



TEHNOLOŠKE ZABILJEŠKE

Uređuje: Dušan Ražem

Ponovljivost u kemijskim istraživanjima

Jedna od odlika koje definiraju znanost je ponovljivost. U skorašnje vrijeme, međutim, prisutna je sve veća zabrinutost zbog slabe ponovljivosti rezultata istraživanja, posebice u biomedicinskim istraživanjima. U ovom uvodniku urednici razmatraju značaj ponovljivosti u kemijskim istraživanjima i predlažu mjere koje bi imale voditi smanjivanju problema koje uzrokuje neponovljivost u kemiji.

Izvori neponovljivosti

Problemi uslijed neponovljivosti mogu ići od vrlo ozbiljnih do relativno sitnih. Dok se u kemiji rijetko događa da se objavljeni rezultati u cijelosti ne mogu ponoviti, nije neuobičajeno da se ne mogu točno ponoviti prinosi reakcija, selektivnost spojeva i drugi objavljeni podatci. Ta vrsta neponovljivosti uobičajena je posebice u sintetskoj kemiji.

Vjerujemo da namjerno krivotvorenje podataka nije nepoznat izvor neponovljivosti, ali ono je rijetko u kemiji. Mnogo češći problemi s neponovljivosti nastaju kad istraživači objavljuju neispravne podatke za koje vjeruju da su ispravni ili kad prilagođavaju rezultate svjesno ili nesvjesno da bi pristajali njihovim predviđanjima. Treći uzrok neponovljivosti uključuje rezultate objavljene u dobroj vjeri, ali do kojih je jednostavno preteško doći da bi se ponovili u drugim laboratorijima.

Namjerno krivotvorenje podataka, osim izravnog izmišljanja, javlja se u raznim oblicima. Koliko je raširen problem prilagođavanja podataka da bi se poduprlo autorovo tumačenje rezultata? Uvid u tu problematiku pružili su urednici časopisa *Organic Letters*, koji su našli da se u 2 – 3 % rukopisa nalaze tragovi naknadnog uklanjanja vršaka u spektrima NMR te da se taj postotak ne smanjuje s godinama. Slične povrede ponašanja uključuju uklanjanje podataka koji nisu u skladu sa željenim rezultatima i objavljivanje samo najboljih prinosa ili selektivnosti za sintetske reakcije.

Nesvjesne predrasude istraživača

Neki od najviše raspravljanih slučajeva neponovljivih rezultata u kemiji tiču se istraživača koji su iskreno vjerovali da su njihovi neponovljivi rezultati ispravni. Poznati primjeri iz kemije i drugih disciplina uključuju slavnu "hladnu fuziju" Ponsa i Fleischmanna i Benvenisteovo istraživanje homeopatskog učinka otopine koja je sadržavala manje od jedne molekule nekog pripravka antitijela.

Ti primjeri naglašavaju jedan od najmučnijih problema znanstvene neponovljivosti, kojemu su, po našem mišljenju, znanstvenici poklonili premalo pozornosti, a to je nesvjesna predrasuda istraživača. Osobito rječita u tom smislu je studija koju je prije mnogo godina objavio psiholog Robert Rosenthal, a ticala se istraživanja ponašanja štakora u labirintu. Eksperimentatorima je bilo rečeno da su štakori iz jedne grupe već prošli trening u labirintu, a da drugu grupu čine netrenirani štakori, dok su životinje zapravo bile slučajno pomiješane. Istraživači su izvjestili da su se navodno trenirani štakori bolje snalazili u labirintu, iako su se zapravo razlikovali samo po očekivanjima koja su od njih imali eksperimentatori.

Predrasuda istraživača postala je glavni uzrok za tumačenje neponovljivosti u psihološkim i sociološkim krugovima, osobito kad su istraživanja popraćena slabom statističkom obradom podataka. Mi, međutim, vjerujemo da taj problem postoji i u "tvrđim" zna-

nostima. Osim gore navedenih primjera, mnogi kemičari znaju za druge slučajeve u kojima su istraživači uporno branili eksperimentalne rezultate i/ili tumačenja teorija dugo vremena nakon što je znanstvena zajednica zaključila da su pogrešni.

Ponavljanje valjanih rezultata

Krivotvorine i pogreške s pravom izazivaju zabrinutost, ali mi vjerujemo da većinu problema s ponovljivošću s kojima se susreću kemičari uzrokuju rezultati objavljeni u dobroj vjeri, tj. rezultati koje su autori stvarno dobili. Ponavljanje rezultata u sintetskoj organskoj kemiji, organometalnoj i anorganskoj kemiji ne prestaje biti problem čak i iskusnim i vještijim istraživačima. Koliki izazov predstavlja nastojanje da se ponove rezultati u sintetskoj organskoj kemiji, može se vidjeti iz iskustva jednog od nas, koji je glavni urednik časopisa *Organic Synthesis*. Taj časopis je jedinstven po tome što svaki eksperimentalni rezultat mora prije objavljivanja biti ponovljen u laboratoriju jednog od uglednih članova uredništva. Tijekom razdoblja 2010. – 2016., 7,5 % rukopisa podnesenih časopisu bilo je odbijeno jer se prinos ili selektivnost, kako su ih izvjestili autori, nisu mogli ponoviti unutar razumnih granica u laboratoriju jednog od članova uredništva. Budući da autori znaju da će uredništvo provjeravati njihov rad, može se pretpostaviti da su autori zaista dobili rezultate koje su naveli i da su bili uvjereni da će se njihov rad ponoviti. *Organic Synthesis* zahtijeva osobito detaljan opis eksperimentalnih postupaka, a ako tijekom provjeravanja dođe do problema, urednici traže pomoć od autora. Činjenica da se rezultati jednog od 13 radova ne mogu ponoviti čak ni uza sve navedene pogodnosti naglašava izazove koji prate ponovljivost u sintetskoj kemiji.

Preporuke

Što možemo poduzeti mi u kemijskoj zajednici da bismo povećali ponovljivost objavljenih radova? Preporuke koje slijede upućene su glavnim istraživačima i njihovim suradnicima, urednicima časopisa i članovima uredničkih odbora i recenzentima.

Glavni istraživači moraju blisko komunicirati sa suradnicima tijekom redovitih sastanaka na kojima se raspravljaju dobiveni rezultati i laboratorijske bilješke. U suradnjama koje obuhvaćaju različita istraživačka područja pojedini glavni istraživači moraju voditi računa o odgovornom vođenju svog dijela posla. Iako osiguranje financijske potpore predstavlja važan doprinos, koautorstvo također iziskuje izravno sudjelovanje u istraživanjima i obvezuje na značajan intelektualni doprinos radu.

Posebno je važan razuman skepticizam oko vlastitih rezultata. Glavni istraživači koji vježbaju svoje suradnike (i sebe!) da budu skeptični u svezi s rezultatima, osobito onima za koje žele vjerovati da su ispravni, pružaju dobar uzor. U nekim područjima istraživanja dobro je da glavni istraživači organiziraju neku vrstu "unutarnje provjere" ključnih rezultata prije slanja rukopisa. Primjerice, kad se radi o nekom novom sintetskom postupku, suradniku koji nema iskustva u tom području može se povjeriti da ponovi reprezentativan primjer samo na osnovi uputa u eksperimentalnom dijelu rada kako bi se provjerilo jesu li objavljene upute dostatne za postizanje ponovljivosti.

Predrasude glavnog istraživača mogu se protezati i na suradnike. Kad zabrinuti suradnici u laboratoriju postave mogući problem neponovljivosti, glavni istraživač morao bi se othrvati iskušenju da

“ubije glasnika” i morao bi pažljivo razmotriti primjedbe onih koji su se odvažili progovoriti. Ako su neispravni rezultati već objavljeni, glavni istraživač morao bi izbjegavati usredotočiti svu sramotu na suradnika koji je odgovoran za njih – za objavljene rezultate odgovorni su svi suradnici, uključujući i glavnog istraživača.

Mi se zalažemo za obvezatno zahtijevanje objavljivanja svih podupirućih informacija koje pružaju adekvatan uvid u eksperimentalne detalje. Najugledniji kemijski časopisi imaju izričite zahtjeve glede karakterizacije novih spojeva i za njih bi bilo prikladno da svoje zahtjeve prošire i na eksperimentalne pojedinosti. Obrasci za recenzentske izvještaje trebali bi uključivati izričit zahtjev da recenzenti komentiraju primjerenost eksperimentalnih detalja. Svi časopisi morali bi provjeravati jesu li podaci na bilo koji način manipulirani.

Priča o varljivom kurkuminu opominje kemičare na oprez

U zlatno-žutom začinu đumbiru vrebala kemijska varalica: kurkumin, molekula za koju se popularno vjeruje da ima medicinsku vrijednost, ali koja je odgovorna i za lažne rezultate u istraživanjima biološke aktivnosti. Kemičari godinama upozoravaju na oprez koji je potreban s kurkuminom i drugim spojevima koji mogu zavesti naivne lovce na lijekove.

U najnovijem pokušaju da zaustave neprekidno bujanje nestručnih istraživanja, znanstvenici su objavili dosad najpotpuniji kritički pregled kurkumina, da bi zaključili kako nema dokaza o ikakvim njegovim specifičnim terapijskim prednostima, unatoč tisućama istraživačkih radova i više od 120 kliničkih studija. Znanstvenici se nadaju da će taj pregled spriječiti daljnja uzaludna istraživanja i ukazati neopreznima na mogućnost da se neki spoj pokaže kao “pun pogodak” u istraživanjima farmakološke aktivnosti, koja zapravo ne postoji.

“Kurkumin je priča koja opominje”, kaže Michael Walters, medicinski kemičar sa sveučilišta Minnesote u Minneapolisu i glavni autor pregleda (*K. M. Nelson i dr., J. Med. Chem.* 60 (5) (2017) 1620–1637, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00975>), koji je objavljen 11. siječnja 2017. Uobičajena istraživanja farmakološke aktivnosti tragaju za spojevima koji se mogu vezati na protein koji se dovodi u vezu s nekom bolešću, što ukazuje na to da bi ti spojevi mogli biti ishodišta lijekova. Ali neke molekule, kakav je i kurkumin, pokazuju takvo ponašanje i kad nemaju nikakvu specifičnu biološku aktivnost. Molekule mogu biti prirodno fluorescentne, što ometa pokušaje da se fluorescencija rabi kao znak vezivanja za proteine. Mogu razdirati stanične membrane, što navodi na krive zaključke onih analiza koje tragaju za lijekovima koji pogađaju specifične proteine u staničnim membranama. Konačno, mogu se nekontrolirano raspadati na druge spojeve koji imaju različita svojstva, ili mogu sadržavati nečistoće, koje imaju svoje vlastite biološke aktivnosti.

“Kurkumin je najočitiji predstavnik onih promiskuitetnih molekula koje se često javljaju u istraživanjima farmakološke aktivnosti,” kaže James Inglese, koji predvodi razvoj metoda i tehnologija u tim istraživanjima za Nacionalno središte za napredne translacijske znanosti u Bethesda u Marylandu. “Mnogi istraživači na ovom području nisu svjesni svih problema koje ova ta stvar može uzrokovati.”

“Mnogo napora i financijskih sredstava uzaludno je potrošeno na istraživanja kurkumina,” kaže Gunda Georg, suurednica časopisa *Journal of Medicinal Chemistry*, koji je objavio pregled. Unatoč tome, kaže, časopis je obasut redovitim priljevom rukopisa o kurkuminu. Za kurkumin se tvrdi da pomaže kod takvih smetnji kao što su poremećaj erekcije, dlakavost, ćelavost, rak i Alzheimerova

Zajednica bi trebala ohrabrivati objavljivanje u časopisima koji održavaju visoke eksperimentalne standarde i time povećavati izgled za ponovljivost. To ohrabrenje može se postići uobičajenim sustavom nagrada (financiranje, promicanje, nagrađivanje).

Zadnje ali ne najmanje važno, recenzenti bi trebali biti više od rimskih careva, koji će samo pokazivati palcem prema dolje, već bi trebali ocjenjivati jesu li rukopisi dovoljno inovativni i značajni da bi zaslužili objavljivanje u pojedinom časopisu. Recenzenti imaju odgovornost da pažljivo ispituju prikladnost eksperimentalnih detalja i utemeljenost zaključaka. Možda se nedavno objavljivanje nekoliko radova s falsificiranim rezultatima moglo izbjeći da su recenzenti pažljivije analizirali rukopise.

Izvor: *Angew. Chem. Int. Ed.* 55 (37) (2016) 2–4, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201606591>.



bolest, ali nijedno djelovanje nikad nije dokazano, kaže Guido Pauli, koji se bavi istraživanjem prirodnih spojeva na Sveučilištu Illinoisa u Čikagu i jedan od koautora spomenutog pregleda.

Pauli misli da je dio problema u tome što istraživači ne znaju uvijek koju molekulu zapravo istražuju. Ekstrakti đumbira sadrže desetke raznih spojeva osim kurkumina, koji i sam podrazumijeva tri blisko srodne molekule. U nekim slučajevima istraživači možda opaze biološke učinke koji obećavaju, ali ih pripisuju krivoj molekuli.

Pogrešna tumačenja se množe sama od sebe. Izvješća o kurkuminu tvrde da su opaženi učinci čak i ako je istraživanje bilo pogrešno. “Ljudi prihvaćaju da je ono što je objavljeno u literaturi ispravno i na tome grade pretpostavke čak i kad to nije opravdano.” Znanstvenici ne provjeravaju literaturu da bi vidjeli jesu li neki spojevi obilježeni kao problematični. Najmanje 15 članaka o kurkuminu nakon 2009. je povučeno, a za desetke su objavljeni ispravci.

Mnogi istraživači su još optimistični glede kurkumina. “Postoje dokazi da je biološka aktivnost kurkumoida stvarna,” kaže Julie Ryan, radijacijska onkologinja s Medicinskog centra Sveučilišta u Rochesteru, u državi New York. Ona kaže da kurkumin stupa u međudjelovanje s mnogim različitim proteinima po čemu se razlikuje od mnogih lijekova. Ryan je ispitala kurkumin u kliničkim pokusima na dermatitis na više od 600 ljudi. Iako nije našla nikakav značajan učinak, kaže da postoje trendovi koji opravdavaju daljnja istraživanja. Ona misli da bi kemijski modificirani oblici kurkumina mogli biti učinkovitiji u tretiranju nekih tkiva.

Međutim, pregled pokazuje da će biti teško dobiti prave odgovore, kaže Bill Zuercher, kemijski biolog sa Sveučilišta Sjeverne Karoline u Chapel Hillu. “Moglo bi biti da kurkumin ili ekstrakti đumbira zaista imaju korisna djelovanja, ali da je vrlo složeno, pa možda i nemoguće doći do njih,” kaže on. Walters nije uvjeren da će njegov pregled zaustaviti slaba istraživanja. “Ljudi koji bi ga trebali pročitati vjerojatno neće,” kaže on.

Izvor: *Monya Baker, Nature*, 541 (2017) 144–145, doi: <https://doi.org/10.1038/541144a>