

Podaci (data), opažanje (observation) i predmet/slučaj (item/case)

- Tijekom istraživanja prikupljaju se podaci (data) koji proizlaze iz određenih mjerenja ili opažanja (observations) predmeta istraživanja.
- Predmet (item) je jedinica promatranja a slučaj (case) je jedinica analize

Predmet može biti jedinka, stanica, organ, ili uzorak u epruveti

Primjer 2.1

Učinak gledanja utakmica uživo i onih snimljenih na rad srca kod nogometnih fanova i nefanova

Predmet je rad srca

Svaka osoba kojoj se mjeri rad srca je slučaj

a svaka izmjerena frekvencija je opažanje

Što je predmet, što slučaj?

- 2.2. Primjer učinak volumena stanične kulture na parametre rasta stanica duhana u tekućem mediju
- Istraživač želi utvrditi može li uspješnije kultivirati stanice duhana u mikroepruvetama (0.5 ml) ili u velikim volumenima. Sve to želi pratiti u kulturi tkiva mjereći vijabilnost i broj stanica.

Predmet su stanice duhana u pojedinačnoj suspenziji, a ako imate 10 suspenzija malih volumena jedna od njih je slučaj

Opažanje je broj vijabilnih stanica i ukupan broj stanica u uzorku za svaku pojedinačnu kulturu (slučaj)

U biti imamo dvije statističke populacije slučaja

Populacija je skup SLUČAJEVA na koje se istraživanje odnosi

U smislu ekologije to je skup svih jedinki iste vrste koje naseljavaju neko stanište

U genetici su to jedinke iste vrste koje se mogu međusobno razmnožavati

Ovo se odnosi na statističku populaciju

Primjer 2.3. učinak unošenja novih jedinki u stado životinja - cilj ovog istraživanja je utvrditi promjene ponašanja u stadu nakon uvođenja novih jedinki

Statistička populacija su sve JEDINKA te vrste u safari parku

Statistička populacija definirana je ciljem istraživanja

Nekada se poklapa s drugim tipovima npr. ekološkom populacijom

U primjeru 2.3. statistička populacija može biti vezana samo za taj safari park, ali se može odnositi na sve safari parkove ili čak na sve jedinke iste vrste na svijetu

Procjena je u rukama istraživača!

STATISTIČKA POPULACIJA JE SKUP SVIH SLUČAJEVA NA KOJI SE ISTRAŽIVANJE ODNOSI

U istraživanju često imamo više statističkih populacija

- Primjer 2.4. Učinak gledanja utakmica uživo i onih snimljenih na rad srca kod nogometnih fanova i nefanova
- Istraživanje je provedeno na studentima sveučilišta od 18 do 26 godina

Ovdje su dvije statističke populacije, fanovi određene starosne grupe i nefanovi iste grupe

Istraživanja se provode na dijelu populacije

- Populacija: definiran set elemenata ("sampling units") o kojem želimo nešto zaključiti
- KLASA: podgrupa populacije o kojoj želimo nešto zaključiti kako bi izbjegli buku u eksperimentu
- Uzorak: skup pojedinaca preuzet iz populacije, replikati, pokusne jedinice

UZORAK (SAMPLE)

Uzorak setu jedinki (subjekata) koje pripadaju statističkoj populaciji na kojem ostvarujemo opažanja

Set jedinki nužan je zbog nasumične varijabilnosti svakog biološkog sustava

1. Da bi statistika bila primjenjiva subjekti u uzorku moraju biti neovisni (independent data points)

PROBLEM PSEUDOREPLIKACIJE (kod međusobno povezanih, zavisnih uzoraka)

Primjer 2.5. Ako ispitujete prehrambene navike stanovnika

- Neovisni uzorci nisu članovi iste obitelji

Primjer 2.6. Ako ispitujete zastupljenost lijevaka u studentskom domu

- Neovisni uzorci mogu biti cimeri, ali ne mogu biti rođaci

Uzroci pseudoreplikacije

- Najčešći uzroci:
 - Srodnost (blisko srodne vrste su sličnije jedne drugima jer više dijele evolucijsku povijest, srodne jedinke iste vrste)
 - Zajednička nastamba
 - Zajednički okoliš
 - Zajednička eksperimentalna prošlost (npr. vegetativno razmnožene transgenične biljke nisu nezavisne linije ako vuku porijeklo od iste ishodišne mutante)
- **Itd.....ovisi o tipu istraživanja, ovisno o istraživanju treba pretpostaviti izvore i eliminirati PSEUDOREPLIKACIJU**

1. Ako ispitujete prehrambene navike stanovnika

- članovi iste obitelji su pseudoreplikati

2. Ako ispitujete zastupljenost lijevaka u studentskom domu

- Cimeri su OK, ali rođaci su pseudoreplikati

SRODSTVO KAO IZVOR PSEUDOREPLIKATA

Primjer 2.8: Smanjuje li obogaćivanje **nastambe** u kojoj žive čimpanze loptama agresivnost

- Dvije iste nastambe sa jednakim brojem životinja
- U jednu nastambu dodajemo više lopti
- Promatranjem utvrđujemo pad agresivnosti u obogaćenoj nastambi

Jesmo li dobili odgovor na pitanje?

NE, jer ponašanje 10 čimpanzi iste nastambe nije deset neovisnih mjerenja utjecaja broja lopti na ponašanje.

Životinje koje žive u istoj nastambi su pseudoreplikati jer je njihovo ponašanje uvjetovano i drugim karakteristikama nastambe a i okruženja (svake pojedine životinje u nastambi, nekoliko jako razigranih jedinki u istoj nastambi mijenja atmosferu, možda je jedna nastamba sunčanja itd...)

Nastambe se mogu međusobno razlikovati na razinama kojih nismo svjesni – **NASTAMBA KAO IZVOR PSEUDOREPLIKACIJA**

Zbog **utjecaja nastambe** rezultati ovakvog istraživanja ne moraju biti u skladu sa situacijom u prirodi

Primjer2.9: : Jesu li jeleni koji se hrane u šumi opterećeniji parazitima od onih koji se hrane na livadi
(**različita staništa KAO IZVOR PSEUDOREPLIKACIJE**)

- Slično kao i nastamba, stanište može biti izvor drugih okolnosti koje utječu na pojavu

Primjer2.10: je li mužjak ptice s crvenim kljunom privlačniji ženkama nego onaj s žutim

- U kavez stavimo dva mužjaka, crvenokljunog i žutokljunog
- Dvadesetak ženki puštamo jednu po jednu i bilježimo s kojim provode više vremena
- Prepoznajete li pseudoreplikaciju (pseudoreplikate)?

Višestruka mjerenja koristeći dva ista modela nisu neovisna. Sam podražaj u eksperimentu mogući je izvor pseudoreplikacije (možda crveni bolje miriši, možda je snažniji....).

PSEUDOREPLICIRANI PODRAŽAJ

Pseudoreplikati mogu nastati i zbog višekratnih mjerenja

- **Višekratna mjerenja** mogu biti ovisna jedno o drugom

Npr. ako pratimo tendenciju jelena prema šumi ili livadi na nekom staništu, te određujemo svakih 20 minuta je li jelen u šumi ili livadi, moramo imati na umu da je svaka lokacija vjerojatno posljedica prethodne (nekoliko prethodnih). To su pseudoreplikati.

Ako određujemo lokaciju svaki dan u 20.00h onda položaj jelena ne mora biti posljedica prethodnog mjerenja odnosno pseudoreplikat prethodnog mjerenja.

- Pseudoreplikati unose **zbunjujuće čimbenike/treće varijable**
- Da bismo otklonili sumnju pseudoreplikacije moramo poznavati biološki sustav koji promatramo
- To ne rade statističari!
- Nikada nismo potpuno sigurni (ne postoji savršen eksperiment!)

RANDOMIZACIJOM PRI UZORKOVANJU umanjujemo negativnosti pseudoreplikacija kojih nismo svjesni

KLASIFIKACIJOM PRIJE UZORKOVANJA umanjujemo negativnosti pseudoreplikacija kojih smo svjesni

Primjer klasifikacije

Definirajte klasu za istraživanje učinka kofeina na krvni tlak ljudi (hoćete li koristiti bilo kojeg pojedinca iz populacije?)

Mnoge klase imaju neograničen broj članova.

Veličina klase mora biti dovoljna za provedbe eksperimenta na dovoljnom broju replika

Varijabilnosti

- Dakle zanima nas jedan tip uzročnosti, a ostala svojstva težimo ujednačiti provedbom kontroliranih eksperimenata ili dodatnom definicijom **klase uzorka**

Općenito, želimo ukloniti ili kontrolirati varijabilnost između eksperimentalnih jedinica zbog faktora za koje nismo zainteresirani, kako bismo lakše vidjeli efekte faktora od interesa

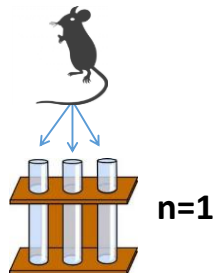
Replikati

- = pokusne jedinice/jedinice/slučajevi
- Replikacijom rješavamo interindividualne varijacije koje su prisutne zbog slučajne varijabilnosti
- Replikati su način na koji poništavamo utjecaj biološke varijabilnosti među jedinkama-slučajevima te povezujemo zavisnu varijablu (mjerenje) s nezavisnom (tretman)
- Čim imamo više mjerenja (replika), biti će veći izgledi da je razlika između pokusnih skupina nastala zbog učinka čimbenika koji mjerimo (a ne zbog slučajnosti)
- Na taj način omogućavamo generalizaciju bez obzira na varijabilnost
- Statistike su bazirane na replikama
- Pseudoreplikati (replike za koje mjerenja nisu neovisna jedno od drugog)

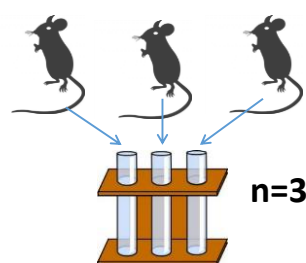
Ruxton GD, Colegrave N. Experimental Design for the Life Sciences, Oxford University Press, New York, 2011

- Važno je razlikovati tehničke i biološke

Tehničke



Biološke



Provođenjem tehničkih replika kao da su biološke uvodimo najvišu razinu pseudoreplikacije

Randomizacija i uzorkovanje

- Randomiziran i slučajan uzorak nisu jedno te isto

Imate 40 rakova za istraživanje, nalaze se u kavezu.

Slučajno uzorkovanje: rukom ih vadite jednog po jednog i dodajete u eksperimentalne grupe, prvo u prvu grupu, pa redom u drugu itd.....(neki su rakovi veći a neki su brži i to će utjecati na redoslijed kako ih hvatate, te na mogućnost treće varijable)

....ili ih dodajete u grupe nasumično (ni to nije potpuno randomizirano jer morate svjesno pratiti što radite)

Prava randomizacija (nasumičnost):



- Svaki rak dobiva broj
- Brojevi se pišu na identične papiriće i izvlače iz šešira (ili računalni program)
- Po izvučenom redoslijedu rakovi se dodaju u eksperimentalne skupine
- Članovi klase označeni su brojevima i birani kao na ruletu. Bilo koji član (broj) ima podjednaku šansu da bude izabran i na taj način svojstvo koje će biti studirano teško može utjecati na izbor uzorka.
- Uzorkovanje se izvodi na isti način za sve eksperimentalne grupe i za sve kontrolne grupe

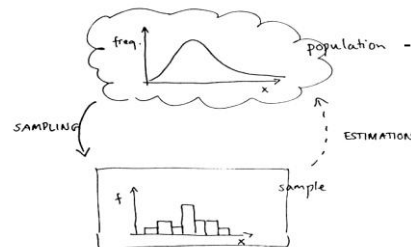
Randomiziran uzorak nije nužno reprezentativan

- Npr. ako je premalen, veličina uzorka odnosno broj replika je posebna tema

Populacija i uzorak

- Populacija i uzorak nisu isto ali treba imati na umu da uzorak mora odgovarati populaciji da bi bio reprezentativan

Odabrati metodu koja će osigurati izbor grupe uzorak koja **sadrži istu proporciju posebnih članova kao i klasa.**



Problemi:

- Koji je optimalan dizajn uzorkovanja?

● “The sample looks like the population”:

- If it is correctly sampled
- If it is large enough

Koliko god bio dobro randomiziran premalen uzorak nije reprezentativan

Nasumično uzorkovanje je najčešće u laboratorijskim istraživanjima

RANDOMIZACIJA

- Na svim razinama pokusa (ne samo kod uzorkovanja)
- Eliminira mogućnost uvođenja zbunjujući čimbenika

Primjer2.12: Ispitivanje stope rasta normalnih i GMO rajčica na temelju po 100 sadnica svake vrste, raspored u komori rasta mora biti randomiziran a ne da je jedna vrsta bliže lampi, druga nešto udaljenija, udaljenost od izvora topline.....To bi sve mogli biti **izvori pseudoreplikacije i zbunjujući čimbenici**

Ako ih prihranjujemo, postoji mogućnost da je kvaliteta prihrane s vrha vreće opala u odnosu na onu sa dna, i to treba randomizirati.....

- Randomizirati se u nekim eksp. mora i redosljed prikupljanja rezultata

Iznimke od nasumičnog uzorkovanja

- Često u terenskim i biomedicinskim istraživanjima

Stratificirani (slojeviti) uzorak

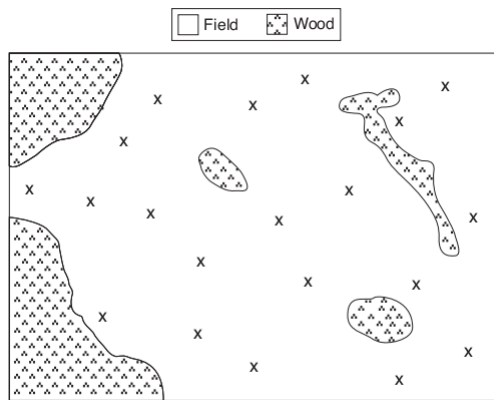
- Kad je potrebno da se populacija, po nekim značajkama, podijeli na grupe ili slojeve i da se iz svake grupe uzme nasumičan uzorak.
- Primjer: Proučavanje neke bolesti
(Stanovništvo se podijeli na grupe - po starosti, načinu života, društvenom statusu, vrsti zanimanja)
- Veličina svakog uzorka treba biti proporcionalna veličini grupe u odnosu na čitavu populaciju

Blocking tj. blokiranje svojstva koje nas ne interesira je nešto drugo, i klasifikacija je nešto drugo

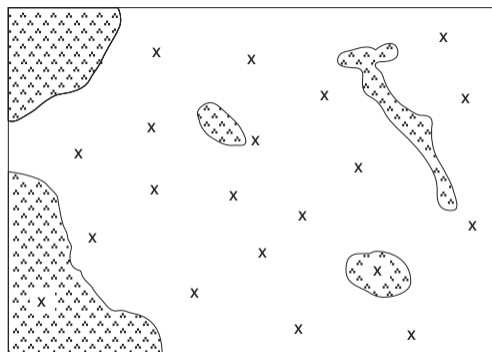
STRATIFICIRANO UZORKOVANJE

- npr. Treba odrediti broj moljaca u nekoj nizini. Nizina se sastoji od otvorenih polja i šuma. Šume se mnogo rjeđe.

Nasumičnim uzorkovanjem može se dogoditi da uopće ne zahvatimo šumu.



- Odredimo zastupljenost šume te prikupljamo uzorke na odgovarajućem postotku šumskih lokaliteta



Now we stratify, assigning 10% (2) of the traps randomly to the woods and 90% (18) to the fields.

SISTEMATIČNO (Sustavno) UZORKOVANJE

- U medicinskim i društvenim istraživanjima na ljudima (kad je populacija vrlo velika) nije lako odabrati reprezentativan nasumičan uzorak
- U tom slučaju primijenjuje se sistematičan uzorak
Dobiva se da se s popisa sastavljenog abecednim redom, po godinama starosti i sl. odabire svaka 4. ili 5. osoba i na takvom uzorku provedu istraživanja

Sistematično uzorkovanje prihvatljivo je jedino kada smo sigurni da nema apsolutno nikakve “uređenosti” unutar klase nad kojom se provodi

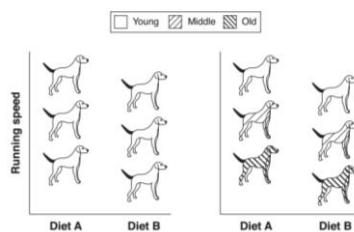
Statističke analize podrazumijevaju nasumično uzorkovanje a sustavno nije uvijek jednako nasumičnom

SEKVENCIJALNO UZORKOVANJE

- U istaživanje se uključuju uzorci jedan po jedan
- Moguće samo ako je omogućeno paralelno prikupljanje rezultata
- Omogućuje kontrolu potrebnog broja jedinki/uzoraka/ispitanika
- Primjer: mjerenje duljine riba u jezeru

Stratificirano nasumično uzorkovanje

- Pretpostavimo da nas zanima utječe li vrsta hrane koju dajemo hrtu (pasmina pasa) na njegovu brzinu trčanja. Na raspolaganju imamo 80 hrtova (i stazu za trčanje), a želimo ispitati učinke četiri različite vrste hrane.
- Što je sa slučajnim uzorkovanjem životinja za testiranje četiri vrste hrane?



- Što ako je 80 hrtova različite dobi, a dob ima snažan utjecaj na brzinu trčanja? **Taj faktor blokiramo grupiranjem.**
- Korištenjem slučajnog dizajna zanemarili bismo ovaj izvor varijacije i on bi postao dio slučajne buke u eksperimentu.
- Alternativni pristup bio bi tretirati dob kao faktor koji blokira eksperiment (**blokirajući faktor**). **Starost je faktor grupiranja ili factor čiji utjecaj blokiramo**
- Rangiramo pse prema dobi, zatim ih podijelimo u blokove, tako da oni u bloku imaju sličnu dob. To može biti 20 blokova od 4 psa, 10 blokova od 8 ili 5 blokova od 16pasa.
- Zatim nastavljate s dodjeljivanja pasa iz svake grupe tretmanima (po jedan pas iz svake grupe tretmanu1, tretmanu2...kontrolu)

Kada blokirati

- Ako je neko svojstvo eksperimentalne jedinice mjerljivo a sumnjamo da će varijabilnost tog svojstva unositi buku u eksperimentu

Navedeni primjer je grupiranje prema osobinama jedinki

Grupiranje prema osobinama prostora

- Zamislite eksperiment s nadoknadom za rajčice a sve biljke ne stanu u jedan staklenik već nam treba tri. Imamo kontrolu i nadoknadu.
- Ako postoji razlike između staklenika (a uvijek potencijalno postoje) koje utječu na stope rasta, postoji opasnost buke (Staklenik je zbunjujući faktor)
- RJEŠENJE....

Slična je stvar i grupiranje prema vremenu

Grupiranje u kombinaciji s uzorkovanjem je
STRATIFICIRANO NASUMIČNO UZORKOVANJE

**Grupiranjem smo blokirali faktor kako bi imali
jednofaktorijski dizajn umjesto dvofaktorijskog**

**Komplicirani eksperimentalni dizajn (višefaktorijski,
nebalansirani) se izbjegava ako nije potreban**

Potpuno randomizirani, jednofaktorijalni, uravnoteženi eksperimenti

Primjer2.12

- 5 različitih intenziteta prihrane, 100 biljaka rajčice
- Balansirani (uravnotežen) dizajn
- Moramo u svakom od 5 tretmana osigurati po 20 biljaka (biljke označimo brojevima od 1 do 100, brojeve izvlačimo te prema redoslijedu biljke svrstavamo u skupine kako su izvučene....POTPUNO RANDOMIZIRANO uzorkovanje, isti broj subjekata po tretmanu – URAVNOTEŽENI ILI BALANSIRANI DIZAJN

Potpuno randomizirani dizajn, analiza t-testom ako su dvije skupine, ili ANOVA ako ih je više

- To je primjer najjednostavnijeg dizajna jer smo eksperimentalno mijenjali samo jedan faktor (intenzitet dohrane)
- Pet različitih intenziteta dohrane je 5 RAZINA TOG FAKTORA

JEDNOFAKTORIJALNI (JEDNOSMJERNI) DIZAJN
ili
POTPUNO RANDOMIZIRANI BALANSIRANI
DIZAJN JEDNOG FAKTORA S 5 RAZINA

one-way design

EKSPERIMENTI S NEKOLIKO FAKTORA

- Dodajemo još jednu sortu rajčica npr. GMO rajčice
- Sada imamo dva faktora, prihranu i sortu rajčice
- DVOFAKTORIJALNI (DVOSMJERNI) DIZAJN
- Ako ponovimo potpuno pokus s 5 intenziteta dohrane na obje sorte provodimo POTPUNO UKRIŽENI FAKTORIJALNI DIZAJN
 - To nam osigurava unakrsne usporedbe
 - Jednostavna statistika

Ono što imamo u ovom eksperimentu je

- Faktor 1 (dohrana) s pet razina
- Faktor 2 (genotip) s dvije razine

TO JE 10 EKSPERIMENTALNIH SKUPINA (2×5) i sve dok imamo isti broj biljaka u svakoj skupini, i naravno ako je taj broj veći od 1 (više replika) imamo BALANSIRANI i REPLICIRANI dizajn

NA ISTI SE NAČIN POSTAVLJAJU VIŠEFAKTORIJALNI DIZAJNI, A PROVEDBA MORA BITI ŠTO JEDNOSTAVNIJA!!!! PO MOGUĆNOSTI BALANSIRANA I REPLICIRANA (zbunjujuća terminologija iza jednostavne logike)

- Može se dogoditi da na drugoj sorti nemamo resurse za pet razina faktora dohrane pa napravimo samo tri. To je NEPOTPUNO UKRIŽENI FAKTORIJALNI DIZAJN, nepovoljan za statistiku

Uvijek tezite potpuno uravnotezenom eksperimentu, osim ako postoje jako opravdani razlozi

A zašto ne odvojeno provesti eksperimente?

- na 1. sorti, pa odvojeno
- na 2. sorti
- To bi bili jednosmjerni dizajni za svaku sortu

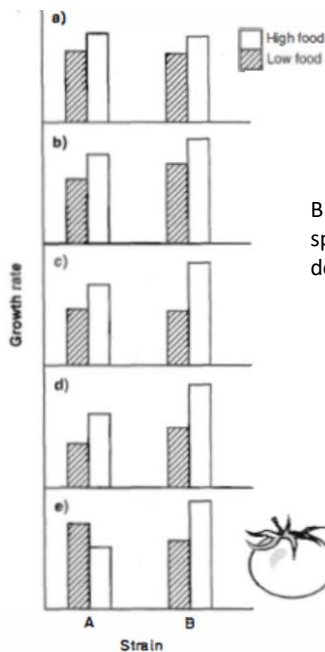
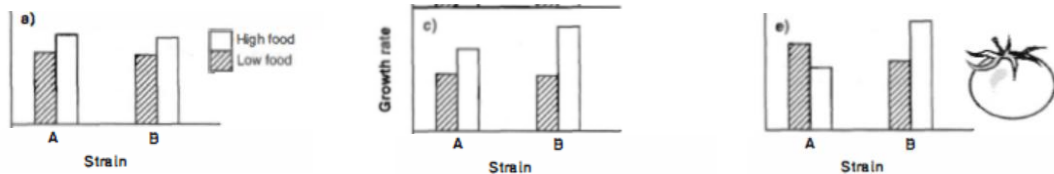
Uvodimo faktor vremena provedbe eksperimenta ali i još neke faktore kojih ne moramo biti ni svjesni **zbog čega gubimo mogućnost uspoređivanja dviju sorti kao i vidljivost učinka međudjelovanja** (razlikuju li se dvije sorte obzirom na učinak intenziteta dohrane na rast)

Učinak međudjelovanja

- nam govori učinak kojeg faktora je glavniji i kakvo je međudjelovanje

Međudjelovanja nisu uvijek jednostavna, pogotovo u eksperimentima s previše faktora

EXP: dva intenziteta dohrane, visok i nizak i dvije sorte rajčice, A i B



Učinak kojeg faktora je snažniji i kakvo je međudjelovanje?

A kod obje sorte jaka dohrana bolji rast. Nema razlika između sorata i glavnija je dohrana.

B kod obje sorte jaka dohrana bolji rast ali sorta A raste sporije od sorte B. Stopa rasta pod utjecajem je i dohrane i sorte

C kod obje sorte jaka dohrana bolji rast. Sorta A raste sporije od sorte B **samo pri jakoj dohrani**. To statističari zovu MEĐUDJELOVANJE. **Biološki** to znači da je učinak sorte na stopu rasta različit pod različitim režimima odnosno **statistički** učinak jednog faktora (sorte) ovisi o razini drugog faktora (dohrana).

D slično kao C, kod obje sorte jaka dohrana bolji rast, a razlika između sorata je veća kod jače dohrane. MEĐUDJELOVANJE. **Biološki** to znači da je učinak sorte na stopu rasta različit pod različitim režimima odnosno **Statistički** učinak jednog faktora (sorte) ovisi o razini drugog faktora (dohrana)

Figure 4.1 Five possible types of interaction between tomato plant strain and feeding regime.

Komplicirani eksperimentalni dizajn

- Izbjegavati
- Ovisno o tome što želimo saznati

IZ KOMPLICIRANIH DIZAJNA MOŽE PROIZAĆI VELIKA ZBUNJENOST U RAZLIKOVANJU POJEDINIH FAKTORA (I POJEDINIH RAZINA FAKTORA!!!)

ZAMJENA RAZINA I FAKTORA

Što ako imamo pokus s 5 različitih proizvoda biljne dohrane. Hoćemo li ih tretirati opet ako razine jednog faktora ili kao različite faktore?

Hoćemo li to tretirati kao različite faktore ili razine istog faktora (dohrane)?

Ovisi o tome što želimo saznati!

**A****B**

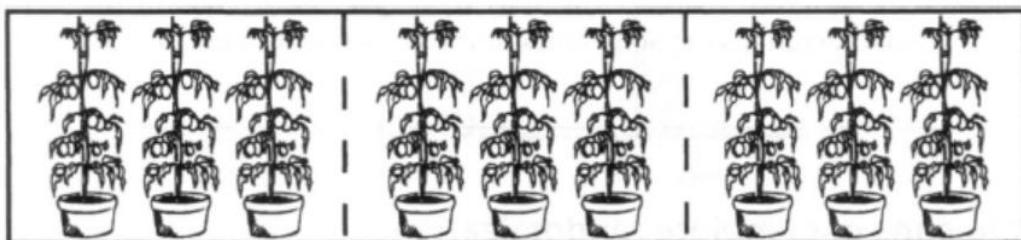
Što doznajemo
iz jednostavnog
dizajna ?

DOHRANA

Repliciran dizajn jednog faktora s dvije razine (A i B)

To može odgovoriti na pitanje:

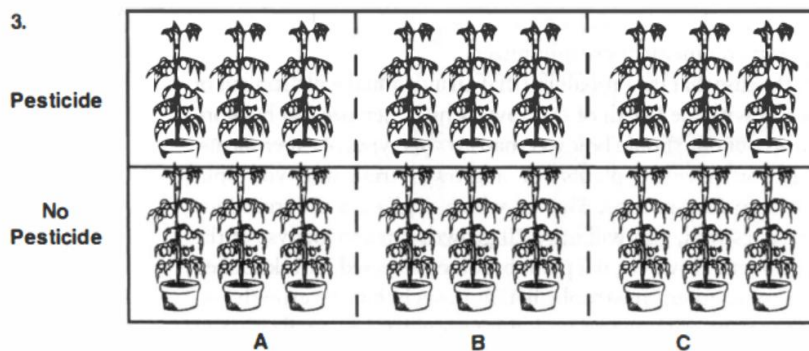
1. Razlikuju li se intenziteti dohrane po učinku na rast biljke?

**A****B****KONTROLA**

Repliciran dizajn jednog faktora s **tri razine**

To može odgovoriti na pitanja:

1. Utječe li dohrana A na rast biljke?
2. Utječe li B na rast biljke?
3. Razlikuju li se A u B u njihovim učincima na rast biljke?



DOHRANA

2-faktorijalni dizajn s tri razine prvog faktora (vrsta dohrane A, B i C) i 2 razine drugog faktora (uporaba pesticida)

To može odgovoriti na pitanja:

1. Razlikuju li se vrste dohrane po njihovom učinku na rast biljke?
2. Utječe li pesticid na rast biljke?
3. Ovisi li utjecaj pesticida o vrsti dohrane??

Kako odabrati

- Dizajn kreiramo ovisno o odgovorima koje tražimo na najjednostavniji način
- Koji često nije jednostavan
- Mora nam dati odgovor na ono što nas zanima

Što proučava jednofaktorijalni dizajn?

- A) Utjecaj više nezavisnih varijabli
- B) Utjecaj jedne nezavisne varijable na zavisnu varijablu
- C) Samo korelacije među varijablama
- D) Samo longitudinalne promjene

Točan odgovor: B) Utjecaj jedne nezavisne varijable na zavisnu varijablu

Koja je glavna prednost višefaktorijalnog dizajna?

- A) Uključuje samo jedan uzorak
- B) Omogućuje ispitivanje interakcija između varijabli
- C) Zahtijeva manje sudionika
- D) Ne treba kontrolne grupe

Točan odgovor: B) Omogućuje ispitivanje interakcija između varijabli

Koja je mana višefaktorijalnog dizajna?

- A) Ne može testirati interakcije
- B) Rezultati su uvijek jednoznačni
- C) Povećava se složenost i broj sudionika potrebnih za istraživanje
- D) Koristi samo jedan uzorak

Točan odgovor: C) Povećava se složenost i broj sudionika potrebnih za istraživanje

Istraživač želi ispitati utjecaj vrste glazbe (klasična, rock, tišina) na brzinu rješavanja matematičkih zadataka.

Koji je ovo tip dizajna?

Odgovor: Jednofaktorijalni dizajn
(1 nezavisna varijabla – vrsta glazbe, s 3 razine).

Zašto je korisnije koristiti višefaktorijski dizajn?

Odgovor: Omogućava uvid u interakcije među varijablama, uz manji broj sudionika i vremena.

Kada se koristi blocking u eksperimentalnom dizajnu?

Odgovor: Kada želimo kontrolirati zbunjujuće varijable tako da ih blokiramo (npr. spol, dob).

Koja je ključna razlika između blocking dizajna i višefaktorijalnog dizajna?

Odgovor: Blocking → kontrola smetajućih varijabli koje nas same po sebi ne zanimaju.

Višefaktorijalni → nezavisne varijable su predmet istraživanja, zanima nas glavni i interakcijski učinak.

Istraživač želi ispitati utjecaj vrste treninga (aerobni, anaerobni) na kondiciju, ali zna da spol može utjecati na rezultate.

kakav dizajn treba primijeniti?

Odgovor: Blocking dizajn
(spol kao blokirajuća varijabla, trening kao nezavisna varijabla).

DIZAJN UNUTAR SUBJEKTA

- Sve o čemu smo do sada govorili bile su usporedbe među jedinkama (dizajn između subjekta, skupina)
- Dizajn unutar subjekta je dizajn u kojem jedinka sukcesivno prolazi nekoliko tretmana
- Npr. potiče li klasična glazba kokoši da nesu više jaja (što bi bile kontrole, da li samo neupaljen razglas ili neka druga vrsta glazbe, razgovor, šumovi...)
- **Jednostavna randomizacija** mogla bi zahtijevati velik broj nastambi, kako ih rasporediti Bezbroj ograničenja, zbunjujućih faktore

Iznimke od randomizacije

Alternativa jednostavnoj randomizaciji je

- Jedno od rješenja je uporaba nastambi kao vlastitih kontrola tako da se ista nastamba uspoređuje pod različitim tretmanom
- Da bude najjednostavnije koristimo „tihu” kontrolu

Iznimke od randomizacije

- Npr. jedna nastamba prva tri tjedna u tišini a druga tri tjedna klasika
- Druga nastamba obrnuto

Analiza broja jaja za svaku nastambu u dva tretmana t-testom.

TAKO USPOREĐUJEMO UNUTAR NASTAMBE TE NAS VARIJACIJE IZMEĐU NASTAMBI
NE BRINU

Moramo biti sigurni da ne postoje učinci slijeda i da subjekti mogu biti vraćeni u prvotno stanje, moramo osigurati da je prethodni učinak prestao djelovati (razdoblje „ispiranja”)

Takvi pokusi traju dugo

Iznimke od randomizacije

- S 4 različita tretmana možemo imati 24 slijeda, s 5 120 slijedova, s 6 750, u tim se slučajevima pokus smanjuje po principu randomizacije slijeda
- Ako je N broj tretmana broj slijedova je $N!$
- Ovakvi su pokusi nemogući ako postoje preneseni učinci tj. subjekt ne može biti vraćen u prvobitno stanje

Poduzorkovanje

Problem jest distribucija uzorkovanja između različitih razina



Npr. Broj različitih vrsta insekata (kornjaša) varira na stablima lokalnih crnogoričnim i raširenih bjelogoričnih šuma.

Pretpostavimo da imate 10 mogućih šuma svake vrste, a sredstava i vremena za ispitati 100 stabala ukupno.

Da li više šuma ili drveća?

- Mogućnost 1: jedna šuma svake vrste (nasumična selekcija) i 50 stabala

Dobijate maksimum informacija za stabla ali temeljene na minimalnom broju šuma

- Mogućnost 2: 10 šuma svake vrste i po 5 stabala

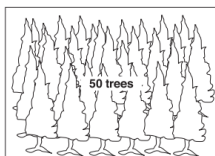
Dobijate informacije temeljene na maksimalnom broju šuma

- Mogućnost 3: 5 šuma svake vrste po 10 stabala

Kako odrediti koji od tri dizajna je najbolji?

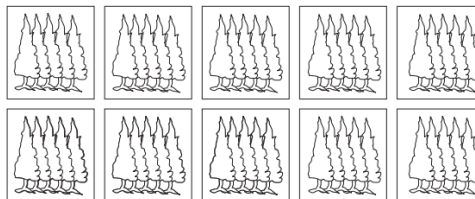
Three designs for sampling 50 conifer trees

a)



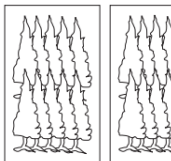
50 trees all from the same forest. **Excellent** information about that forest but no information on other conifer forests.

b)



5 trees from each of 10 forests. **Fair** information of a good sample of different conifer forests.

c)



10 trees from each of 5 different conifer forests.

Varijabilnost je glavni kriterij odabira:

- 1) Odrediti u koliko vrsta kornjaša varira drveće unutar iste šume
- 2) Odrediti razinu varijabilnosti među različitim šumama istoga tipa – PILOT ISTRAŽIVANJE s ciljem odabira najjačeg eksperimentalnog dizajna

- Ako očekujemo da su stabla u istoj šumi varijabilnija (u broju vrsta kornjaša) nego što je varijabilnost srednjeg broja vrsta kornjaša različitih šuma istoga tipa, odabiremo dizajn sa više stabala (poduzoraka)
- Ukoliko to ne znamo i ne možemo saznati preferira se veći broj uzoraka nego poduzoraka
- Način uzorkovanja se favorizira u ovisnosti s najvećim izvorom varijabilnosti

Ako npr. svako stablo u šumi ima iste kornjaše uzima se po jedno stablo iz što više šuma (1) ili ako svaka crnogorična šuma ima isti prosječan broj vrsta kornjaša a svaka bjelogorična isto tako ima isti prosječan broj kornjaša, a unutar njih pojedina stabla variraju uzima se veći broj stabala

Pitanje 2: Koji eksperimentalni dizajn uključuje pseudoreplikaciju?

- 5 akvarija sa po 10 ribica u svakom, tretirani različitim dozama hrane
- 1 akvarij sa 50 ribica, tretiran jednom dozom hrane, a svaka ribica se računa kao nezavisna jedinica
- Uzorkovanje biljaka iz 5 različitih šuma
- Nasumično odabrane grupe jedinki u različitim uvjetima

Točan odgovor: b)

Pitanje 5: Ako sve biljke rastu u jednoj posudi, one se računaju kao nezavisni replikati.

Točan odgovor: Netočno

1. Koji od navedenih faktora predstavlja primjer nasumične varijabilnosti u eksperimentu?

- a) Različite vrste tretmana primijenjene na biljkama
- b) Razlike u količini svjetlosti zbog oblačnosti
- c) Sustavno mjerenje uvijek 2 g manje
- d) Pogrešna kalibracija instrumenta

Odgovor: b) Razlike u količini svjetlosti zbog oblačnosti

2. Objasnite razliku između nasumične varijabilnosti i sustavne pogreške.

Odgovor:

- *Nasumična varijabilnost: prirodne, nepredvidive razlike (genetika, mikroklima, slučajne pogreške mjerenja).*
- *Sustavna pogreška: stalno odstupanje zbog instrumenta ili metode (npr. loša kalibracija vage).*

Pitanje 7: Povežite pojmove s ispravnom definicijom:

- A) Nasumična varijabilnost
- B) Sustavna pogreška
- C) Pseudoreplikacija
- D) Stratificirano uzorkovanje

1. Pogrešno tretiranje zavisnih mjerenja kao nezavisnih.
2. Dijeljenje populacije u podskupine i uzorkovanje iz svake.
3. Slučajne razlike uzrokovane prirodnim faktorima.
4. Konstantno odstupanje u mjerenju zbog instrumenta/metode.

Točan odgovor: A–3, B–4, C–1, D–2

3. U pokusu sa 100 sjemenki, 70 je prokljalo. Navedite tri moguća izvora nasumične varijabilnosti u ovom ishodu.

Odgovor:

- 1. Genetske razlike među sjemenkama.*
- 2. Varijacije u vlažnosti tla.*
- 3. Mikro-razlike u temperaturi ili svjetlosti.*

4. Koji od sljedećih primjera predstavlja pseudoreplikaciju?

- a) Uzimanje uzorka listova s 10 različitih stabala iste vrste
- b) Mjerenje 20 listova s jednog stabla i tretiranje svakog lista kao nezavisne jedinice
- c) Randomizacija biljaka u različite posude prije tretmana
- d) Ponovljeni eksperimenti u različitim sezonama

Odgovor: b) Mjerenje 20 listova s jednog stabla i tretiranje svakog lista kao nezavisne jedinice

5. Definirajte pseudoreplikaciju i objasnite zašto ona predstavlja problem u znanstvenim istraživanjima.

Odgovor:

- Pseudoreplikacija = kada se zavisna mjerenja pogrešno tretiraju kao nezavisne replike.*
- Problem: povećava lažni broj replikata, vodi do krivih statističkih zaključaka i precjenjuje značajnost rezultata*

- b) Uzorkovanje na pogodnim lokacijama
- c) Stratificirano nasumično uzorkovanje
- d) Uzimanje samo najvećih jedinki u populaciji

Odgovor: c) Stratificirano nasumično uzorkovanje

8. Objasnite razliku između slučajnog i stratificiranog uzorkovanja.

Odgovor:

- *Slučajno uzorkovanje: svaka jedinka ima jednaku šansu biti uključena.*
- *Stratificirano slučajno uzorkovanje: populacija se dijeli u podskupine (npr. spol, starost, stanište), pa se slučajno uzima unutar svake skupine → bolja reprezentativnost.*

9. Ako želimo procijeniti prosječnu visinu stabala u šumi, što bi bio bolji pristup: uzeti uzorak iz samo jedne parcele ili iz više različitih dijelova šume? Zašto?

Odgovor:

Bolje je uzeti uzorke iz više dijelova šume. Jedna parcela ne odražava svu varijabilnost (npr. tlo, mikroklima, svjetlost). Više lokacija daje reprezentativniji i pouzdaniji uzorak.

Pitanje 1: Koji od sljedećih primjera najbolje ilustrira uzorkovanje u molekularnoj biologiji?

- a) Uzimanje RNA iz jedne stanice i tretiranje kao reprezentativno za cijeli organ
- b) Nasumično odabrane stanice iz tkiva za izolaciju RNA
- c) Ponovljeno mjerenje iste RNA uzorkovane jedne stanice
- d) Sekvenciranje samo jedne kolonije bakterija i ekstrapolacija na cijelu populaciju

Točan odgovor: b)

Pitanje 2: Koji je primjer pseudoreplikacije u eksperimentu qPCR?

- a) Tri tehničke replikacije istog cDNA uzorka tretirane kao tri biološke replikacije
- b) Izolacija RNA iz tri različite životinje i zasebno izvođenje qPCR-a
- c) Ponovljeni qPCR na istom uzorku radi tehničke provjere
- d) Uključivanje housekeeping gena za normalizaciju

Točan odgovor: a)

Pitanje 3: Zbunjujući čimbenik u molekularnoj biologiji može biti:

- a) Temperatura prostorije tijekom izolacije RNA
- b) Razlika u starosti životinja između kontrolne i eksperimentalne grupe
- c) Različiti kitovi korišteni za DNA izolaciju
- d) Sve navedeno

Točan odgovor: d)

Pitanje 5: Ako koristimo tehničke replike kao biološke replike, to je pseudoreplikacija.

Točan odgovor: Točno

Pitanje 6: Randomizacija uzorka smanjuje vjerojatnost zbunjujućih čimbenika.

Točan odgovor: Točno

Pitanje 7: Nasumična varijabilnost uvijek može biti eliminirana boljim eksperimentalnim dizajnom.

Točan odgovor: Netočno – može se samo smanjiti, nikad eliminirati.

Pitanje 8: U eksperimentu RNA-seq primijetili ste da kontrolna i eksperimentalna grupa potječu od životinja različite dobi. Zašto je to problem?

Odgovor: Dob životinja je zbunjujući čimbenik koji može utjecati na ekspresiju gena, pa se ne može razlikovati utjecaj tretmana od utjecaja dobi.