



Stephen H. Jenkins

AKO FUNGUJE VEDA

HODNOTENIE DÔKAZOV V BIOLÓGII A MEDICÍNE

preklad a poznámky Roman Mezencev

Obsah

1. Úvod	13
2. Prospievajú vitamín C a iné antioxidanty zdraviu? <i>Použitie observačných a experimentálnych štúdií pri overovaní lekárskech hypotéz</i>	22
3. Dokážu policajné psy identifikovať páchatelov podľa telesného pachu? <i>Použitie experimentov na testovanie hypotéz o správaní zvierat</i>	42
4. Čo viedlo k vývojovým poruchám a úbytku populácií žiab? <i>Testovanie ekologických hypotéz na základe komplementárnych pozorovaní a experimentov</i>	57
5. Ako hľadajú zvieratá uloženú potravu? <i>Silná inferencia pri testovaní alternatívnych hypotéz</i>	75
6. Čo spôsobuje rakovinu? <i>Zložitosť kauzálnych vzťahov</i>	92
7. Prečo starneme? <i>Rôzne úrovne príčin, ktoré sa vzájomne dopĺňajú</i>	110
8. Aký vplyv má káva na zdravie? <i>Kombinovanie výsledkov viacerých štúdií</i>	131
9. Ako ovplyvnia klimatické zmeny šírenie chorôb? <i>Modelovanie a úskalia predpovedí</i>	151
10. Záver <i>Ako funguje veda a aká je jej úloha v spoločnosti</i>	170

Príloha 1. Použitie údajov o dvojčatách na odhad príspevku genetických a environmentálnych faktorov k riziku ochorenia na rakovinu	179
Príloha 2. Presnosť a sila štatistických testov	181
Poznámky autora	184
Vysvetlivky prekladateľa	194
Literatúra	217
Index	229

Kapitola 2

Prospievajú vitamín C a iné antioxidanty zdraviu?

Použitie observačných a experimentálnych štúdií pri overovaní lekárskeho hypotéz

Linus Pauling bol veľmi tvorivý vedec-chemik, ktorému boli udelené dve Nobelove ceny. Prvú dostal v roku 1954 za chémiu, za zásadný prínos k poznaniu štruktúry molekúl, a druhú Nobelovu cenu mu udelili roku 1962 za mier, a to za úsilie proti šíreniu jadrových zbraní. Pauling nemal ďaleko od toho, aby sa stal jediným človekom, ktorý by bol dostal tri Nobelove ceny, ale nakoniec sa mu nepodarilo predbehnúť Watsona a Cricka pri objave štruktúry DNA. Na sklonku svojho dlhého života sa Linus Pauling stal hlásateľom myšlienky o výhodách užívania vysokých denných dávok vitamínu C pre zdravie človeka. Sám som sa zúčastnil na jednej z jeho prednášok o vitamíne C. Bolo to v roku 1985, keď vtedy už 84-ročný Pauling vystupoval pred veľkým a hlavne nadšeným publikom na Nevadskej univerzite v Rene. Bol to veľmi presvedčivý rečník, ktorý využíval svoj osobný šarm, humor a celý arzenál vedeckých údajov a skúseností na to, aby odrazil kritikov. Vlastné myšlienky zhrnul v knihe *Vitamín C a nachladnutie*, ktorá prvýkrát vyšla v roku 1970. Napriek tomu, že pre širokú verejnosť bolo o výžive napísaných veľa kníh, iba málokto sa svojím vplyvom môžu porovnávať s touto Paulingovou knihou. Do istej miery je to tým, že Paulingova vedecká autorita dávala jeho myšlienkam automaticky vysokú dôveryhodnosť. Jeho názory na vitamín C sa ľahko prijímajú prinajmenšom preto, že bol expertom v oblasti biochémie, aj keď vo všeobecnosti nie je múdre nekriticky prijímať cudzie názory. Jeho myšlienky podnietili viacerých bádateľov k tomu, aby sa pokúsili overiť hypotézy o priaznivom účinku vitamínu C a použili pri tom metódy, ktoré demonštrujú silné i slabé stránky analytických aj experimentálnych prístupov pre zodpovedanie medicínskych otázok. V ďalšom texte spoločne prejdeme cez tieto výsledky a dôkazy, aby ste sami zvážili ich hodnotu a najmä, aby ste precítili radosť z poznania a dôslednej analýzy vedeckých problémov.

Nedostatočný príjem vitamínu C vedie k ochoreniu nazývanému skorbut. Medzi jeho príznaky patrí únava, suchosť kože, pomalé hojenie rán a krvácanie do kože, kĺbov a sliznice dutiny ústnej. Skorbut sa veľmi často vyskytoval u námorníkov počas dlhých plavieb a hoci bol nedostatok vitamínu C odhalený ako príčina skorbutu až v roku 1911, v britskom námorníctve

už koncom 18. storočia vedeli, že skorbutu možno ľahko predchádzať konzumáciou čerstvého ovocia a zeleniny. V súčasnosti je skorbut v rozvinutých krajinách zriedkavým ochorením, s výnimkou alkoholikov a osôb s psychickými chorobami.

Na prevenciu skorbutu stačí iba 10 mg vitamínu C denne, pričom podľa Výboru Národnej akadémie vied USA pre potraviny a výživu je denná odporúčaná dávka tohto vitamínu 90 mg pre mužov a 75 mg pre ženy (Food and Nutrition Board, 2000). Takéto dávky úplne stačia na prevenciu skorbutu aj u osôb, ktoré nepožili vitamín C počas celého mesiaca, a údaje môžu mať aj nejaké ďalšie priaznivé účinky, ktoré Výbor pre potraviny a výživu bližšie nešpecifikuje. Na druhej strane sú však tieto odporúčané dávky hlboko pod dávkami, ktoré sú vo verejnosti vnímané ako zdraviu prospešné. Napríklad môj lekár zvyčajne odporúča 500 mg vitamínu C denne na spomalenie starnutia a na ochranu srdcovo-cievneho systému. Podľa výsledkov nedávnych prieskumov až dve tretiny ľudí, ktorí v USA vyhľadali lekársku pomoc pre nachladnutie verili, že vitamín C zmiernil príznaky ich ochorenia (Brown et al., 2000). Aké vlastne existujú dôkazy o tom, že vysoké dávky vitamínu C pomáhajú pri nachladnutí alebo iných zdravotných problémoch?

Viacerí vedci v tejto súvislosti publikovali závery odvodené z výsledkov rozličných štúdií. Tieto štúdie sa medzi sebou metodologicky líšili a na ich príklade si môžeme priblížiť celý rad metód, ktoré sa používajú pri výskume vplyvu rôznych liečebných postupov alebo výživy na ľudské zdravie. Kritické zhodnotenie týchto štúdií, najmä s ohľadom na ich silné a slabé stránky, môže čitateľom pomôcť lepšie zhodnotiť informácie o výžive a zdraví, ktoré sa často objavujú v médiách.

ANTIOXIDANTY A STARNUTIE

Hoci Linus Pauling vo svojej knihe *Vitamín C a nachladnutie* nenaznačoval, že by vitamín C mal pomáhať aj pri predchádzaní úbytku duševných schopností súvisiacich so starnutím, práve toto je jedným z najvýznamnejších dôvodov, prečo niektorí ľudia denne užívajú vysoké dávky vitamínu C a iných antioxidantov, ako sú napríklad vitamín E a β -karotén. Tento dôvod sa opiera o poznanie chemických reakcií medzi antioxidantmi a tzv. *reaktívnymi formami kyslíka* (Reactive Oxidative Species, ROS), ktoré v organizme vznikajú z kyslíka, ktorý získavame dýchaním a používame pri procesoch energetického metabolizmu v mitochondriách. Pri týchto procesoch sa malé množstvá kyslíka menia na vedľajšie produkty – ROS, medzi ktoré patrí peroxid vodíka, ozón, oxid dusnatý, superoxidový radikál a hydroxylový radikál. Tieto rýchlo reagujú s dôležitými zložkami buniek, akými sú DNA, proteíny a lipidy a modifikujú ich takým spôsobom, ktorý môže viesť k mutáciám a následne k neobmedzenému bunkovému deleniu a rakovine, alebo to môže viesť k zániku buniek a vzniku rozličných ochorení (Evans a Halliwell, 2001) (pozri vysvetl. prekl. 2.1).

Bunky sa proti tomuto poškodeniu môžu brániť viacerými prirodzenými mechanizmami, ale poškodenie vyvolané ROS sa môže časom hromadiť a tým prispievať k postupnému zhoršovaniu funkcií, čo sa označuje ako starnutie (táto a tiež iné hypotézy o starnutí sú predmetom kapitoly 7). Vitamín C, vitamín E a β -karotén sa označujú ako antioxidanty preto, lebo reagujú s reaktívnymi formami kyslíka a tým znižujú nebezpečenstvo ich škodlivých reakcií s bunkovou DNA, proteínmi a lipidmi. Keďže mozgové tkanivo sa vyznačuje vysokou spotrebou kyslíka a vysokou koncentráciou lipidov v bunkových membránach, ktorých úlohou je vytvárať medzibunkové spojenia, mozgové bunky sú veľmi senzitívne na poškodenie vyvolané ROS, a preto sa zdá byť prijateľná hypotéza, podľa ktorej zvýšený príjem antioxidantov v potravinách

a nápojoch môže chrániť pred oslabením duševného výkonu v procese starnutia (pozri vysvetl. prekl. 2.2).

Jedna z viacerých alternatívnych metód bežne používaných v biomedicínskom výskume sa označuje ako prospektívna štúdia (prospektívny plán štúdie). Túto metódu môžeme priblížiť na dlhodobom výskume obyvateľov švajčiarskeho Bazileja, ktorý sa začal v roku 1960. Uvažujme o hypotéze, podľa ktorej antioxidanty chránia pred úbytkom pamäťových funkcií pri starnutí. Jednu z možností, ako testovať túto hypotézu by mohla predstavovať štúdia, ktorá by zahŕňala ľudí v mladom a strednom veku – tí by sa medzi sebou odlišovali v príjme antioxidantov alebo ich hladinou v krvi – a do štúdie by boli zaradení skôr, než by sa u nich prejavili zmeny pamäťovej výkonnosti podmienené starnutím. Za ideálnych podmienok by to bola vzorka náhodne vybratých ľudí, ktorá by reprezentovala celú študovanú populáciu a z týchto ľudí by väčšina zostala v štúdiu až do konca, čo by mohlo trvať aj viac rokov a iba nevelký počet jednotlivcov by bol zo štúdie z rôznych dôvodov vyradený (tzv. drop-out). Takýto typ štúdie sa označuje ako prospektívna štúdia, pretože sa zaoberá budúcimi dôsledkami (poruchy pamäťových funkcií) vyplývajúcimi zo súčasných podmienok (nízky príjem antioxidantov). Skupina švajčiarskych vedcov pod vedením W. J. Perriga v roku 1993 testovala pamäťové výkony 442 jednotlivcov vo veku 65 až 94 rokov, ktorí boli zaradení do bazilejskej štúdie (Perrig et al., 1997). U týchto jednotlivcov boli v roku 1971 stanovené hladiny antioxidantov v krvi úplne nezávisle od posúdenia ich pamäťových funkcií, a preto táto štúdia spĺňa kritériá prospektívnej štúdie.

Výskumníci v americkom Národnom inštitúte rakoviny (NCI) uskutočnili v 60-tych rokoch 20. storočia dnes už klasickú prospektívnu štúdiu o dôsledkoch fajčenia na ľudské zdravie (Giere, 1997), ktorá sa stala vzorom pre mnohé budúce prospektívne štúdie, vrátane tej švajčiarskej o antioxidantoch a pamäti. V rámci tejto štúdie výskumníci NCI vybrali 37 000 fajčiarov a porovnateľnú skupinu nefajčiarov spomedzi viac ako 400 000 mužov – dobrovoľníkov. Silnou stránkou tejto rozsiahlej štúdie bolo to, že ku každému fajčiarovi bol priradený nefajčiar na porovnanie (párovanie), a to takým spôsobom, že jednotlivci v týchto pároch sa zhodovali v mnohých bežných parametroch, ako napr. vek a etnický pôvod, ale aj v menej bežných parametroch, ktoré by mohli mať nejaký vplyv na zdravie, od náboženského vyznania až po priemernú dĺžku nočného spánku. Nikoho neprekvapilo, že už po troch rokoch trvania štúdie bola mortalita v skupine fajčiarov dvakrát vyššia ako u nefajčiarov.

Prospektívne (analytické – pozn. prekl.) štúdie majú určité slabé stránky v porovnaní s randomizovanými experimentálnymi štúdiami, ktoré boli použité pri overovaní účinkov vitamínu C pri nachladnutí, a ktoré budú rozobraté v tejto kapitole (pozri vysvetl. prekl. 2.3). Jeden z najvýznamnejších problémov týchto prospektívnych štúdií spočíva v tom, že porovnávaní jednotlivci sa medzi sebou môžu odlišovať aj v niečom inom ako iba v prítomnosti faktora, ktorého efekt sa v štúdiu overuje (napríklad fajčenie v páre fajčiar-nejfajčiar – pozn. prekl.). Ak existuje nejaký ďalší faktor, ktorý sa vyskytuje v oboch porovnávaných skupinách (napr. v skupine fajčiarov a nefajčiarov) v rôznej miere (napr. požívanie alkoholických nápojov – pozn. prekl.), potom môže byť rozdiel v pozorovanom efekte medzi porovnávanými skupinami (napr. rozdiel v mortalite u fajčiarov a nefajčiarov) podmienený týmto ďalším súčasne pôsobiacim faktorom (tzv. confounderom), a nie faktorom, ktorého efekt sa mal v štúdiu overiť (fajčenie). Práve preto sa v štúdiu fajčiarov vykonanej v NCI kládol veľký dôraz na párovanie fajčiarov a nefajčiarov, aby sa minimalizovala možnosť, že pozorované rozdiely v mortalite sú vyvolané nejakými inými súčasne pôsobiacimi faktormi, a nie fajčením. Toto párovanie si vyžiadalo veľké úsilie pri získaní 400 000 dobrovoľníkov, z ktorých bolo do štúdie zaradených 74 000 jednotlivcov. Je zrejmé, že principiálne nie je možné navrhnuť a vykonať štúdiu tak,

aby sa rozpoznal alebo obmedzil vplyv všetkých možných súčasne pôsobiacich faktorov (čím by sa úplne zabránilo nálezu chybných vzťahov – pozn. prekl.). Na druhej strane by však bolo neetické a nepraktické sledovať vplyv fajčenia na zdravie v experimentálnej štúdii, pri ktorej by boli jednotlivci (nefajčiari) náhodne zaraďovaní do skupín fajčiarov a nefajčiarov, pričom z osôb zaradených do prvej skupiny by sa kvôli štúdii museli stať na niekoľko rokov fajčiari, a potom by sa zisťovala ich mortalita v porovnaní so skupinou nefajčiarov.

Sledovanie vplyvu antioxidantov na starnutie vykonané Perrigovou skupinou sa od štúdie fajčiarov v NCI líšilo tým, že jednotlivci neboli zaraďovaní do dvoch skupín (fajčiari a nefajčiari – pozn. prekl.), ale sa medzi sebou odlišovali v spojitých škále koncentrácií vitamínu C, E a β -karoténu v krvi. Samozrejme, že rozdiely týchto koncentrácií medzi jednotlivcami neboli vyvolané iba rozdielom v užívaní vitamínových prípravkov, pretože iba 6 % zaradených osôb uviedlo užívanie vitamínov a u týchto osôb neboli vždy zistené zvýšené koncentrácie vitamínu C, E a β -karoténu v krvi. Jedným z najzaujímavejších zistení tejto štúdie bolo to, že hladiny sledovaných vitamínov v krvi stanovené v roku 1971 silno korelovali s hladinami zistenými u tých istých osôb v roku 1993. Môže to svedčiť o rozdielnych dietetických návykoch medzi jednotlivými osobami, ktoré sa nezmenili ani počas viac ako 20 rokov trvania štúdie, alebo o genetických rozdieloch, ktoré mali vplyv na to, ako sú vitamíny v organizme spracované a ich hladiny udržiavané.

Perrigova skupina uskutočnila päť štandardizovaných testov na zhodnotenie pamäťovej výkonnosti. Jeden z nich bol menej zrejmy a nenašiel sa vzťah medzi ním a hladinami vitamínov v krvi, ale ďalšie štyri boli viac-menej vhodné na overenie tohto vzťahu. *Implicitná pamäť* (nevedomá – pozn. prekl.) bola testovaná tak, že sa testovaným osobám ukázal obrázok, na ktorom bolo viacero známych predmetov,¹ a potom im boli ukázané jednotlivé obrázky 15 týchto predmetov a tiež 15 nových predmetov, ktoré na spoločnom obrázku neboli. Testované osoby dokázali pomenovať predtým ukázané predmety priemerne o 17 % rýchlejšie než nové predmety, čo je dôsledok vplyvu primingu (implicitnej pamäte). *Voľná reprodukcia* bola testovaná tak, že pokusné osoby mali po 20 minútach vymenovať čo najviac predmetov, ktoré im boli ukázané na spoločnom obrázku. Testované osoby dokázali vymenovať v priemere 8,2 predmetov. *Rekognícia* bola testovaná po voľnej reprodukcii tým, že sa testovaným osobám ukázal ďalší obrázok, na ktorom boli niektoré staršie predmety, ktoré už videli na prvom obrázku a niektoré nové predmety, ktoré videli jednotlivito pri teste implicitnej pamäte. Testované osoby mali identifikovať tie predmety, ktoré videli na pôvodnom spoločnom obrázku a testujúci personál vypočítal index rekogničnej schopnosti pre každú testovanú osobu na základe správne a nesprávne identifikovaných predmetov. Nakoniec sa testovala sémantická pamäť (pamäť na fakty, resp. významy – pozn. prekl.) tak, že testované osoby mali definovať význam 32 slov, pričom tieto osoby správne definovali priemerne 19,6 slov.

Kľúčové výsledky tejto štúdie môžu byť zhrnuté pomocou korelačných koeficientov, ktoré vyjadrujú vzťahy medzi hladinou každého antioxidantu v krvi (aj niekoľkých ďalších fyziologických údajov) a výsledkami pamäťových testov. V štúdii bolo prezentovaných spolu 45 korelačných koeficientov, pretože v roku 1993 sa vykonalo 5 pamäťových testov a v rokoch 1971 a 1993 sa meralo 9 rôznych fyziologických parametrov, vrátane krvného tlaku a hladín vitamínu C, E, β -karoténu, cholesterolu a feritínu (proteínu, ktorý obsahuje železo a môže potláčať antioxidačné účinky vitamínu C) v krvnej plazme.

Ak chceme sami interpretovať výsledky tejto štúdie a nespoliehať sa na závery jej autorov, podľa ktorých boli „plazmatické hladiny kyseliny askorbovej [vitamínu C] a β -karoténu asociované s lepšou pamäťovou výkonnosťou“ (Perrig et al., 1997, s. 718), musíme dôkladne zvážiť,

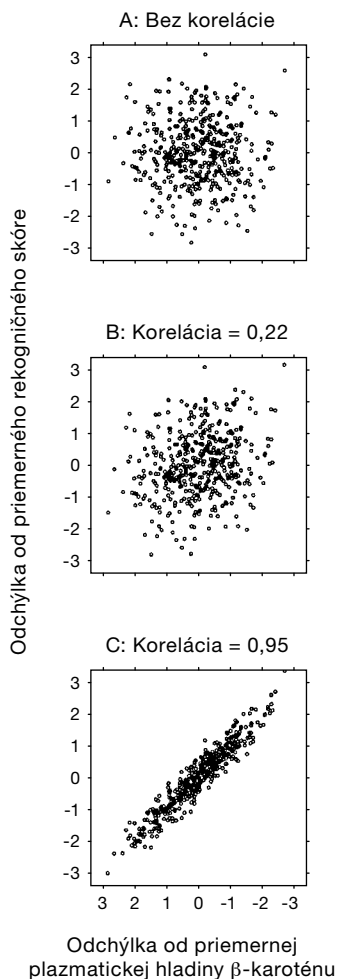
čo dokáže korelačná analýza zistiť, a pritom musíme zohľadniť obmedzenia tejto základnej štatistickej metódy. Korelačný koeficient vyjadruje vzťah medzi dvomi premennými, napr. medzi hladinou β -karoténu v krvi a schopnosťou rozpoznať nedávno videné predmety, a vyjadruje sa v škále od -1 do 1. Korelačný koeficient sa dá najlepšie pochopiť na základe grafickej prezentácie týchto vzťahov. Ak medzi dvomi premennými nie je vôbec nijaký vzťah, potom sa korelačný koeficient rovná 0 a takáto situácia je znázornená na obrázku 2.1A. Inými slovami, ak by medzi hladinou β -karoténu v krvi a rekogničnou pamäťovou schopnosťou neexistoval žiadny vzťah, potom by grafická prezentácia ich závislosti (resp. nezávislosti) vyzerala tak, ako na obrázku 2.1A.

Na rozdiel od náhodného zhluky bodov z obrázku 2.1A, ktorý zodpovedá hodnote korelačného koeficientu blízkej 0, ideálny lineárny vzťah medzi dvomi premennými by viedol ku korelačnému koeficientu 1, ak by vzrastom hodnoty jednej premennej rástla hodnota druhej premennej (pozri obr. 2.1C), alebo -1, ak by bol pravdou opak.

Ako by teda mal graficky vyzeráť vzťah medzi plazmatickou hladinou β -karoténu a rekogničnou pamäťovou schopnosťou u 442 starších osôb v porovnaní s obrázkami 2.1A a 2.1C? Výskumníci nepublikovali ich pôvodné dáta, ale uviedli, že korelačný koeficient medzi hladinami β -karoténu nameranými v roku 1993 a rekogničnými pamäťovými schopnosťami zistenými v roku 1993 bol 0,22. Situáciu s korelačným koeficientom 0,22 medzi dvomi premennými ilustruje obrázok 2.1B.²

Vyvoláva vo vás obrázok 2.1B pochybnosti o tom, že medzi hladinou β -karoténu a pamäťovými schopnosťami existuje nejaký vzťah, ako to tvrdí Perrig so svojimi spolupracovníkmi? Tieto grafy som nakreslil preto, aby som vám pomohol pri kritickom posúdení výsledkov tejto štúdie. Napriek tomu by som vás však nechcel podnecovať k neprimeranému skepticizmu, pretože ako ekolog sám pracujem s dátami, ktorých závislosti majú tiež nie celkom evidentný charakter. Chemici, molekulárni biológovia a dokonca aj fyziológovia pracujú s dátami, medzi ktorými sú vzťahy s grafickým zobrazením podobným, ako je na obrázku 2.1C a títo vedci sa zvyčajne iba usmievajú nad závislosťami, ktoré vyzerajú ako na obrázku 2.1B. Naproti tomu ekologovia, psychológovia a vedci z niektorých medicínskych odborov sa museli vyrovnáť s dátami, ktorých závislosti vyzerajú rovnako ako na obrázku 2.1B, pretože študujú javy, ktoré sú ovplyvňované mnohými ďalšími faktormi. Ak je jedna závisle premenná veličina, ako napr. rekogničná pamäťová schopnosť, graficky znázornená ako funkcia jednej nezávisle premennej, napr. ako je hladina β -karoténu v krvi, potom by bolo veľkým prevapením, ak by táto závislosť vyzerala graficky tak „pevne“ ako na obrázku 2.1C, pretože rekogničná schopnosť môže byť ovplyvnená mnohými ďalšími faktormi. Rozdiely rôznych parametrov medzi osobami zaradenými do štúdie, napr. rozdiely vo veku, pohlaví a v dosiahnutom vzdelaní, sú pravdepodobne zodpovedné za rozptýlený bodov viditeľný na obrázku 2.1B.

Okrem toho, pri hodnotení týchto závislostí ani nemusíme zohľadňovať grafickú reprezentáciu dát a stačí nájsť odpoveď na nasledujúcu otázku: Aká je pravdepodobnosť, že by sme pri hodnotení dát získaných na súbore 442 jednotlivcov iba náhodou zistili korelačný koeficient 0,22 medzi dvomi premennými, ktoré sú od seba úplne nezávislé? Túto pravdepodobnosť možno odhadnúť náhodným generovaním dvoch skupín vzájomne nesúvisiacich dát, pričom v každej skupine bude 442 čísel a následne ľubovoľným párovaním dát a výpočtom korelačného koeficientu medzi premennými. Tento proces je potrebné opakovať veľakrát a spočítať v koľkých prípadoch náhodne zostavených číselných súborov bol korelačný koeficient väčší ako 0,22. Keď som vykonal tento pokus s číslami 1000-krát, nedostal som korelačný koeficient väčší ako 0,22 ani v jedinom prípade, čo znamená, že pravdepodobnosť



Obrázok 2.1 Hypotetická korelácia medzi plazmatickými hladinami β -karoténu a skóre v testoch rozpoznávacej zložky pamätového výkonu u 442 starších Švajčiarov študovaných Perrigom a jeho kolegami (1997). Graf A ukazuje, ako by táto závislosť vyzerala, ak by medzi premennými neexistovala korelácia (podľa výsledkov mojej simulácie tu existuje veľmi slabá korelácia s hodnotou korelačného koeficienta -0,002). Graf B znázorňuje situáciu s korelačným koeficientom 0,22, ktorý zodpovedá korelácii zistenej Perrigovou skupinou. Graf C ukazuje hypotetický vzťah s korelačným koeficientom blízky maximálnej hodnote 1,0. Mierky na obidvoch osiach sú v jednotkách smerodajných odchýlok, čo znamená že číslo 1 na horizontálnej osi predstavuje jednu smerodajnú odchýlku nad priemernou hladinou β -karoténu v populácii, a -1 reprezentuje jednu smerodajnú odchýlku pod populačným priemerom (pozri poznámku 2).

náhodného získania korelačného koeficientu aspoň takého veľkého ako 0,22 je menšia ako 1 : 1000. Táto veľmi malá pravdepodobnosť umožnila Perrigovi a jeho spolupracovníkom formulovať záver, že existuje štatisticky významná závislosť medzi plazmatickou hladinou β -karoténu a rekogničnou zložkou pamätej výkonnosti.

Pripomeňme si, že Perrig a jeho kolegovia merali 9 fyziologických premenných a päť zložiek pamätej výkonnosti. Aké boli hodnoty ďalších 44 korelačných koeficientov a ako stoja tieto hodnoty v porovnaní s hodnotou 0,22 medzi rekogničiou a plazmatickým β -karoténom v roku 1993? Zámerne som pre grafickú vizualizáciu na obrázku 2.1B zvolil vzťah medzi rekogničiou a plazmatickým β -karoténom, pretože mu zodpovedal najväčší korelačný koeficient. Druhá najsilnejšia korelácia s koeficientom 0,16 sa zistila medzi sémantickou pamätovou schopnosťou a plazmatickou hladinou vitamínu C v roku 1993. Perrigova skupina zhodnotila, že 11 korelačných koeficientov v celej štúdii bolo štatisticky významných, pretože pravdepodobnosť, že by boli nájdené v takýchto hodnotách náhodou – ak by medzi premennými neexistovali žiadne vzťahy – bola menšia ako 5 %.³ Nezistili sa významné korelácie medzi plazmatickými

hladinami vitamínu E a výsledkami testov pamäťovej výkonnosti. Päť štatisticky významných korelácií sa týkalo hladín β -karoténu nameraných v roku 1993 a výsledkov testov na voľnú reprodukciu, rekogníciu a sémantickú pamäť, a tiež hladín β -karoténu nameraných v roku 1971 vo vzťahu k dvom posledne menovaným pamäťovým schopnostiam. Keďže pamäťové testy boli vykonané iba v roku 1993, je pozoruhodné, že hladiny β -karoténu z roku 1971 korelovali s výsledkami pamäťových testov o 22 rokov neskôr. Pre plazmatické hladiny vitamínu C sa zistili tri významné korelácie: medzi ich hladinami nameranými v roku 1993 a schopnosťami voľnej reprodukcie a sémantickej pamäti, ako aj medzi hladinami z roku 1971 a sémantickou pamäťou. Ďalšie tri významné korelácie sa týkali cholesterolu vo vzťahu k jednej zložke pamäťovej výkonnosti a feritínu s výsledkami dvoch pamäťových testov.

Zdá sa, že tieto výsledky sú v zhode so záverom výskumníkov, že vitamín C a β -karotén zvyšujú pamäťovú výkonnosť, ale pred akceptovaním tohto záveru musíme zvážiť ešte ďalšiu komplikáciu. Pre znázornenie si predstavme hádzanie mincou 10-krát. Aká je pravdepodobnosť, že zakaždým padne hlava? To sa dá ľahko spočítať ako $0,5^{10} = 0,1\%$. Teraz si predstavme, že 100 ľudí hádže mincou 10-krát. Aká je pravdepodobnosť, že aspoň jeden človek hodí 10 hláv? Táto pravdepodobnosť je 10% .⁴ Inými slovami, aj málo pravdepodobné udalosti sa uskutočnia, ak je na to dostatok príležitostí. S týmto poznatkom skúsme prehodnotiť všetkých 45 korelácií medzi nameranými fyziologickými parametrami (vrátane krvných hladín antioxidantov) a zložkami pamäťovej výkonnosti publikovanými Perrigovou skupinou. Predpokladajme, že všetkých deväť fyziologických premenných je úplne nezávislých od všetkých piatich parametrov pamäťovej výkonnosti. Aká by bola v tejto situácii bez reálnych vzťahov medzi antioxidantmi a pamäťou pravdepodobnosť, že by sme našli korelačné koeficienty s takou hodnotou, akú zistili autori štúdie? Na simuláciu tohto myšlienkového experimentu som napísal krátky program pre počítač a zistil som, že s pravdepodobnosťou asi 12% by bolo možné nájsť najväčší korelačný koeficient v skupine 45 korelačných koeficientov s hodnotou viac ako $0,14$ (tri najväčšie zistené hodnoty korelačných koeficientov v Perrigovej štúdii boli $0,22$; $0,16$ a $0,14$). V 80% percentách prípadov z 1000 simulácií bol aspoň jeden zo 45 korelačných koeficientov väčší ako $0,1$, čo bola hodnota považovaná Perrigom a spolupracovníkmi za štatisticky významnú. Výsledky Perrigovej skupiny sú stále zmysluplné, pretože autori našli u 11 zo 45 testovaných korelačných koeficientov hodnotu vyššiu ako $0,1$, kým ja som pri simulácii s úplne náhodnými dátami nikdy nenašiel viac ako 6 , ale zvyčajne som nachádzal iba jeden alebo dva korelačné koeficienty s hodnotou vyššou ako $0,1$. Napriek tomu však výsledky tejto simulácie naznačujú, že pri interpretácii väčších súborov korelačných koeficientov je potrebná určitá opatrnosť, najmä ak je pravdepodobné, že vzťahy medzi sledovanými premennými sú ovplyvňované viacerými ďalšími nameranými premennými (všimnite si opäť rozptyl bodov na grafe znázorňujúcom vzťah medzi hladinou β -karoténu a rekogničnou schopnosťou na obrázku 2.1B). Existuje štatistická metóda s pôsobivým názvom „sekvenčná Bonferroniho metóda“ (pozri vysvetl. prekl. 2.4), ktorá slúži na riešenie problému naznačeného v tomto odseku (Rice, 1989). Pri použití tejto metódy na 45 korelačných koeficientoch publikovaných Perrigovou skupinou sa ukázalo, že s potrebnou spoľahlivosťou iba dve korelačné závislosti reprezentujú reálne existujúci vzťah medzi plazmatickými hladinami antioxidantov a pamäťovými charakteristikami. Ide o vzťah medzi β -karoténom nameraným v roku 1993 a rekogničnou schopnosťou a vzťah medzi vitamínom C nameraným v roku 1993 a sémantickou pamäťou.⁵

Problematiku korelačnej analýzy som vysvetlil podrobnejšie preto, aby som napokon došiel k záveru, ktorý je do istej miery sklamaním – nie je možné v plnom rozsahu akceptovať závery

Perrigovej skupiny. Ale rovnako nie je možné ani kategoricky zavrhnúť hypotézu o pozitívnom vplyve antioxidantov na pamäťové funkcie. Vo svojom výklade som sa usiloval ukázať, ako funguje táto často používaná štatistická metóda. Okrem toho, dáta získané Perrigom majú aj jeden oveľa zásadnejší problém, a to ten, že boli získané prospektívnou štúdiou a nie kontrolovaným experimentom. Pripomeňme si, že sledovaní Švajčiaci v tejto štúdii mali rôzne hladiny antioxidantov v krvi v dôsledku nejakej kombinácie faktorov, ktoré neboli výskumníkmi zhodnotené. Mohli pochádzať z genetických rozdielov, ktoré ovplyvnili schopnosť absorbovať niektoré vitamíny do organizmu či udržať ich hladiny. Nepochybne mali aj odlišné stravovacie návyky a podobne. Ako mohli tieto a ďalšie faktory ovplyvniť výsledky štúdie? Doteraz diskutované analýzy nedávajú možnosť odpovedať na túto otázku, a preto použila Perrigova skupina ďalšiu štatistickú metódu nazvanú regresná analýza. Tá im umožnila simultánne zhodnotiť vplyv viacerých premenných. Vykonalí tri regresné analýzy zamerané na voľnú reprodukciu, rekogníciu a sémantickú pamäť, pretože každá s týchto pamäťových charakteristík korelovala s hladinou jedného alebo viacerých antioxidantov pri korelačnej analýze. Výsledky ich regresnej analýzy vysvetlím na príklade sémantickej pamäti, pretože v tomto prípade boli výsledky najvýraznejšie.

Perrigova skupina sa hlavne usilovala zistiť, či by korelácie medzi hodnotami skóre sémantickej pamäti a hladinami antioxidantov v krvi mohli byť pripísané iným premenným, ktoré mohli tiež korelovať s hladinami týchto antioxidantov. Do regresnej analýzy zahrnuli ako ďalšie premenné aj vzdelanie, vek a pohlavie testovaných osôb, spolu s plazmatickými hladinami vitamínu C a β -karoténu. Ak by mali napríklad osoby s vyšším vzdelaním zvyčajne vyššie plazmatické hladiny vitamínu C a lepšie výsledky v teste sémantickej pamäti než menej vzdelané testované osoby, potom by mohla byť asociácia medzi vitamínom C a sémantickou pamäťou iba artefaktom skutočného vzťahu medzi vzdelaním a týmito dvomi parametrami. Vôbec neprekvapuje zistenie, že osoby s vyšším vzdelaním podali lepšie výkony pri teste slovnej zásoby v rámci sémantickej pamäti. Okrem toho mladšie osoby skórovali v tomto teste lepšie ako staršie osoby, ale nezistili sa žiadne rozdiely medzi výkonmi mužov a žien. Regresná analýza umožnila štatisticky odfiltrovať účinky týchto ďalších premenných a zistiť, aký by bol vzťah medzi vitamínom C alebo β -karoténom a sémantickou pamäťou, ak by medzi sledovanými osobami neexistovali rozdiely vo veku a úrovni vzdelania.

Perrigova skupina zistila, že tieto závislosti zostávajú stále významné, aj keď sa zohľadnia rozdiely vo vzdelaní, veku a pohlaví. Za týchto okolností je pravdepodobnosť náhodnej korelácie medzi vitamínom C a sémantickou pamäťovou schopnosťou 3,4 %, na rozdiel od 0,1 % pri korelačnej analýze, keď sa nezohľadnilo vzdelanie, vek a pohlavie. Pre β -karotén a sémantickú pamäť bola pravdepodobnosť náhodnej korelácie 3,5 % pri odfiltrovaní rozdielov vo vzdelaní, veku a pohlaví. Perrigova skupina získala podobné výsledky aj pre β -karotén a schopnosť rekognície, ale závislosť medzi vitamínom C a rekogníciou nebola štatisticky významná, takisto ako závislosti medzi voľnou reprodukciou a hladinami antioxidantov.

Pri odhaľovaní závislostí medzi údajmi získanými v prospektívnych štúdiách má regresná analýza väčšiu silu (power) ako jednoduchá korelačná analýza, pretože pri regresii sa môže paralelne hodnotiť vplyv viacerých premenných. Napriek tomu však regresná analýza nedokáže prekonať základné obmedzenie týchto neexperimentálnych štúdií, ktoré spočíva v tom, že môžu existovať aj namerané premenné, ktoré majú súčasne vplyv na závisle premennú veličinu (napr. pamäťová výkonnosť), ako aj na merané nezávislé premenné (napr. hladina vitamínu C). Takto sa môže navodiť dojem, že existujú závislosti medzi faktormi, ktoré nás zaujímajú (nezávisle premenné) a závisle premennými, pričom však ide len o artefakty iných reálnych závislostí. V prípade populácie starších Švajčiarov, študovanej Perrigom a jeho kolegami, môže

byť prijateľná príčinná súvislosť medzi antioxidantmi a pamäťovými schopnosťami, pretože sú známe fyziologické účinky antioxidantov na bunky, ale je celkom možné, že skutočnou príčinou rozdielov pamäťovej výkonnosti medzi sledovanými osobami bol iný faktor, ktorý nebol výskumníkmi hodnotený. Tieto osoby mohli mať napríklad vyššie hladiny vitamínu C a β -karoténu v krvi preto, lebo mali vo svojej diéte viac zeleniny a ovocia, a pritom nejaká iná zložka ich diéty zapríčinila rozdiely v ich výkonnosti pri pamäťových testoch. Možné je aj to, že rozdielny príjem antioxidantov v potrave a rozdielna pamäťová výkonnosť boli v skutočnosti podmienené rozdielnym socioekonomickým postavením alebo odlišným životným štýlom testovaných osôb, ktoré zapríčinili zdanlivé závislosti medzi hladinami antioxidantov v krvi a výkonom pri pamäťových testoch. Hoci sa dá vyprodukovať veľa takýchto alternatívnych vysvetlení, Perrigova skupina nebola veľmi dôsledná pri hľadaní iných možných vysvetlení rozdielov medzi pamäťovými výkonmi v skupine starších osôb. Je to evidentné napríklad pri porovnaní tejto štúdie so štúdiou NCI, zameranou na mortalitu v súvislosti s fajčením, pri ktorej sa okrem fajčenia zvažoval vplyv prinajmenšom 23 ďalších parametrov. Aj keď sú výsledky Perrigovej skupiny zaujímavé, nepriniesli jednoznačné dôkazy o priaznivom účinku antioxidantov na kognitívnu výkonnosť.

Mohsen Meydani (2001) z Tuftsovej univerzity publikoval v časopise *Nutrition Reviews* prehľadový článok, v ktorom zhodnotil štúdie o účinku antioxidantov na kognitívne funkcie starších ľudí. Do hodnotenia nezaračil iba ľudí s normálnymi kognitívnymi funkciami z Perrigovej štúdie, ale aj pacientov s Alzheimerovou chorobou a s vaskulárnymi demenciami z iných štúdií.⁶ Dve z týchto ďalších štúdií boli tzv. štúdie typu prípad-kontrola (retrospektívne štúdie – pozn. autora) a hoci je tento typ štúdií dosť bežný v medicínskom výskume, ich dizajn je spojený s ešte väčšími problémami. Pri týchto štúdiách sú osoby, ktoré už majú nejaké zmeny stavu, napríklad ochorenie, porovnávané so skupinou kontrolných osôb bez ochorenia. V tejto situácii sa snažíme zistiť príčinu ochorenia identifikovaním faktorov, ktoré sa medzi prípadmi a kontrolami rôznia. Môže napríklad ísť o jednoduché meranie nejakej fyziologickej charakteristiky v čase, kedy sa štúdia vykonáva alebo testované osoby odpovedajú na otázky o ich súčasných alebo minulých návykoch (napríklad fajčenie), prípadne o možnom kontakte s toxickými látkami v životnom alebo pracovnom prostredí. Napríklad A. J. Sinclair a jeho štyria kolegovia študovali plazmatické hladiny antioxidantov u 25 pacientov s Alzheimerovou chorobou, u 17 pacientov s vaskulárnymi demenciami a u 41 kontrolných osôb bez demencie. Kontrolné osoby mali vek porovnateľný s osobami s Alzheimerovou chorobou a vaskulárnymi demenciami, ale je podivuhodné, že skupiny prípadov a kontrol neboli zosúladené s ohľadom na pohlavie, pretože ženy predstavovali 36 % v skupine chorých, ale až 59 % v skupine zdravých. Sinclairov tím zistil, že priemerná hladina vitamínu C v krvi pacientov s Alzheimerovou chorobou bola približne rovnaká ako hladina vitamínu C u osôb z kontrolnej skupiny, ale u pacientov s vaskulárnymi demenciami bola o 22 % nižšia. Hladiny vitamínu E boli o 14 % nižšie u pacientov s Alzheimerovou chorobou, než u kontrolných osôb. Sinclairova skupina tak dospela k záveru, že „osoby s demenciou vyvolanou Alzheimerovou chorobou alebo cievnyimi príčinami majú zmenené hladiny antioxidantov, čo môže byť príčinou zvýšeného oxidatívneho stresu. Tento nález môže byť terapeuticky využitý formou suplementácie antioxidantov“ (Sinclair et al., 1998, s. 840).

Na príklade tejto štúdie môžeme vidieť základné nevýhody štúdií typu prípad-kontrola v porovnaní s prospektívnymi a experimentálnymi štúdiami. Aj keby boli zistené vzťahy medzi plazmatickými hladinami antioxidantov a demenciou biologicky zmysluplné, zo získaných údajov sa nedá odlíšiť, či nízke hladiny vitamínu C viedli k ochoreniu na vaskulárnu

demenciu a nízke hladiny vitamínu E k Alzheimerovej chorobe, alebo či sú tieto nízke hladiny dôsledkom uvedených chorôb. Študované prípady nepredstavovali náhodne vybratých pacientov s Alzheimerovou chorobou a vaskulárnymi demenciami, ale boli to pacienti jedného zdravotníckeho zariadenia v Anglicku. Nemožno teda vylúčiť, že títo pacienti predstavujú nejakú zvláštnu populáciu ľudí s demenciami. V štúdiách typu prípad-kontrola neexistujú možnosti výberu kontrol, ktoré by boli úplne nezaujaté a vyvážené. Napríklad Sinclair so svojimi kolegami mali v kontrolnej skupine viac žien, než v skupine s demenciou, čo naznačuje, že pri vytvorení kontrolnej skupiny si výskumníci zjednodušili prácu – namiesto toho, aby sa usilovali čo najviac spárovať prípady aj kontroly a vyvážiť obidve skupiny. Výber vhodných kontrolných skupín pri štúdiách typu prípad-kontrola je veľmi náročný, pretože existuje veľa možných confounderov, ktoré by mali byť vyvážené tak, aby mali rovnako veľký vplyv v skupinách prípadov i kontrol. Takéto vyváženie je pri takom malom súbore osôb, aký študoval Sinclair so svojimi kolegami v podstate nemožné. A rovnako ako v prípade neexperimentálnych prospektívnych štúdií, stále existuje možnosť, že rozdiely medzi chorými (prípady) a zdravými (kontroly) zapríčinili iné nehodnotené premenné.

Meydani vo svojom prehľadovom článku z roku 2001 dospel k záveru, že antioxidanty chránia pred vekom podmieneným úbytkom kognitívnych funkcií a že podávanie vysokých dávok potravinových doplnkov, ako napr. vitamínu E, môže byť prospešné pri predchádzaní symptómov spojených so starnutím. Priblížil som tu dve výskumné práce, ktoré dospeli k tomu istému záveru, najmä preto, aby som ilustroval obmedzenia neexperimentálnych štúdií pri hľadaní odpovedí na otázky ľudského zdravia. Ďalší výskum, o ktorom sa zmieňuje Meydani bol experimentálny a využíval jednak pokusné zvieratá, jednak klinické štúdie o účinkoch podávania vitamínov pacientom s Alzheimerovou chorobou, ale tento výskum nie je oveľa presvedčivejší než dve výskumné práce, ktoré som tu podrobne popísal. Autori experimentálnej práce, ktorá zahŕňala pacientov s Alzheimerovou chorobou, sa napríklad museli uchýliť k výrazným štatistickým manipuláciám dát, aby našli závislosť medzi liečením vysokými dávkami vitamínu E a rýchlosťou úbytku mentálneho výkonu pacientov (Sano et al., 1997).

Z uvedeného dôvodu sú Meydaniho závery sporné aj napriek prijateľnému mechanizmu, pomocou ktorého môžu antioxidanty pomáhať pri ochrane mentálnych funkcií. Mojmým zámerom nie je vyvracať široko zakorenený názor, že antioxidanty pomáhajú proti starnutiu (sám pre každý prípad užívam 400 IU vitamínu E denne), ale skôr mi ide o úvod k tomu, aby som predstavil zásadne odlišnú výskumnú stratégiu, ktorá je považovaná za zlatý štandard medicínskeho výskumu – randomizovanú dvojito zaslepenú experimentálnu štúdiu. Ako príklad použitia tejto metódy uvediem test hypotézy, podľa ktorej vysoké dávky vitamínu C znižujú závažnosť príznakov nachladnutia. Najprv popíšem dva príklady takýchto štúdií, a potom sa vrátim späť k všeobecným otázkam významu experimentálnych a neexperimentálnych prístupov v medicíne, a na iných príkladoch sa pokúsím predstaviť neexperimentálne štúdie v lepšom svetle.

POMÁHA VITAMÍN C PROTI NACHLADNUTIU?

Hypotéza, podľa ktorej vitamín C pomáha pri predchádzaní a liečení nachladnutia, bola testovaná vo viac ako desiatich experimentálnych štúdiách, pričom najstaršie boli vykonané už v roku 1942. Táto hypotéza je vhodná na experimentálne overenie, pretože v prípade, že by bola potvrdená, mal by sa účinok podávania vitamínu C pomerne rýchlo prejavíť zníženou incidenciou a závažnosťou nachladnutí. Naproti tomu vekom podmienený úpadok

kognitívnych funkcií môže byť dlhodobým dôsledkom viacerých faktorov, vrátane užívania vitamínov-antioxidantov, ktoré pôsobia počas desaťročí života. Všeobecne platí, že nie je možné navrhnúť kvalitné experimentálne štúdie, pri ktorých sa uplatňuje taký dlhý čas, a preto bolo potrebné použiť na testovanie hypotéz o dlhodobých účinkoch iné metódy.

Linus Pauling (1970) vo svojej knihe *Vitamín C a nachladnutie* zhodnotil niekoľko experimentálnych štúdií, ktoré boli vykonané pred rokom 1970 (pozri tiež Pauling, 1971). Ale zhrnutia z týchto štúdií sa vyznačujú viacerými problémami, a preto nie sú najvhodnejšie pre ďalší výklad. Ich najväčším problémom je to, že pôvodné práce neobsahovali dôležité informácie o experimentálnom pláne a použitých štatistických metódach, ani konkrétne číselné výsledky, takže nemôžu byť podrobne vyhodnotené. Preto teraz začnem známou štúdiou Thomasa Karlowského a jeho piatich kolegov z Národného ústavu pre zdravie (NIH), ktorá bola publikovaná v *Journal of American Medical Association (JAMA)* v roku 1975 (Chalmers, 1975; Karlowski et al., 1975). Táto štúdia je dobrým príkladom experimentálneho prístupu nie preto, že by to bola bezchybná štúdia, ale práve z opačného dôvodu – mala vážny problém, ktorý autori rozpoznali až v priebehu štúdie. Thomas Chalmers, ktorý bol v 70-tych rokoch 20. storočia riaditeľom Klinického centra NIH a jedným z autorov článku v *JAMA* uviedol, že si túto štúdiu vážil najviac zo všetkých, na ktorých sa podieľal (Chalmers, 1996, s. 1085), a to čiastočne aj preto, že výskumníci z NIH identifikovali chybu a boli schopní odstrániť jej vplyv pri interpretácii výsledkov.

Hypotéza o tom, že vitamín C pomáha bojovať proti nachladnutiu pozostáva z dvoch častí: podľa prvej z nich má pravidelné užívanie vysokých dávok vitamínu C zabrániť nachladnutiu a podľa druhej má užívanie vysokých dávok vitamínu C pri prvých príznakoch nachladnutia znižovať dĺžku trvania ochorenia a závažnosť príznakov. Inými slovami, vitamín C môže mať preventívny účinok tým, že zabráni nachladnutiu, alebo terapeutický účinok pri liečení nachladnutia, alebo obidva účinky súčasne. Tím výskumníkov z NIH overoval obidve tieto hypotézy.

Karlowski a jeho kolegovia našli pre svoju štúdiu 311 dobrovoľníkov spomedzi 2500 zamestnancov NIH. Okolo 600 z týchto zamestnancov prejavilo ochotu zúčastniť sa, ale asi polovica z nich nebola z rôznych dôvodov prijateľná. Napríklad pre zdravotné dôvody, ktoré sa mohli zhoršiť pri užívaní vysokých dávok vitamínu C, alebo pre graviditu či neochotu vyháňať sa užívaniu vitamínov mimo predpisu vyplývajúceho z tejto štúdie. Výskumníci rozbehli štúdiu koncom leta, aby vyťažili čo najviac z toho, že frekvencia nachladnutí vo Washingtone DC stúpa na jeseň a v zime. Plánovali pokračovať v tejto štúdii v priebehu jedného roka, ale testované osoby postupne odchádzali zo štúdie, takže nakoniec musela byť ukončená už po deviatich mesiacoch, keď počet zostávajúcich účastníkov klesol pod 200. Malým, no dôležitým aspektom experimentálneho plánu bolo to, že podmienky zastavenia štúdie boli vopred dohodnuté. Keby to tak nebolo, výskumníci mohli byť podozrievaní z toho, že zastavili štúdiu v čase, keď ich výsledky čo najviac podporovali overovanú hypotézu.

Štandardným postupom pri štúdiách tohto typu je porovnávanie skupiny experimentálnych osôb, ktoré dostali liečebnú intervenciu, s kontrolnou skupinou bez tejto intervencie. V tomto prípade považujeme za liečebnú intervenciu podávanie vitamínu C v kapsulách podľa inštrukcií, ktoré určujú, kedy majú byť použité. Termín „liečebná intervencia“ však má veľmi všeobecný význam v experimentálnych štúdiách a predstavuje akúkoľvek experimentálnu manipuláciu. Pri navrhovaní experimentálnych štúdií zohráva kľúčovú úlohu rozhodnutie o vhodných kontrolných skupinách, pretože je možné, že už samotné každodenné užívanie tabliet môže ovplyvniť frekvenciu a závažnosť nachladnutí bez ohľadu na ich obsah. Ináč povedané – môže sa uplatňovať psychologický benefit liečby bez ohľadu na fyziologické účinky

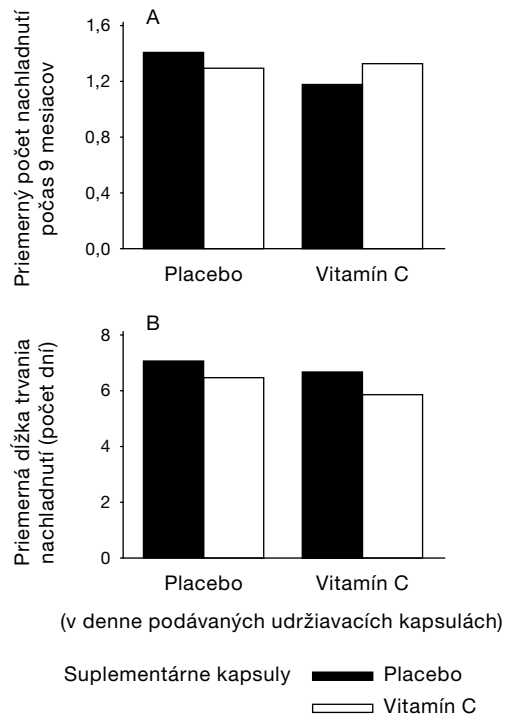
samotného vitamínu C, pričom však výskumníci mali záujem zistiť, či práve vitamín C pomáha pri nachladnutí. Z tohto dôvodu vytvorili kontrolnú skupinu, ktorá dostávala kapsuly s placebom namiesto kapsúl s vitamínom C. Kapsuly s vitamínom C obsahovali 500 mg vitamínu C a 180 mg laktózy (mliečneho cukru), zatiaľ čo kapsuly s placebom obsahovali 645 mg laktózy. Autori štúdie poctivo uviedli, že výber laktózy ako placebo bol unáhlený a vyvolaný snahou začať štúdiu v priebehu niekoľkých mesiacov od jej naplánovania. To sa neskôr ukázalo ako veľmi unáhlené rozhodnutie.

Keďže Karlowski a jeho spolupracovníci chceli testovať tak preventívny, ako aj terapeutický účinok vitamínu C pri nachladnutí, rozhodli sa rozdeliť osoby zapojené do štúdie do štyroch skupín. Osoby z každej skupiny dostali dva balíčky kapsúl: udržiavacie kapsuly a suplementárne kapsuly. Podľa inštrukcií mali denne užívať 6 udržiavacích kapsúl ak neboli nachladnutí, a 6 suplementárnych kapsúl pri nachladnutí. Osoby zaradené do prvej skupiny dostali obidva balíčky kapsúl s placebom. Osoby v druhej skupine užívali placebo ako udržiavacie kapsuly, ale pri nachladnutí prešli na užívanie vitamínu C. Tretia skupina bola nastavená opačne ako druhá: zaradené osoby užívali vitamín C ako udržiavacie kapsuly a placebo ako suplementárne kapsuly. Štvrtá skupina dostávala vitamín C v obidvoch druhoch kapsúl. Pre osoby, ktoré dostávali vitamín C v udržiavacích alebo suplementárnych kapsulách bola cieľová dávka 3 g denne (6 × 500 mg), kým osoby, ktoré dostávali vitamín C v udržiavacích aj suplementárnych kapsulách dostávali 3 g vitamínu C denne keď neboli nachladnuté a 6 g pri nachladnutí.

Najdôležitejšou črtou tejto štúdie je to, že osoby boli do jednotlivých skupín zaradené náhodným výberom a takýto experimentálny plán sa označuje ako *randomizovaná štúdia*, na rozdiel od prospektívnych štúdií a štúdií typu prípad-kontrola. Randomizácia umožňuje prekonať základné riziko neexperimentálnych štúdií spočívajúce v tom, že iné premenné veličiny, okrem tých, ktoré sú študované, môžu byť skutočnou príčinou zistených rozdielov. Predstavme si, že by výskumníci NIH vyzvali zúčastnené osoby, aby sa dobrovoľne prihlásili do jednotlivých skupín podľa vlastného výberu: do dvojito placebovej skupiny, ak by boli skeptickí k vitamínu C, alebo do skupiny, v ktorej sa podávajú iba kapsuly s vitamínom C, ak by jeho účinku verili, alebo do jednej z prostredných skupín, ak by v tejto otázke nemali vyformovaný pevný postoj. Výsledok takejto štúdie by nebolo možné interpretovať, pretože takto samoformované skupiny sa medzi sebou môžu odlišovať vo veľkom počte iných faktorov, ktoré môžu súvisieť jednak s voľbou skupiny a jednak s odolnosťou proti nachladnutiu, čím by sa znehodnotila interpretácia výsledkov. Napríklad mladší zamestnanci NIH mohli byť viac skeptickí ohľadom vitamínu C ako starší zamestnanci a mohli s väčšou pravdepodobnosťou zvoliť svoje zaradenie do skupiny s placebovými suplementárnymi tabletami. Navyše mladší zamestnanci mohli mať aj vyššiu chorobnosť na nachladnutie, pretože frekvencia nachladnutí sa zvyčajne znižuje s rastúcim vekom. Takže takýto „experiment“ by ukázal, že tí, ktorí užívali vitamín C, mali menej časté a miernejšie nachladnutia ako tí, ktorí užívali placebo, a pritom by to mohol byť nesprávny záver.

Problém ilustrovaný na tomto hypotetickom príklade je v podstate rovnaký ako v prípade švajčiarskej štúdie o vplyve antioxidantov na pamäťový výkon (Perrig et al., 1997). V Perrigovej štúdiu mali testované osoby odlišné plazmatické hladiny antioxidantov, pretože mali rôzne genetické vybavenie, diétu, vek, pohlavie a životný štýl. Preto nebolo možné jednoznačne zhodnotiť, či boli rozdiely v pamäťovom výkone zapríčinené rozdielmi v plazmatických hladinách antioxidantov alebo niektorým z týchto confounderov. V randomizovaných štúdiách umožňuje náhodné zaradenie osôb do jednotlivých skupín zmierňovať takúto neistotu, pretože priemerné hodnoty potenciálnych confounderov sa pravdepodobne nebudú líšiť medzi jednotlivými sku-

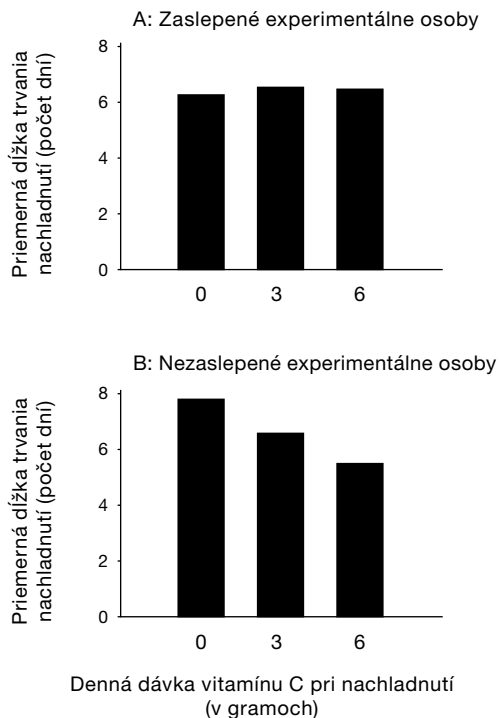
Obrázok 2.2 Frekvencia nachladnutí (A) a priemerná dĺžka ochorenia (B) v štyroch skupinách zamestnancov Národného inštitútu pre zdravie (NIH), študovaných Karlowskim a jeho spolupracovníkmi (1975). Rozdiely v druhu suplementárnych kapsúl (čierne a biele stĺpce) by nemali mať vplyv na frekvenciu nachladnutí, ale mohli by ovplyvniť ich trvanie, ak by mal vitamín C terapeutický účinok. Rozdiely medzi podávanými udržiavacími kapsulami (ľavé a pravé dvojice stĺpcov) by podľa hypotézy mali ovplyvniť frekvenciu i trvanie nachladnutí.



pinami, a to najmä v prípade štúdií s veľkým počtom subjektov v skupinách. Toto je dôsledok randomizácie. Predstavme si, napríklad, zostavenie dvoch softbalových tímov zo skupiny 100 mužov a 100 žien. Ak by sme z tejto skupiny vyberali ľudí do tímov náhodne, potom by bol v oboch tímoch približne rovnaký počet mužov a žien, a tento princíp by sa uplatnil aj vtedy, ak by sme podobne zostavovali skupiny pre experimentálnu liečbu a kontrolu.

Skôr, ako sa dostanem k výsledkom tejto štúdie, spomeniem ešte dva ďalšie aspekty jej plánu, ktoré sú bežné v medicínskych a nutričných experimentoch. Po prvé, mala to byť dvojito zaslepená štúdia, čo znamená, že testované osoby nemali vedieť, či dostávajú kapsuly s vitamínom C, alebo s placebom na udržiavacie alebo suplementárne užívanie. Rovnako ani výskumníci nemali vedieť, do ktorej skupiny patria jednotlivé testované osoby, keď zaznamenávali ich symptómy. Účelom dvojitého zaslepenia je potlačenie možnosti, že sa testované osoby a výskumníci vopred naladia podľa svojho očakávania, čím by sa do štúdie mohla vniesť odchýlka (*bias*). Ak by testované osoby, ktoré veria vitamínu C, vedeli, že užívajú tento vitamín, mohli by mať tendenciu podhodnocovať symptómy každého nachladnutia, na ktoré by počas trvania štúdie ochoreli. To isté by sa týkalo aj výskumníkov, ktorí by zaznamenávali experimentálne údaje. A po druhé, autori štúdie sa čiastočne spoliehali na vlastné hodnotenie zdravotného stavu testovanými osobami. Testované osoby mali totiž informovať o tom, koľkokrát boli nachladnutí a ako dlho u nich jednotlivé nachladnutia trvali, kým výskumníci vyhodnocovali mieru závažnosti dvadsiatich rôznych symptómov nachladnutia u tých osôb, ktoré navštívili kliniku, aby dostali suplementárne kapsuly obsahujúce vitamín C alebo placebo.

Priemerný počet nachladnutí počas deviatich mesiacov štúdie bol približne rovnaký u osôb, ktoré užívali udržiavaciu dávku 3 g vitamínu C denne (1,27), aj u tých, ktorí užívali



Obrázok 2.3 Priemerná dĺžka nachladnutí v štúdiu NIH u osôb, ktoré nehádali, do ktorej skupiny boli zaradené (A), a osôb, ktoré odhadovali, do ktorej skupiny patria (B). Denná dávka vitamínu C počas nachladnutí bola 0 pre skupinu s dvojitým užívaním placebo, 3 gramy v skupine, ktorá užívala vitamín C buď v udržiavacích, alebo v suplementárnych kapsulách, a 6 g v skupine, ktorá dostávala vitamín C v oboch druhoch kapsúl. Dáta pochádzajú od Karlowského a spolupracovníkov (1975).

placebo (1,36). Rozdiel o 0,09 nachladnutí viac u každej osoby z placebovej skupiny nebol štatisticky významný, lebo pravdepodobnosť, že k nemu došlo iba náhodou bola viac ako 50%. Pozoruhodnou skutočnosťou je to, že ani rozdiel v priemernom počte nachladnutí medzi skupinami, v ktorých zaradené osoby užívali rovnaké udržiavacie, ale rôzne suplementárne kapsuly, nebol menší ako 0,09. Osoby, ktoré užívali počas 9 mesiacov placebo ako udržiavacie i suplementárne kapsuly, mali priemerne na jednu osobu o 0,11 nachladnutí viac než osoby, ktoré užívali placebo ako udržiavacie a vitamín C ako suplementárne kapsuly (dva stĺpcové grafy na ľavej strane obrázka 2.2A), kým osoby užívajúce vitamín C v udržiavacích i suplementárnych kapsulách mali na každú osobu priemerne o 0,15 nachladnutí viac, ako osoby užívajúce vitamín C v udržiavacích a placebo v suplementárnych kapsulách (dvojica stĺpcových grafov na pravej strane obrázka 2.2A). Obsah užívaných suplementárnych kapsúl by však nemal mať vplyv na frekvenciu nachladnutí, pretože testované osoby ich užívali až potom, čo ochoreli na nachladnutie a užívali ich iba počas 5 dní, takže by nemali ovplyvniť pravdepodobnosť ochorenia na nachladnutie počas nadchádzajúcich studených týždňov a mesiacov. Preto je možné usúdiť, že rozdiely v počte nachladnutí zistené pri rôznych suplementárnych tabletách sú náhodné a že aj približne rovnako veľké rozdiely medzi skupinami s rôznymi udržiavacími kapsulami sú pravdepodobne tiež iba dôsledkom náhody.

Výsledky tejto štúdie sú však aj tak zaujímavé. Karlowského tím (1975) zistil, že nachladnutia trvali priemerne 7,14 dní u osôb užívajúcich placebo v oboch druhoch tabliet, 6,59 dní u osôb, ktoré užívali vitamín C v udržiavacích alebo suplementárnych tabletách a 5,92 dní u osôb, ktoré denne užívali vitamín C keď boli zdravé, ale tiež pri nachladnutí (obr. 2.2B). Podľa týchto výsledkov je užívanie vitamínu C spojené s malým, ale štatisticky významným

skrátением dĺžky trvania nachladnutia asi o 0,5 dňa u osôb s denným príjmom 3 g vitamínu C a viac ako o jeden deň u osôb užívajúcich 6 g vitamínu C denne. Okrem toho mali osoby užívajúce vitamín C ľahší priebeh nachladnutia, než osoby užívajúce placebo.

Možno ste si uvedomili problémy spojené s týmito výsledkami. Táto štúdia bola organizovaná vo veľkom zhone a ako placebo boli použité tablety, ktoré mali sladkú chuť po laktóze, kým vitamín C je kyslý. Obidve látky boli podávané vo forme kapsúl, takže by to bolo v poriadku, ak by testované osoby kapsuly prehltali celé, ale počas 9 mesiacov štúdie niektoré zúčastnené osoby zjavne podľahli pokušeniu rozhrýzť kapsuly a zistiť, čo užívajú. Inak povedané – dvojité zaslepenie štúdie sa nepodarilo dodržať. Výskumníci sa však o tomto probléme dozvedeli pomerne skoro, už na začiatku štúdie, pretože niektoré osoby sa priznali, že ochutnávali kapsuly, a tak identifikovali, čo im bolo podávané. Z tohto dôvodu všetky testované osoby vyplnili na konci štúdie dotazník, v ktorom mali uviesť svoj odhad, či užívali vitamín C alebo placebo. Týmto prieskumom sa zistilo, že 54 % sledovaných osôb sa snažilo odhadnúť, čo užívajú v denných udržiavacích kapsulách a 77 % z nich odhadlo užívanie kapsúl správne. Asi 40 % osôb sa pokúsilo odhadnúť, čo užívajú v suplementárnych tabletkách a 60 % odhadov bolo správnych.

Keď potom výskumníci z NIH vyhodnotili výsledky – zvlášť pre osoby, ktoré sa nesnažili odhadnúť, čo užívali v udržiavacích a suplementárnych kapsulách, a zvlášť pre osoby, ktoré sa pokúsili zistiť, čo im bolo podávané – prišli na zaujímavý nález (obr. 2.3). U osôb, ktoré nehádali obsah kapsúl, nebol zistený rozdiel v trvaní nachladnutia medzi tými, ktorí užívali placebo v obidvoch režimoch alebo 3 g vitamínu C v jednom režime, alebo 6 g vitamínu C denne (obr. 2.3A). Osoby, ktoré odhadovali druh podávaných kapsúl, sa vyznačovali kratším trvaním nachladnutí, ak užívali 3 g vitamínu C a ešte kratším nachladnutím pri dennej dávke 6 g (obr. 2.3B). Osoby odhadujúce druh kapsúl sú na obr. 2.3B označené ako nezaslepené experimentálne subjekty a patria medzi ne tí, ktorí odhadovali druh podávaných kapsúl správne, ale aj nesprávne. Tu sa ukazuje zdanlivý účinok placebo: ak si testovaná osoby myslí, že dostáva účinnú liečbu, môžu u nej nastať psychologické prejavy porovnateľné s priamymi fyziologickými účinkami, ktoré by mohla navodiť účinná liečba. V tomto prípade výsledky naznačujú, že osoby, ktoré si mysleli, že dostávajú placebo, mali dlhšie trvanie nachladnutia ako osoby, ktoré si mysleli, že dostávajú vitamín C bez ohľadu na to, čo vlastne užívali.

Tento príklad ilustruje jednu z vážnych slabín experimentálnych štúdií, a tou je náročnosť výberu a udržania vhodnej kontrolnej skupiny. V tomto prípade bolo porovnanie skupín osôb, ktorým bol podávaný vitamín C alebo placebo sťažené tým, že niektoré osoby sa snažili uhádnuť, do ktorej skupiny patria. Karlowski a jeho kolegovia dospeli k záveru, že veľké denné dávky vitamínu C nedokázali predchádzať nachladnutiu (obr. 2.2A), a že užívanie vitamínu C pri nachladnutí nedokázalo skrátiť trvanie choroby (obr. 2.3A), ani zmierniť príznaky nachladnutia (dáta nie sú ukázané). Tieto závery boli formulované na základe analýzy výsledkov, ktoré sa vzťahovali na osoby, čo skutočne nevedeli, do ktorej skupiny patria. Výskumníci tiež našli neobyčajný dôkaz placebového efektu (obr. 2.3B). Placebový efekt je problém, ktorý naďalej sužuje medicínsky výskum (Hróbjartsson a Gøtzsche, 2001).

Napriek uvedeným slabým stránkam bola táto štúdia z roku 1975 pozitívne prijatá v medicínskych kruhoch, a to pravdepodobne aj preto, že jej autori pracovali pre Národný inštitút zdravia a že táto štúdia bola publikovaná v jednom z prestížnych medicínskych časopisov v USA. Napriek tomu však boli jej závery kritizované zo strany zástancov prospechu z užívania vitamínu C. Zatiaľ poslednú a doteraz najdôslednejšiu kritiku uviedol Harri Hemilä (1996), vedecký pracovník z Fakulty verejného zdravotníctva Univerzity v Helsinkách.

Hemilä sa prejavil ako vášnivý obhajca hypotézy o priaznivých účinkoch vitamínu C v sérii článkov publikovaných v 90-tych rokoch 20. storočia. Išlo prevažne o prehľadové články, ktoré sumarizovali výsledky predchádzajúcich štúdií a v niekoľkých prípadoch aj nové analýzy pôvodných údajov. O tom, aký kritický postoj k tejto problematike zaujal Hemilä, svedčí už názov jeho článku z roku 1996 publikovaného v časopise *Journal of Clinical Epidemiology* „Vitamín C, placebový efekt a nachladnutie: štúdia o tom, ako vplyva zaujatost na analýzu výsledkov“. V tomto článku Hemilä nedokázal správne zhodnotiť výsledky Karlowského tímu, ale aj tak vniesol do diskusie jeden zaujímavý postreh. Podľa jeho názoru mohli byť kratšie a ľahšie nachladnutia u osôb, ktoré správne odhadli, že užívajú vitamín C, dôsledkom účinku vitamínu C a tento priaznivý účinok vitamínu C mohol v konečnom dôsledku uľahčiť testovaným osobám správny odhad, že užívajú vitamín C. Inými slovami, placebový efekt nie je príčinou neexistujúceho vzťahu medzi užívaním vitamínu C a miernejšími nachladnutiami, ale skôr výsledkom skutočného vzťahu medzi vitamínom C a miernejším priebehom ochorenia. Táto interpretácia poukazuje na zložitosť rozpletenia príčinných vzťahov v medicínskom výskume, čo bude neskôr vysvetlené aj v kapitole 6. Hemiläho hypotéza by sa dala testovať porovnaním nachladnutí u osôb, ktoré užívali vitamín C a túto skutočnosť správne odhadli, s tými osobami, ktoré si mysleli, že užívajú vitamín C, ale v skutočnosti im nebol podávaný. Hoci výskumníci z NIH najprv zamýšľali vykonať takéto porovnanie vo svojom pôvodnom článku, nakoniec usúdili, že počet osôb v týchto podskupinách nie je na takúto analýzu dostatočne veľký.

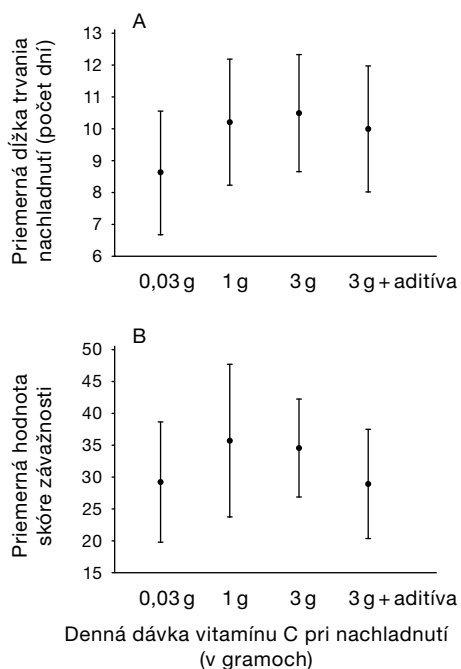
Druhý autor štúdie NIH bol Thomas Chalmers, ktorý bol v čase priebehu tejto štúdie riaditeľom klinického centra NIH. Na začiatku môjho výkladu k tejto štúdii som spomenul, že Chalmers vyjadril hrdosť nad vykonanou prácou a toto vyjadrenie bolo uvedené v publikovanom jednostranovom odmietnutí Hemiläho šesťstranovej kritiky. Chalmers svoje odmietnutie uzavrel týmito slovami: „Zhrniem to tak, že ma roztrpčuje strata času, ktorý musím venovať na odmietnutie tejto zaujatej kritiky autora, ktorý tu iba obhajuje zaslepené názory svojho nebohého učiteľa (Lina Paulinga) na askorbovú kyselinu. Možno by sa mala uskutočniť správne vykonaná, nezaujatá a aktualizovaná metaanalýza⁷ randomizovaných kontrolovaných štúdií, ale myslím si, že by to bola strata času“ (1996, s. 1085). Vo vedeckej literatúre sa nestretávame často s takým otvoreným vyjadrením emócií, hoci na vedeckých konferenciách niekedy lietajú iskry medzi zástancami odlišných vedeckých hypotéz.

Od začiatku 70-tych rokov sa uskutočnilo veľa experimentálnych štúdií ohľadom vitamínu C pri nachladnutí. Všetky dospeli k záveru, že užívanie vysokých denných dávok vitamínu C na prevenciu je zbytočné. Dokonca aj Hemilä s tým súhlasí, aj keď si myslí, že vitamín C môže mať preventívne účinky u ľudí vystavených fyzickej námahe alebo diétnym obmedzeniam. Experimentálne štúdie priniesli viac dôkazov v prospech hypotézy, že užívanie vysokých dávok vitamínu C na začiatku nachladnutia skraca trvanie a znižuje jeho závažnosť, hoci aj v týchto prípadoch sa výsledky jednotlivých štúdií dosť výrazne odlišujú. Svedčí o tom aj nedávna publikácia Roberta Douglasa a jeho kolegov (2001) o podozrivej súvislosti medzi nižšou kvalitou vedeckých prác a vyšším uvádzaným prospechom z užívania vitamínu C. Doteraz však neboli podrobne a systematicky vyhodnotené všetky experimentálne štúdie ohľadom vitamínu C pri nachladnutí, a preto sa nedá dospieť k definitívnemu záveru. Napriek tomu by som na tomto mieste ešte rád uviedol jednu z najnovších experimentálnych štúdií, aby som poukázal na to, ako sa metódy použité v tejto štúdii odlišujú od metód použitých v štúdii NIH zo začiatku 70-tych rokov. Potom uvediem určité všeobecné závery o význame experimentov na ľudských dobrovoľníkoch pre medicínsky výskum.

Carmen Auderová a jej traja kolegovia (2001) z Austrálskej národnej univerzity (ANU) v Canberre študovali terapeutický efekt vitamínu C na trvanie a závažnosť nachladnutí u zamestnancov a študentov ANU v období rokov 1998 – 1999. Podobne ako výskumníci z NIH, aj oni získali dobrovoľníkov ako testované osoby a pri ich výbere použili podobné kritériá ako v prípade štúdie NIH. Keďže Auderovej skupinu zaujímalo testovanie terapeutických účinkov vitamínu C, testovaným osobám nariadili, aby podávané prípravky užíli na začiatku nachladnutia. Presnejšie – vtedy, ak mali dva typické príznaky nachladnutia počas aspoň štyroch hodín, alebo si boli istí „štyri hodiny, že sú nachladnutí“ (2001, s. 360). Za týchto okolností mali začať užívať tablety, ktoré na tento účel dostali a mali v užívaní pokračovať počas prvých troch dní nachladnutia.

V tejto štúdií obsahovali placebové tablety 10 mg vitamínu C a placebo sa podávalo v dávke 3 tablety (30 mg vitamínu C) denne. Okrem tejto kontrolnej skupiny boli vytvorené aj tri intervenčné skupiny. V prvej z týchto skupín dostávali sledované osoby 1 g vitamínu C denne počas 3 dní, v druhej 3 g vitamínu C denne a v tretej prípravok Bio C s obsahom 3 g vitamínu C a ďalších štyroch látok, o ktorých sa uvažovalo, že by mohli zmierňovať priebeh nachladnutia (napr. výťažok zo šípok). Malé dávky vitamínu C mali v úlohe placeba tú výhodu, že chuť podávaných placebových tabliet bola zdanlivo neodlíšiteľná od tabliet určených pre ostatné tri experimentálne skupiny, ktorým podávali podstatne vyššie dávky. A pritom v prípade placeba išlo o nízke dávky, oveľa nižšie ako tie, ktoré podľa zástancov vitamínu C liečia nachladnutie. Tieto nízke dávky v placebových tabletách boli v podstate porovnateľné s minimálnymi dennými dávkami vitamínu C potrebnými na predchádzanie skorbutu. A naozaj, iba 17 % sledovaných osôb sa pokúšalo uhádnuť, do ktorej skupiny patria a väčšina odhadov bola aj tak nesprávna. V tomto smere sa uvedená štúdia odlišovala od štúdie NIH, v ktorej bola ako placebo použitá laktóza, v dôsledku čoho podstatne väčšie percento zapojených osôb odhadovalo, do ktorej skupiny patria.

Podobne ako v štúdií NIH, osoby zapojené do tejto štúdie boli náhodne zaraďované do jednotlivých skupín. Jedným z problémov tejto štúdie bol vysoký „drop out“, čo znamená, že z nej odišlo veľa zapojených osôb ešte skôr, než nahlásili nejaké príznaky nachladnutia. Autori štúdie nešpecifikovali, či osoby, ktoré prestali spolupracovať boli väčšinou študenti alebo zamestnanci ANU. Ale počty nachladnutí u osôb, u ktorých sa dokázali údaje zozbierať, boli približne rovnaké pre všetky štyri skupiny, čo svedčí o tom, že zo všetkých štyroch skupín bol „drop out“ rovnako pravdepodobný. Ďalší problém tejto štúdie, ktorý bol oveľa vážnejší, spočíval v tom, že pokusné osoby samy rozhodovali o tom, či majú začať užívať pridelené tablety a mali samy zaznamenávať závažnosť príznakov nachladnutia. Ako sa to mohlo odzrkadliť na spoľahlivosti údajov? Ak boli osoby v jednotlivých skupinách rovnako presné alebo rovnako nepresné pri zaznamenávaní symptómov nachladnutia, potom sa fakt, že sledované osoby samy zaznamenávali závažnosť príznakov nemohol prejaviť systematickými rozdielmi medzi skupinami. Napríklad, ak by prevládala tendencia zväčšovať príznaky, táto by sa prejavila vyšším priemerným skóre závažnosti v rovnakej miere pre všetky štyri skupiny, takže rozdiely medzi skupinami by boli rovnako veľké ako v prípade, že by tendencia zväčšovať príznaky neexistovala. Jedným z dôvodov náhodného zaraďovania subjektov do jednotlivých skupín v tejto štúdií bola snaha minimalizovať pravdepodobnosť, že by sa v niektorej skupine ocitlo viac hypochondrov ako v iných skupinách. Inými slovami, bádatelia sa snažili zostaviť experimentálne skupiny tak, aby v nich bola rovnaká tendencia zväčšovať príznaky. Štúdia však mohla byť znehodnotená aj v tom prípade, že by sledované osoby nezačali užívať pridelené tablety dostatočne skoro, a to aj vtedy, ak by medzi skupinami neexistovali rozdiely v priemernom čase medzi prvými príznakmi nachladnutia a začiatkom užívania tabliet. A skutočne sa zistilo, že od začiatku príznakov nachladnutia do užívania prvej dávky pridelených tabliet uplynulo priemerne 13,4 hodiny namiesto 4 hodín, ktoré



Obrázok 2.4 Priemerná dĺžka trvania príznakov nachladnutia (A) a priemerné skóre závažnosti príznakov (B) u osôb v štyroch experimentálnych skupinách v štúdiu na Austrálskej národnej univerzite (Audera et al., 2001). Tablety boli podávané počas prvých 3 dní nachladnutia. Dávka 0,03 g denne predstavuje placebo a 3 g + aditíva znamená, že bol podávaný prípravok „Bio C“, ktorý okrem 3 g vitamínu C obsahoval aj bioflavonoidy, rutín, hesperidín, šípkový extrakt a acerolu. Pokusné osoby denne hodnotili závažnosť kašľa, nosových, krčných a celkových príznakov v škále od 1 do 3. Graf B znázorňuje súčet skóre po 28 dňoch od začiatku nachladnutia. Tento čas zahŕňa celú dĺžku trvania ochorenia aj v prípade najdlhšie trvajúcich nachladnutí. Vertikálne úsečky predstavujú 95-percentný interval spoľahlivosti, t. j. štandardný ukazovateľ variability medzi výsledkami u jednotlivcov (pozri kapitolu 8). Pre každú z týchto skupín platí, že skutočný priemer leží niekde na týchto úsečkách s pravdepodobnosťou 95%. Veľké prekryvanie medzi týmito intervalmi spoľahlivosti naznačuje, že rozdiely vo výsledkoch medzi skupinami s rozličnou liečbou nie sú významné.

sa od sledovaných osôb vyžadovali v inštrukciách. Tento priemerný čas sa medzi jednotlivými skupinami nelíšil, ale zástancovia vitamínu C mohli argumentovať tým, že vysoké dávky vitamínu C musia byť podané už úplne na začiatku nachladnutia, aby sa dosiahla ich účinnosť, preto si objektívny test na overenie hypotézy o vitamíne C vyžaduje jeho podávanie oveľa skôr, ako 13 hodín od začiatku symptómov.

Na základe údajov o 184 nachladnutiach u 149 osôb dospela Auderovej skupina k záveru, že vitamín C nemá terapeutický účinok pri nachladnutí. Paradoxne, priemerný čas trvania nachladnutia bol najkratší v placebovej skupine a kumulatívny index príznakov po 28 dňoch od začiatku ochorenia bol v placebovej skupine druhý najnižší (obr. 2.4). Ale rozdiely medzi jednotlivými skupinami neboli štatisticky významné ani v prípade súhrnu príznakov, ani pre jednotlivé príznaky, ako napríklad trvanie nosových a krčných príznakov alebo celkových príznakov (zvýšená

teplota, bolesti hlavy a pod). Ako som už naznačil v predchádzajúcom odseku, táto štúdia nebola bezchybná, ale aj tak poskytuje pomerne objektívny a presvedčivý dôkaz proti hypotéze, že vysoké dávky vitamínu C môžu úspešne liečiť nachladnutie. Dôležité je však aj to, že pri porovnaní tejto štúdie so štúdiou NIH na testovanie tej istej hypotézy je možné poukázať na mnohé ťažkosti, ktoré sprevádzajú medicínske alebo nutričné štúdie za účasti ľudských dobrovoľníkov.

Kým som stihol dokončiť prvý rukopis tejto kapitoly, objavili sa v našich miestnych novinách počas dvoch po sebe nasledujúcich dňoch dva články o iných metódach liečby nachladnutia. Prvý článok vyšiel na titulnej stránke pod názvom „Nový liek, ktorý môže vyliečiť nachladnutie“. Tento liek pod názvom pleconaril bol testovaný v randomizovaných kontrolovaných štúdiách, podobných, ako boli popísané experimentálne štúdie účinnosti vitamínu C. Farmaceutická spoločnosť, ktorá tento liek vyvinula, požiadala o jeho schválenie na Úrade USA pre lieky a potraviny (*U.S. Food and Drug Administration – FDA*), aby získala oprávnenie na jeho uvedenie na trh, ale Poradný výbor FDA v marci 2002 odporučil vykonať ďalšie štúdie predtým, než bude liek schválený.⁸ Dávka pleconarilu potrebná na vyliečenie jedného nachladnutia by stála okolo 40 amerických dolárov, t. j. oveľa viac, ako by stála liečba vitamínom C za predpokladu, že by bol vitamín C účinný. Správa v novinách sa nezmieňovala o všetkých predchádzajúcich testoch vitamínu C a iba jednoducho konštatovala, že „vedci vyvinuli prvý prostriedok preukázateľne schopný skrátiť trvanie nachladnutia a zmierniť jeho príznaky“ (*Reno Gazette-Journal*, 18 December 2001). Pleconaril podľa všetkého priamo pôsobí proti rinovírusom, ktoré sú najčastejšími pôvodcami nachladnutia. Druhý článok propagoval použitie nefiltrovaného piva na liečbu príznakov nachladnutia. Táto metóda mne osobne pripadá najlepšia zo všetkých.

VÝHODY A NEVÝHODY ANALYTICKÝCH A EXPERIMENTÁLNYCH ŠTÚDIÍ

V tejto kapitole sme sa zaoberali experimentálnymi i neexperimentálnymi (analytickými) štúdiami, ktoré testovali, či sa vitamín C a iné antioxidanty vyznačujú rôznymi priaznivými účinkami na ľudské zdravie. Aj keď experimentálne štúdie majú svoje úskalia, zdôraznil som ich výhody, vďaka ktorým sa odôvodnene stali zlatým štandardom súčasného medicínskeho výskumu. Napriek tomu však nemôžeme v medicínskom výskume jednoducho zavrhnúť význam prospektívnych štúdií typu prípad-kontrola a iných neexperimentálnych (analytických) dizajnov. Tieto štúdie môžu poskytnúť dôležité informácie v prípadoch, keď by boli experimentálne štúdie nepraktické alebo neetické. Napríklad nikto vážne nepochybuje o tom, že fajčenie má viaceré negatívne dôsledky na ľudské zdravie, a pritom väčšina dôkazov na podporu tohto záveru pochádza z veľkých dlhodobých porovnaní fajčiarov s párovanými skupinami nefajčiarov. V tomto prípade bolo párovanie prípadov a kontrol vykonané tak, aby sa odfiltrovali efekty čo najväčšieho počtu confunderov, čo malo byť dostatočnou náhradou za náhodné zaradenie „dobrovoľníkov“ do skupín, v ktorých by sledované osoby fajčili alebo sa zdržali fajčenia počas viacerých rokov. To, že fajčenie predstavuje jedno z najvýznamnejších zdravotných rizík, ktoré je možné ovplyvniť prevenciou, bolo znovu a znovu potvrdené tým, že viaceré štúdie rôznych skupín zapojených osôb dospeli k tomu istému záveru. Okrem toho dôkazy získané experimentálnymi a neexperimentálnymi štúdiami sa často vzájomne dopĺňajú pri hľadaní odpovedí na otázky v medicíne, ako aj v iných biologických vedách. Použitie kombinácií rôznych typov dôkazov pri hľadaní odpovedí na biologické otázky rozoberiem v 4. kapitole na príklade dvoch nedávno riešených ekologických problémov.

Zaužívaná prax vo vede niekedy, žiaľ, vedie k preceňovaniu experimentálnych metód. Na tomto mieste uvediem fascinujúci príklad, ktorý súvisí s chorobou novorodencov označovanou ako

perzistentná pulmonálna hypertenzia (PPH). Pri klasickej liečbe PPH prežíva iba asi 20 % pacientov. Koncom 70-tych rokov začala skupiny výskumníkov na Univerzite v Michigane (Barlett et al., 2000) testovať novú metódu liečby pod názvom „mimotelová membránová oxygenácia“ (*Extracorporeal Membraneous Oxygenation – ECMO*), pri ktorej krv pacientov počas niekoľkých dní prechádza cez mimotelové zariadenie nahrádzajúce srdce a pľúca. Touto terapiou sa podarilo zvýšiť prežívanie na 80 %, ale autori štúdie nedokázali úplne dôverovať takému dramatickému úspechu. Možno sa ich pacienti nejako odlišovali od predchádzajúcich pacientov a tento rozdiel, a nie samotná nová liečba, viedol k ich zlepšenému prežívaniu. Z uvedeného dôvodu autori navrhli malú randomizovanú štúdiu na porovnanie klasickej liečby a ECMO. Pretože nová liečba sa zdala byť tak veľmi úspešná, a autori ju chceli sprístupniť čo najväčšiemu počtu pacientov, použili metódu randomizácie označenú ako „randomized play the winner“. Metóda liečby prvého dieťaťa postihnutého perzistentnou pulmonálnou hypertenziou mala byť zvolená úplne náhodne, t. j. dieťa malo 50% šancu byť liečené ECMO a 50% šancu byť liečené klasickou metódou. Ak by bola nová liečba úspešná, pravdepodobnosť jej použitia u ďalšieho dieťaťa by sa zvýšila. Stalo sa to, že prvé dieťa náhodne zaradili na liečbu metódou ECMO a toto dieťa prežilo, kým u druhého dieťaťa bola použitá klasická metóda a dieťa zomrelo. V tejto fáze štúdie bola podľa dopredu definovaných pravidiel randomizácie zvýšená šanca na použitie ECMO u ďalšieho dieťaťa na 75 % a pravdepodobnosť použitia klasickej liečby klesla na 25 %. Ďalších 10 detí takto dostalo liečbu novou metódou a všetky deti prežili. Výsledky tejto štúdie boli publikované v roku 1985 a uviedlo sa 11 prežívajúcich detí liečených ECMO a jedno úmrtie pri klasickej liečbe.

Táto štúdia bola zo strany iných výskumníkov podrobená ostrej kritike, pretože v nej iba jeden pacient dostal konvenčnú liečbu, a preto bola neskôr naplánovaná a uskutočnená aj štandardná randomizovaná štúdia podobná dvom popísaným experimentálnym štúdiám o vitamíne C (Ware, 1989; Royall, 1991). Z 9 pacientov zaradených do ECMO skupiny prežili všetci, kým z 10 pacientov v kontrolnej skupine liečených konvenčnou terapiou prežilo 6 detí. Tento príklad poukazuje na pálčivú etickú dilemu: bola smrť 4 detí, ktoré boli liečené klasickou liečbou v randomizovanej štúdiu potrebná na to, aby sa nezvratne potvrdila prednosť novej liečby? Alebo mali byť odborníci uspokojení už po prvotných porovnávaníach, pri ktorých nebola kontrolná skupina reálne zostavená z náhodne vybraných pacientov, ale sa fiktívne zostavila z pacientov, ktorí sa narodili skôr, než bola táto nová liečba známa (tzv. historická kontrola, pozn. prekl.)? Ako by sa zmenila odpoveď na túto otázku, ak by nebol efekt novej liečby taký výrazný? Ako vidieť, zdanlivo strohé technické aspekty vedeckej metodológie majú niekedy veľmi praktické a etické súvislosti.

ODPORÚČANÁ LITERATÚRA

- Centre for Evidence-Based Medicine. 2003. Evidence-based medicine. <http://www.cebm.net> (accessed October 1, 2003). Toto je internetová stránka z Veľkej Británie, ktorá propaguje a podporuje medicínu založenú na dôkazoch, t. j. používanie nekompromisných štandardov pre dôkazy pri hodnotení medicínskych postupov.
- GIERE, R. N. 1997. *Understanding scientific reasoning*, 4th ed. Harcourt Brace College Publishers, Fort Worth, Tex. Základná učebnica na tému, ako vedci testujú hypotézy a vyhodnocujú dôkazy, s množstvom dobrých príkladov.
- WARE, J. H. 1989. Investigating therapies of potentially great benefit: ECMO (with discussion). *Statistical Science* 4:298–340. Výmena názorov medzi zástancami rôznych postojov k etickým aspektom experimentovania v medicíne.