

## Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας

Τόμ. 60, Αρ. 3 (2009)



Από την ιδέα έως την υλοποίηση του in vivo πειραματικού πρωτοκόλλου. Συντονισμός και οργάνωση

A. E. PAPALOIS (Α.Ε. ΠΑΠΑΛΟΗΣ)

doi: [10.12681/jhvms.14934](https://doi.org/10.12681/jhvms.14934)

### Βιβλιογραφική αναφορά:

PAPALOIS (Α.Ε. ΠΑΠΑΛΟΗΣ) Α. Ε. (2017). Από την ιδέα έως την υλοποίηση του in vivo πειραματικού πρωτοκόλλου. Συντονισμός και οργάνωση. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*, 60(3), 250–253. <https://doi.org/10.12681/jhvms.14934>

## ■ From the idea to implementation of the in vivo experiment. Organizing and planning a new protocol.

A. E. Papalois, Biologist, PhD

*Experimental – Research Center ELPEN Pharmaceuticals*

## ■ Από την ιδέα έως την υλοποίηση του in vivo πειραματικού πρωτοκόλλου. Συντονισμός και οργάνωση.

A. E. Παπαλόης, Βιολόγος, PhD

Διευθυντής Ερευνητικού - Πειραματικού Κέντρου ELPEN Α.Ε. Φαρμακευτικής Βιομηχανίας  
Αναπληρωτής Καθηγητής (ΠΔ 407/80) Πανεπιστημίου Πατρών

**ABSTRACT.** A brief overview is presented of the key steps involved in designing a research animal experiment, with reference to resources that specifically address each topic of discussion in more detail. After an idea for a research project is conceived, a thorough review of the literature and consultation with experts in that field are pursued to refine the problem statement and to assimilate background information that is necessary for the experimental design phase. Other practical considerations include defining the necessary control groups, randomly assigning animals to control/treatment groups, determining the number of animals needed per group, evaluating the logistics of the actual performance of the animal experiments and identifying the most appropriate statistical analyses and potential collaborators experienced in the area of study. Also important concerns are anaesthesia, trial dosages of molecules-elements, definition of surgical procedures, sham experiments as control group and cost per experiment. Other factors are probable or expected timeframe for completion of experiments, sufficient financing, pathology and final histopathological examination, specific indicators or values necessary for the evaluation of the results and the origin of the research protocol (doctoral thesis, master or research interests). All of these factors are critical to designing an experiment that will generate scientifically valid and reproducible data, which should be considered the ultimate goal of any scientific investigation.

**Keywords:** experimental protocol, biomedical research, experimental design, pre-clinical studies, pilot experiments, organization

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Η επιθυμία ή η ανάγκη υλοποίησης μιας πειραματικής έρευνας, είτε ξεκινά από υπαρκτά κλινικά ερωτήματα είτε από την ανάγκη δοκιμής στην πράξη ανακαλύψεων βασικών επιστημόνων, σε κάθε περίπτωση, αναδεικνύει τη σημασία της επιστημονικής συνεργασίας. Η σύλληψη μιας ιδέας, η μετατροπή της σε πρωτόκολλο και ακολούθως η υλοποίηση του πρωτοκόλλου, είναι συνεχόμενοι κρίκοι μιας αλυσίδας. Το αρχικό στάδιο είναι η επεξεργασία της βιβλιογραφίας, διαπιστώνεται με τη μεγαλύτερη δυνατή σχολαστικότητα η πρωτοτυπία της ιδέας και ακολούθως σχεδιάζονται οι πειραματικές ομάδες (ομάδες ελέγχου, ομάδες πειραματικών δοκιμών και συγκεκριμένοι χειρισμοί). Θα πρέπει να λυθούν πρακτικά προβλήματα της υλοποίησης (εργαστήρια, υποδομές, μετρήσεις βιοχημικών παραμέτρων, σχεδιασμός της παθολογοανατομικής μελέτης, οικονομική κάλυψη και ασφαλώς συνεργάτες) για να φτάσει το πρωτόκολλο στην υλοποίηση. Τα πιλοτικά πειράματα αποδεικνύονται συχνά ως απολύτως αναγκαία. Σε κάθε περίπτωση ο σωστός σχεδιασμός των προ-κλινικών μελετών (in vivo πειραμάτων) είναι ο κυριότερος παράγοντας επιτυχίας σχεδόν του συνόλου της ερευνητικής προσπάθειας.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** πειραματικό πρωτόκολλο, βιοϊατρική έρευνα, σχεδιασμός, προ-κλινικές δοκιμές, πιλοτικά πειράματα, οργάνωση

*Correspondence:* A. E. Papalois  
Experimental – Research Center ELPEN Pharmaceuticals  
95, Marathonos Av., 190 09 Pikermi, Attika, Athens, Greece  
Tel.: +30-210-6038105, Mob.: 6977-711125, E-mail: apapalois@elpen.gr

*Αλληλογραφία:* Α. Ε. Παπαλόης  
Ερευνητικό – Πειραματικό Κέντρο ELPEN Α.Ε. Φαρμακευτικής Βιομηχανίας  
Α. Μαραθόνος 95, Πικέρμι Αττικής, Τ.Κ. 190 09, Τηλ.: 210-6038105, Κιν.: 6977-711125  
E-mail: apapalois@elpen.gr

*Submission date:* 27.07.2009  
*Approval date:* 16.10.2009

*Ημερομηνία υποβολής:* 27.07.2009  
*Ημερομηνία εγκρίσεως:* 16.10.2009

Η εργασία αυτή παρουσιάστηκε στο 2ο Πανελλήνιο Σεμινάριο Πειραματικής Βιοϊατρικής Έρευνας, Νοσοκομείο ΚΑΤ, 20-22 Νοεμβρίου 2008.

### Υλοποίηση πειραματικού πρωτοκόλλου.

Περισσότερα από το 70% των Βραβείων Nobel Ιατρικής και Φυσιολογίας από το 1900 μέχρι σήμερα, χρησιμοποίησαν ζωικά πρότυπα για την υλοποίηση ιστορικών πειραμάτων. Το γεγονός αυτό μας αναδεικνύει τη σπουδαιότητα και την αναγκαιότητα της πειραματικής βιοϊατρικής έρευνας. Η υλοποίησή της, που είναι ένας κεντρικός στόχος, δεν πρόκειται να επιτευχθεί, αν πρώτα δεν εξετάσουμε προσεχτικά τα βήματα που πρέπει να ακολουθήσουμε μέχρι την υλοποίηση ενός πρωτοκόλλου. Τα βήματα είναι τα ακόλουθα (Papalois 2007, Rosenberg 1999):

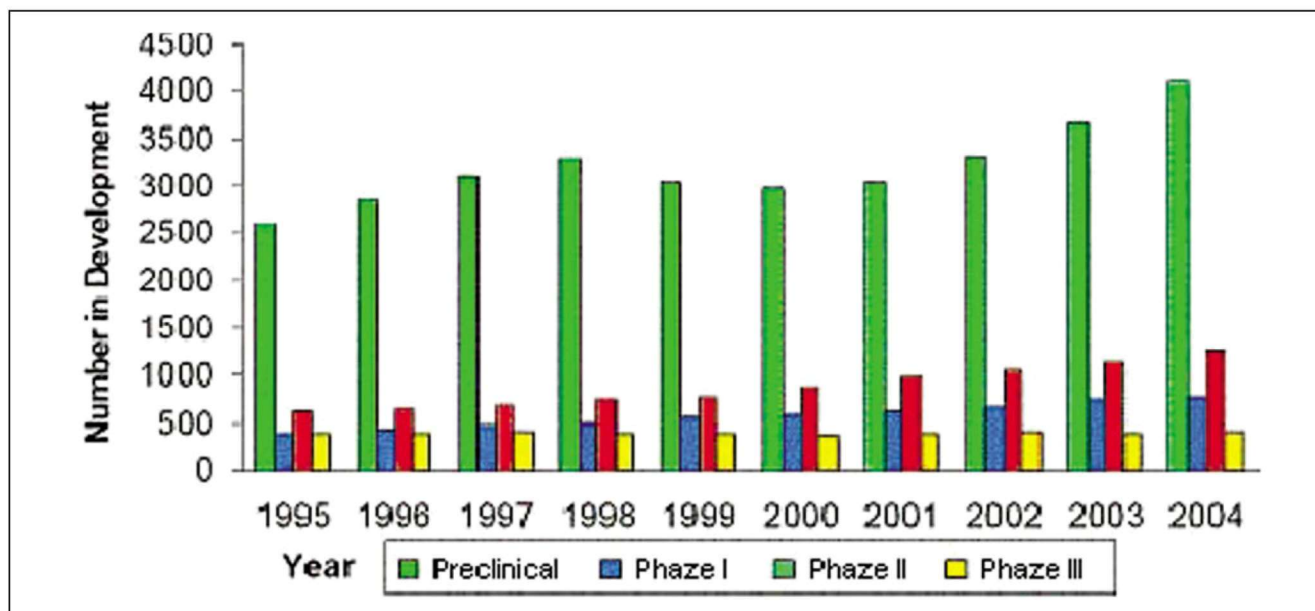
- 1 - Ιδέα
- 2 - Πρωτοτυπία της πρότασης
- 3 - Αναζήτηση της βιβλιογραφίας
- 4 - Σχεδιασμός πρωτοκόλλου (ομάδες ελέγχου, ομάδες δοκιμής νέων θεραπειών, συγκεκριμένοι χειρισμοί κ.λπ.)
- 5 - Οριστικοποίηση του πρωτοκόλλου και στελέχωση
- 6 - Έκδοση άδειας πειραματισμού
- 7 - Πιλοτικά πειράματα
- 8 - Υλοποίηση

Είναι φανερό ότι η φάση της υλοποίησης, δηλαδή ουσιαστικά της έναρξης των πειραμάτων, είναι το τελευταίο στάδιο μιας ιδιαίτερα επίπονης και αναλυτικής διαδικασίας και όχι η αρχή του πειράματος, όπως πολλοί πιστεύουν. Κατ' αρχήν θα πρέπει να εξεταστεί η αρχική υπόθεση ή η ιδέα της ερευνητικής πρότασης. Η ιδέα αυτή θα πρέπει να είναι πρωτότυπη βιβλιογραφικά ή η υπόθεσή της να στηρίζεται σε παλαιότερη δημοσιευμένη γνώση από άλλα πειράματα και να αποτελεί ουσιαστική συμβολή και περαιτέρω προώθηση της υπάρχουσας γνώσης. Η αναζήτηση της πρωτοτυπίας της πρότασης ασφαλώς στηρίζεται σε βιβλιογραφικά δεδομένα, αλλά κάθε άλλη επίσημη πηγή πληροφόρησης ή ενημέρωσης είναι θεμιτή, ανάλογα με το αντικείμενο της έρευνας (π.χ. ιστοσελίδες εργαστηρίων ή περιοδικών, επίσημες ιστοσελίδες οργανισμών, όπως το Food and Drug Administration ή η European Medicines Agency κ.ά.). Οποσδήποτε εί-

ναι σημαντική και η αναζήτηση πληροφόρησης σε πρακτικά έγκρων συνεδρίων, γιατί πολλές φορές αρκετές εργασίες αρχικά ανακοινώνονται πριν δημοσιευθούν. Η οργανωμένη πρόσβαση σε βάσεις δεδομένων και η συνεργασία με επιστήμονες ή ομάδες επιστημόνων που έχουν κοινά ερευνητικά ενδιαφέροντα είναι ιδιαίτερα σημαντική στην οργάνωση ενός νέου πρωτοκόλλου.

Ο σχεδιασμός του πρωτοκόλλου αποτελεί μια σημαντικότερη φάση της πορείας μέχρι την υλοποίηση. Στο σχεδιασμό θα αποδειχθεί το κατά πόσο έχουμε κατανοήσει οι ίδιοι το στόχο μας, το πώς επιδιώκουμε να τον αποδείξουμε ή να τον συγκρίνουμε με άλλες ομάδες, καθώς και η κατάρτισή μας στη μεθοδολογία της έρευνας. Τέλος ο σχεδιασμός του πρωτοκόλλου – πειράματος είναι και η εικόνα που θα «παράβουν» για την ιδέα μας και το πείραμά μας οι κριτές της εργασίας μας. Επομένως, η σαφήνεια των στόχων και η καθαρότητα της σκέψης πρέπει να διαπνέει όλη μας τη σκέψη (Festing M F W 2006).

Για την οριστικοποίηση του πρωτοκόλλου θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν μερικές ακόμα παράμετροι: η χρηματοδότηση της έρευνας, η καταγραφή της λίστας όλων των αναγκών μας, ποιοι και υπό ποιες συνθήκες μπορούν να συνεργαστούν μαζί μας και ποιες εναλλακτικές λύσεις έχουμε σε επιμέρους ζητήματα. Επίσης, όταν θα απαιτηθεί σε κάποια φάση του πειραματικού σκέλους του πειράματος ή της μέτρησης παραμέτρων να έχουμε εργαστηριακή υποστήριξη, ποιοι θα είναι οι συνεργάτες μας. Άλλα επιμέρους θέματα που χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής κατά την εκτέλεση ενός in vivo πειραματικού πρωτοκόλλου είναι η επιλογή του πρωτοκόλλου αναισθησίας, γιατί μπορεί, ανάλογα με τη φύση του πειράματος, να επηρεάζει τα αποτελέσματα. Σημαντικό θέμα είναι οι δοσολογίες των υπό δοκιμή μορίων – φαρμάκων ή των παραγόντων. Με τι κριτήρια επιλέγουμε τις δόσεις, με τι τις συγκρίνουμε και ποια άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα συνηγορούν σ' αυτό. Άλλη βασική παράμετρος είναι οι χειρουργικοί χειρισμοί. Για παράδειγμα, αν απαιτείται αποκλεισμός της ροής ενός μεγάλου κοιλιακού αγγείου, θα πρέπει να εξετάσουμε πως μπορεί να γίνει ο χειρισμός χωρίς απώλεια υγρών ή διαταραχή της γενικής κατάστασης του ζώου. Επίσης, οι χειρισμοί θα



**Figure 1.** The number of pre-clinical trials in the U.S.A., between 1995-2004 (source: Food and Drug Administration).

**Εικόνα 1.** Ο αριθμός των προ-κλινικών πειραματικών δοκιμών στις Η.Π.Α., από το 1995 έως το 2004 (πηγή: Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων).

πρέπει να έχουν σειρά και να εκτελούνται πάντα με απλότητα και τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Ολοκληρώνοντας τον κύκλο εργασίας μέχρι την οριστικοποίηση του πρωτοκόλλου, θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ο παράγοντας κόστος πειράματος, καθώς και της παρουσίας, την ημέρα και την ώρα που επιθυμούμε, του κατάλληλου ανθρώπινου δυναμικού. Άρα, ένα πείραμα που κατ' ανάγκη θα διαρκέσει μεγάλο χρονικό διάστημα, πρέπει να λάβει υπ' όψιν του αυτές τις παραμέτρους: πόσο υπολογίζεται ότι θα διαρκέσει και με τι προϋπολογιζόμενο κόστος.

Με άλλα λόγια, η κεντρική προσπάθεια πριν την υλοποίηση του πειράματος είναι, με αναλυτική και στρατηγική σκέψη, να καλυφθούν και να προβλεφθούν όλες οι ανάγκες του πειράματος. Αυτή η στρατηγική σκέψη αποδεικνύεται πολλές φορές ιδιαίτερα σημαντική. Είναι γεγονός ότι υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον και πολλές ιδέες για έρευνα, τόσο από νέους όσο και από ώριμους ιατρούς και άλλους επιστήμονες, αλλά η προετοιμασία της υλοποίησης, από μόνη της, αποτελεί άσκηση πνεύματος και θέλησης. Αυτός είναι ένας επιπλέον λόγος, για τον οποίο σε πολλές χώρες της δυτικής Ευρώπης, αλλά κυρίως σε νοσοκομεία των Η.Π.Α., η απασχόληση των ειδικευόμενων ιατρών σε πειραματικά πρωτόκολλα αποτελεί μέρος του επίσημου προγράμματος εκπαίδευσής τους και μάλιστα σε

κάποιες περιπτώσεις ακόμα και χωρίς συμμετοχή στο πρόγραμμα εφημεριών, προκειμένου να αφιερώσουν το μέγιστο των δυνάμεών τους. Η οριστικοποίηση του πρωτοκόλλου είναι εκείνη η φάση που θεωρητικά έχουμε λύσει και καθορίζει όλα τα επιμέρους βήματα και όλες τις επιμέρους παραμέτρους του πειράματος. Συντονισμός και στρατηγική είναι η πραγματική βάση κάθε σοβαρού πειράματος (National Institutes of Health 1995, Rhein 1996, Thompson 2000).

Η Εικόνα 1 μας περιγράφει πόσες προ-κλινικές πειραματικές δοκιμές νέων μορίων – φαρμάκων, βιοϋλικών και ιατρικών μηχανημάτων, εκτελέστηκαν στις Η.Π.Α. μεταξύ 1995 και 2004. Ξεπερνούν κατά μέσο όρο τις 3.000 δοκιμές ετησίως. Κάθε μια απ' αυτές περιλαμβάνει πολλές επιμέρους δοκιμές, δηλαδή πολλά επιμέρους πειράματα. Οι άλλες στήλες του ιστογράμματος παρουσιάζουν τις φάσεις των κλινικών δοκιμών (I, II και III) όσων μελετών πήραν την κατ' αρχήν έγκριση να προχωρήσουν σε δοκιμή σε ανθρώπους. Είναι προφανές το πόσες νέες θεραπείες κόπηκαν στη φάση των προ-κλινικών πειραματικών δοκιμών για διαφορετικές αιτίες (ασφάλεια, τοξικότητα, αναποτελεσματικότητα κ.λπ.). Μία μόνο ιδέα στις εκατό προχωρά και αφορά σε βιοϋλικό ή ιατρικό μηχανήμα. Επίσης, μόνο ένα στα δέκα χιλιάδες μόρια θα γίνει φάρμακο.

Η υλοποίηση του πρωτοκόλλου, όταν έχει γίνει ο σωστός σχεδιασμός από την ιδέα μέχρι τα αρχικά στάδια του πειράματος, αποτελεί μια «ομαλή» διαδικασία με μια όμως προϋπόθεση, τη σχολαστικότητα:

- 1 - Τη σχολαστικότητα στην εκτέλεση
- 2 - Τη σχολαστικότητα στην συλλογή δειγμάτων
- 3 - Τη σχολαστικότητα στην επεξεργασία τους

Τα πειράματα έχουν και προσωπικό όφελος, σε επίπεδο εκπαίδευσης και παιδείας. Τελευταίο στάδιο πριν την υλοποίηση του πρωτοκόλλου είναι η έκδοση άδειας πειραματισμού συμφώνως με το Προεδρικό Διάταγμα 160/1991 περί «Προστασίας των ζώων που

χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς» σε συμμόρφωση με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία (Ανώνυμος 1991). Το εργαστήριο στο οποίο εκτελείται ο πειραματισμός θα πρέπει να είναι επίσημο κατά το νόμο και αναγνωρισμένο για την εσωτερική δομή του και οργάνωση (ISO ή Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης ή αναγνώριση από διεθνείς επιστημονικούς φορείς ειδικούς για ζώα εργαστηρίου, όπως π.χ. International Council for Laboratory Animal Science κ.ά.). Τέλος, ορισμένα πιλοτικά πειράματα πολλές φορές αποδεικνύονται σημαντικά ή και «σωτήρια» στη σωστή διαμόρφωση των πρωτοκόλλων και στην αποφυγή λαθών. ■

#### REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ανώνυμος (1991) Προεδρικό Διάταγμα 160/1991 περί «Προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς» ΦΕΚ 64/Τεύχος Α' / 1991.
- Festing M F W (2006) Design and statistical methods in studies using animal models of development. *ILAR J*, 47 (1): 5 – 14.
- National Institutes of Health (1995) Division of Research Grants. Helpful hints preparing an NIH research grant application. NIH, Bethesda, MD, USA.
- Papalois A (2007) Cooperation of medical specialties with other scientists. How we organize a scientific protocol from the idea to implementation. Proceedings of the 1st Panhellenic Seminar for Experimental Biomedical Research, Athens, 11 – 14 December, 2007, page 68.
- Rhein R (1996) Grants. Constructing a strong application. *J NIH Res* (8): 29 – 30.
- Rosenberg L E (1999) Physician – scientists, endangered and essential. *Science*, (283): 331 – 332.
- Thompson J C (2000) Gifts from surgical research. Contributions to patients and to surgeons. *J Am Coll Surg* (190): 509 – 521.