovit. Ako je veći broj jedinki uključen u studiju po ovom načelu, načinjen je ozbiljan nesklad između skupina u odnosu na čimbenik koji može utjecati na krajnji ishod studije. Stvarno obećavajući tretman/liječnik može se u istraživanju pokazati manje učinkovitim ako je primijenjen na skupini jedinici koje ne mogu od bilo kakve terapije polučiti korist.

Druga prednost randomizacije ogleda se u činjenici da su skupine formirane na ovaj način međusobno usporedive u odnosu na sve ostale promatrane čimbenike osim u odnosu na primjenu ispitivanog lijeka/tretmana. Što je veći uzorak odabran u studiju to su ovi čimbenici ravnomjernije distribuirani (Clancy, 2002.).

Osim toga, randomizacija osigurava i ravnomjeran raspored poznatih i nepoznatih čimbenika koji mogu utjecati na rezultat studije (engl. *confounding*). Stoga se u intervencijskim studijama u kojima se jedinice u pojedine skupine dodjeljuju slučajno, postiče takva razina sigurnosti u pogledu usporedivosti pojedinih skupina, kakvu nije moguće postići niti jednim opservacijskim tipom dizajna (Pfeiffer, 2010.).

Nedostatci eksperimentalnih studija

Intervencijske studije podrazumijevaju aktivno sudjelovanje odabranih jedinki (ili vlasnika) i suradnju s istraživačem. Poteškoće s kojima se susreću istraživači u ovim studijama brojne su i često su posljedica postupanja jedinice mimo propisane procedure, zaboravljanja uzimanja lijeka koji se istražuje, neželjenih nuspojava lijeka ili jednostavno odustajanja od sudjelovanja u studiji. Ponekad jedinice odustaju mimo svoje volje, kao što je na-

glo pogoršavanje zdravstvenog stanja pri čemu terapija postaje kontraindicirana. Odustajanje od sudjelovanja u studiji povezano je s duljinom trajanja studije i sa složenošću propisane procedure. Stoga je jedna od zadaća pri pokretanju ovakve studije osigurati što višu razinu zadržavanja odabranih jedinki do kraja studije. Ona se može postići na više načina. Jedan od načina je odabir populacije koja je zainteresirana i pouzdana. Pripadnici dijela populacije koji u većem stupnju rizika za razvoj neke bolesti u odnosu na ostatak populacije u načelu su motiviraniji za sudjelovanje u studiji. Nadalje, način da se uključene jedinke (vlasnici) zadrže u studiji je redoviti kontakt s istraživačem putem kućnih posjeta, posjeta klinici, telefonom, poštom, obilježavanjem lijeka koji se testira na način da je na svakoj zapakiranoj dozi napisan datum kada ju treba uzeti.

Tijekom provođenja studije istraživač mora pratiti koliko je aktivnih sudionika, budući da svako odustajanje smanjuje statističku snagu studije da detektira stvarni učinak novog lijeka/tretmana koji se istražuje.

Praćenje učinaka (engl. *follow up*)

Pri izvođenju intervencijske studije treba definirati ishode (engl. *outcomes*) koji su od interesa za istraživača i koje će pratiti. Primarni cilj kada je u pitanju detekcija ishoda primjene istraživnog lijeka je osigurati način detekcije koji mora biti takav da pripadnost pokusnoj ili kontrolnoj skupini ne utječe na vjerojatnost njegova otkrivanja. Drugim riječima, praćenje jedinki uključenih u studiju mora biti jednako i potpuno bez obzira na pripadnost skupini.

U studijama koje traju dulji vremenski period teže je osigurati potpuno praćenje svih ishoda terapije/postupka. Ako dio ishoda prođe nezabilježen, a podjednak broj „izgubljenih“ ishoda je u svim praćenim skupinama, mala je vjerojatnost

otklona krajnjih rezultata. Nasuprot tome, ako broj nezabilježenih ishoda u nekoj od studijskih skupina znatno odstupa od drugih skupina rezultat može biti podcjenjivanje ili precjenjivanje učinka lijeka/postupka. Jedini način za spriječiti otklon rezultata je zadržati u studiji što veći broj uključenih participanata, a odustajanje od studije svesti na najmanju moguću mjeru.

Opasnost mogućeg otklona rezultata postoji u intervencijskim studijama ukoliko pri ustvrđivanju ili prijavljivanju ishoda primjene lijeka/postupka na kliničara utječe saznanje kojoj skupini pripada jedinka čije stanje utvrđuje (engl. *observational bias*).

Stoga je važno da, ako je ikako moguće, istraživač ne zna kojoj skupini pripada jedinka sve do trenutka kada su svi podaci za studiju prikupljeni. O dvostruko slijepom pokusu govorimo kada ni istraživači ni jedinke uključene u studiju do samog kraja ne znaju kojoj skupini pripadaju. Dvostruko slijepi dizajn moguće je provesti pri testiranju lijeka pri čemu poredbena skupina dobiva placebo. Pokusnu skupinu od kontrolne gotovo je nemoguće razlikovati, što sprječava otklon rezultata. Međutim, istraživač se u ovakvom slučaju suočava s drugom poteškoćom, a to je sklonost pacijenta/vlasnika da iznese favorizirajuće odgovore za učinak lijeka, premda nema opipljivih rezultata koji bi to potkrijepili (tzv. placebo efekt).

Ukoliko u studiju nije uključena placebo skupina nije moguće odrediti je li subjektivni dojam pacijenta nastao kao učinak lijeka ili pacijentova uvjerenja u korisnost lijeka.

Drugi problem s kojim se istraživač suočava je činjenica da osobe koje uzimaju lijekove ili su podvrgnute nekom medicinskom postupku mogu biti osjetljive zbog svog zdravstvenog stanja i nastoje prikazati svaki simptom ili neuobičajenu pojavu u svezi s tretmanom. Uključivanjem placebo skupine može se

utvrditi utjecaj lijeka/postupka na pojavu pojedinih simptoma.

Dvostruko slijepi pokus teže je provesti, a ponekad i nemoguće jedinku uključenu u studiju i istraživača lišiti saznanja o pripadnosti pokusnoj ili kontrolnoj skupini. Ukoliko se ipak provodi dvostruko slijepi pokus, mora imati razrađen postupak za saznati kojoj skupini jedinka pripada u slučaju pojave štetnih nuspojava ili stanja koja mogu zahtijevati hitni medicinski tretman na jedinki. Ukoliko je riječ o jednostruko slijepom pokusu, istraživaču je poznato kojoj skupini pripada jedinka, dok u otvorenom pokusu i istraživač i jedinka znaju kojoj skupini pripada jedinka uključena u pokus. Jednostruko slijepi ili otvoreni pokus jednostavniji su za provođenje, ali je veća mogućnost otklona rezultata. Npr. sudionici koji nisu uključeni u pokusnu skupinu, odnosno ne dobivaju novu terapiju, zbog razočaranosti mogu izgubiti interes za daljnje sudjelovanje u studiji. S druge strane, znanje istraživača o statusu jedinke u studiji može utjecati na registriranje nuspojava ili dijagnosticiranje ishoda istraživanja. Stoga, ako nije moguće provesti dvostruko slijepi pokus, posebnu pozornost treba usmjeriti na sprječavanje mogućeg otklona rezultata. Objektivni kriteriji moraju se poštivati pri mjerenju i bilježenju nuspojava kao i krajnjeg ishoda pokusa. Skupine jedinki

uključenih u studiju moraju se pratiti istim intenzitetom, a osobe koje obavljaju ispitivanja na jedinkama moraju biti neovisne i bez znanja o tome kojoj skupini pripadaju jedinke.

Zaključak

Intervencijske studije teže je provesti za provesti nego opservacijske zbog etičkih dvojbi, izvedivosti i visokih troškova. Međutim, ako su provedene na dovoljno velikom uzorku, slučajno odabranih jedinki prikladnih za studiju, ako su pažljivo provedeni i analizirani, pružaju najjaču i najizravniju epidemiološku potporu u prosudbi o postojanju uzročno-posljedične veze.

Literatura

1. HENNEKENS, C. H. and J. E. BURING (1987): Epidemiology in Medicine. Lippincott Williams & Wilkins.
2. CLANCY, M. J. (2002): Overview of research designs. *Emerg. Med. J.* 19, 546-549.
3. DOŠ SANTOS SILVA, I. (1999): Cancer epidemiology: principles and methods. International agency for research on cancer, World health organisation.
4. PFEIFFER, D. (2010): Veterinary epidemiology – An introduction. Wiley Blackwell.
5. THRUSFIELD, M. (1995): Veterinary epidemiology. Blackwell science, Second edition.
6. SARGEANT, J. M., D. F. KELTON and A. M. O'CONNOR (2014): Study designs and systematic review of interventions: Building evidence across study designs. *Zoon Public Health* 61, 10-17.
7. SŪT, N. (2014): Study Designs in Medicine. *Balkan Med. J.* 31, 273-277. <http://doi.org/10.5152/balkanmedj.2014.1408>.

Principles of experimental (interventions) in research

Miroslav BENIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Željko MIHALJEVIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

The article describes the basic principles of intervention study design in epidemiology. The necessary steps that should be considered during study design and performing such studies are highlighted. The article provides insight into the advantages and disadvantages of this type of study and possible sources of bias. The researcher's active role in intervention studies is seen through the randomisation of eligible sub-

jects into the intervention or control group, by obtaining informed consent from study subjects (or their owners), by ensuring sufficiently long periods of follow up, and taking an unbiased approach to all enrolled study subjects, regardless of the group. This can be achieved through the blind or double-blind study design.

Key words: *epidemiology; intervention studies; randomisation*