

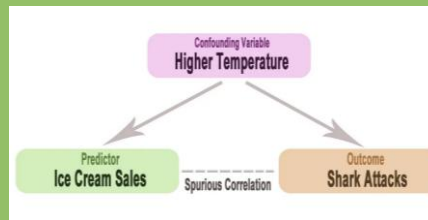
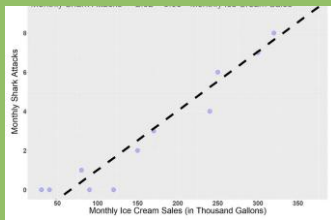
# Kontrole

## Prirodni i kontrolirani eksperimenti

- Korelacijsko istraživanje (mjernim eksperimentom ili opažajno)
  - sustav se ne mijenja
  - uobičajeno su jednostavnija pa znače „manje posla“
  - manje su rizična za provedbu (ne manipuliramo sustav)
  - 3 važna problema: „korelacija nije kauzacija“, **treća varijabla i reverzna uzročnost**
  - takva istraživanja nekada nisu moguća
- Eksperimentalna manipulacijom (kontrolirani ili manipulativni eksperiment)
  - sustav se mijenja, pa je i veća vjerojatnost neželjenih učinaka;
  - takva istraživanja nekada nisu moguća iz praktičnih ili etičkih razloga

## Kontrole:

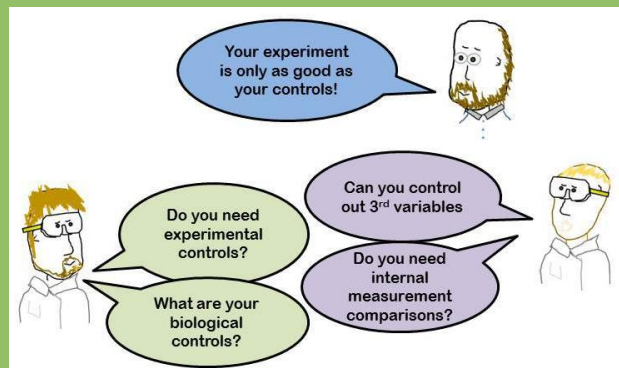
- Koriste se u manipulativnim eksperimentima zbog uočavanja povezanosti zavisne varijable i varijable tretmana
- Služe za minimizaciju zbunjujućih faktora ili treće varijable



## Kontrole i tretmani:

**Nužna je kompletna kombinacija tretmana i kontrola koja se unaprijed mora definirati**

**Uzima se u obzir priroda sustava koji se istražuje te svi mogući ishodi eksperimenta**



## Tretman i učinak:

- Tretman je faktor koji manipuliramo u eksperimentu s ciljem utvrđivanja njegova efekta (učinka)
- Varijable tretmana su one koje mi manipuliramo, treatment variable
- Varijable učinka su zavisne tj one koje mjerimo, dependent variable
- **U statističkom smislu, tretmani su grupe opažanja koje uspoređujemo**
- Tretmani moraju biti provedeni **u nužnom broju i obzirom na njihovu djelotvornu razinu**

Razina tretmana je efektivna količina istog koja će pokazati povezanost (ako postoji) ili ne povezanost (ako povezanost ne postoji) tretmana i učinka (mjerjenja)?

- Npr. Želite odrediti efekte djelovanja gnojiva na stopu rasta rajčice i imate na raspolaganju 30 biljaka.
- Kako bi proveli eksperiment?

PILOT ISTRAŽIVANJE (koja je potrebna razina tretmana, kada tretirati...kada mjeriti, koji su mogući ishodi, broj replika po tretmanu.....)

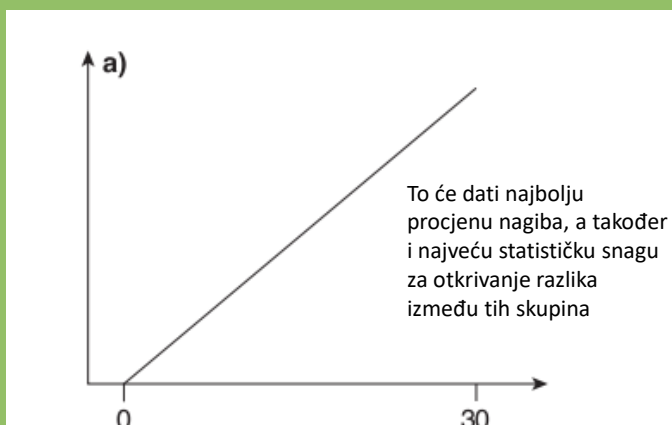
Prva ekstremna provedba: primjena graničnih količina (najviše i najmanje količine) gnojiva na uzorku od po 15 biljaka.

Druga ekstremna provedba: 1. biljka-0 g, 2. biljka -1 g, 3. biljka-2 g itd.

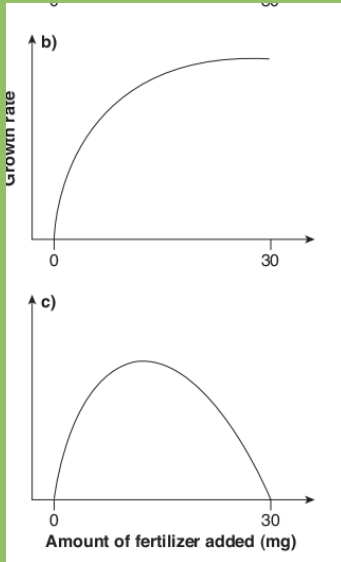
Kako odrediti što je bolje?

Pilot istraživanjem odrediti očekujemo li linearan ili neki drugi odnos

- Pretpostavka 1) znate da su efekti na stopu rasta linearni s količinom gnojiva i želite saznati koja je brzina porasta



- Pretpostavka 2) ako odnos nije linearan možda odnos doseže plato (b) ili opada (c)



U prvom slučaju ne biste mogli vidjeti ono bitno biološki (i vjerojatno ekonomski) učinak da pri niskim razinama gnojiva malo povećanje ima veliki učinak na stopu rasta, dok pri visokim razinama isto povećanje ima mali učinak. U drugom slučaju možete zaključiti da gnojivo nema nikakav učinak (ili čak negativno!), iako u srednjim koncentracijama gnojivo ima veliki pozitivan učinak.

Za svaki odabir postoje prednosti i nedostaci  
– odabir se temelji  
i ovisan je o prethodnom znanju

Uvijek uvrstiti neke međuvrijednosti ako se  
ne zna kakav je odnos

## Kontrole

- Nužan dio eksperimentalnog dizajna u biologiji i prirodnim znanostima
- **Kontrola je referenca sa kojom se rezultat eksperimentalne manipulacije (tretman) može se usporediti.**
- "Kontrole" su dodatne stavke koje ugrađujete u svoj eksperimentalni dizajn kako biste lakše protumačili, interpretirali i povećali vjerodostojnost dobivenog rezultata.

- Ključna pretpostavka 1 – Vaš eksperiment je dobar onoliko koliko su dobre vaše kontrole
- Ključna pretpostavka 2 – Potrebna je kontrola svega što bi moglo utjecati na tumačenje vaših podataka

- Pri odabiru kontrola treba najkritičnije razmišljati o ishodima eksperimenta te ga provesti na način da imate objašnjenja za svaki mogući ishod (potvrdu ili odbacivanje  $H_0$ , odnosno pogrešaka u provedbi)

**Eksperimentalne**

Interpretacijske, uklanjanje  
zbunjujućih čimbenika

**Biološke**

**Kalibracijske**

To su ekstra tretmani koje uvodimo u eksperiment koji omogućuju razumijevanje svakog problema kada se pojavi

## Kontrole se koriste se za sljedeće ciljeve

- Pozitivne i negativne kontrole eksperimenta – za pomoć pri rješavanju problema
- Pozitivne i negativne biološke kontrole – kako biste potvrdili da je pozitivan rezultat stvarno pozitivan, a negativan rezultat stvarno negativan (uključuju se u obradu rezultata)
- Interpretacijske kontrole ili postupci - Isključivanje alternativnih tumačenja – kontrola trećih ili zbunjujućih varijabli
- Kalibriranje eksperimentalnog sustava – unutarnja normalizacija za kontrolu bioloških varijacija (endogene kontrole)

U mnogim eksperimentima zapravo ćete uključiti više kontrola nego testnih uzoraka i obično možete vjerovati svojim rezultatima samo ako vaše kontrole rade.

Kako kontroliramo reagense i metodu reakcije PCR?

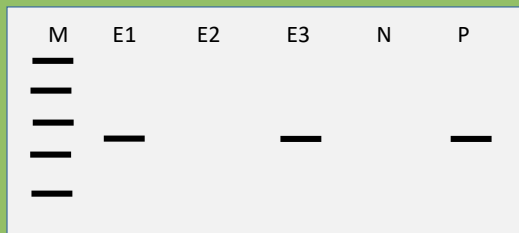
Koje kontrole koristite, i zašto?

Čemu sve služi pozitivna kontrola?

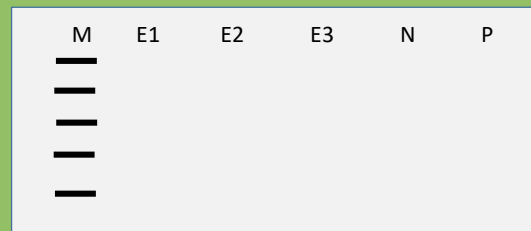
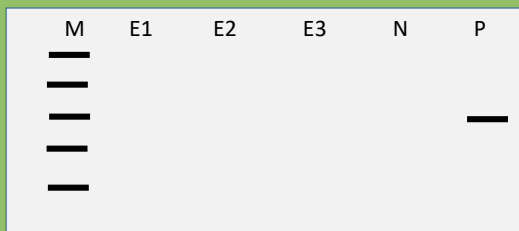
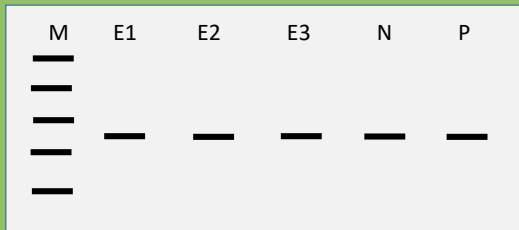
Kako kontroliramo reagense i metodu reakcije PCR?

Koje kontrole koristite, i zašto?

Čemu sve služi pozitivna kontrola?



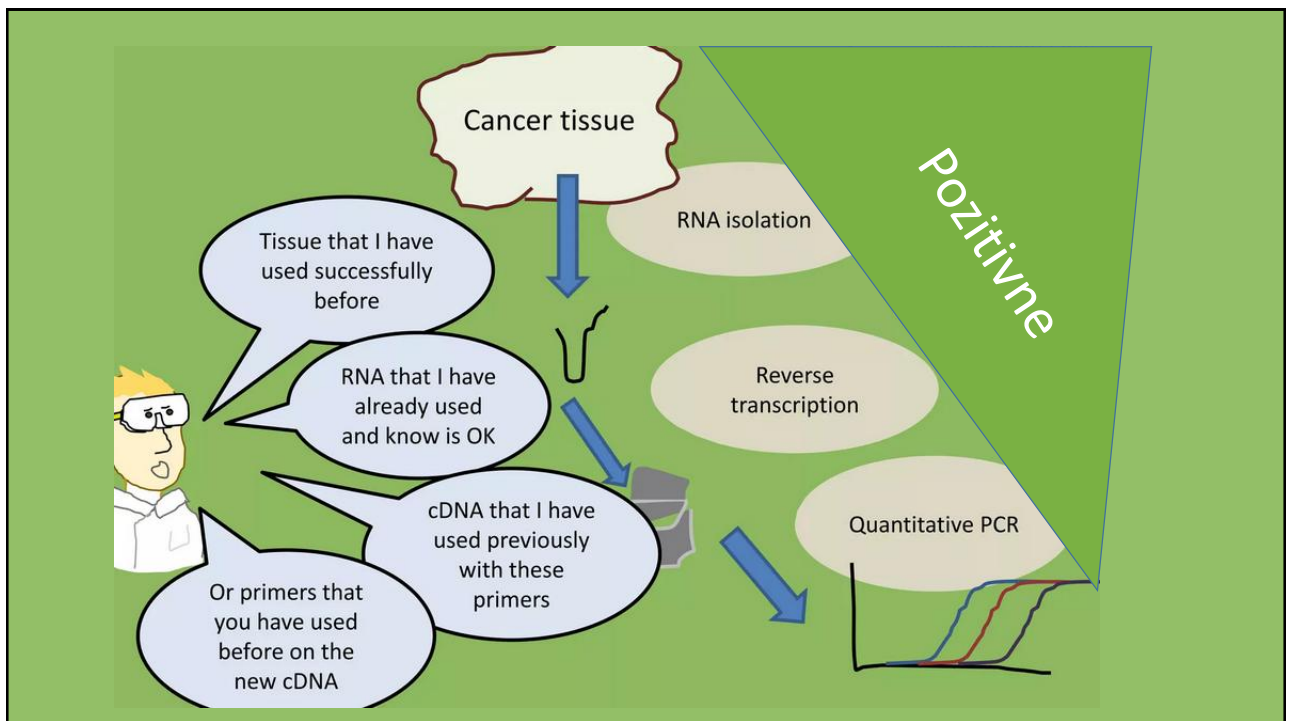
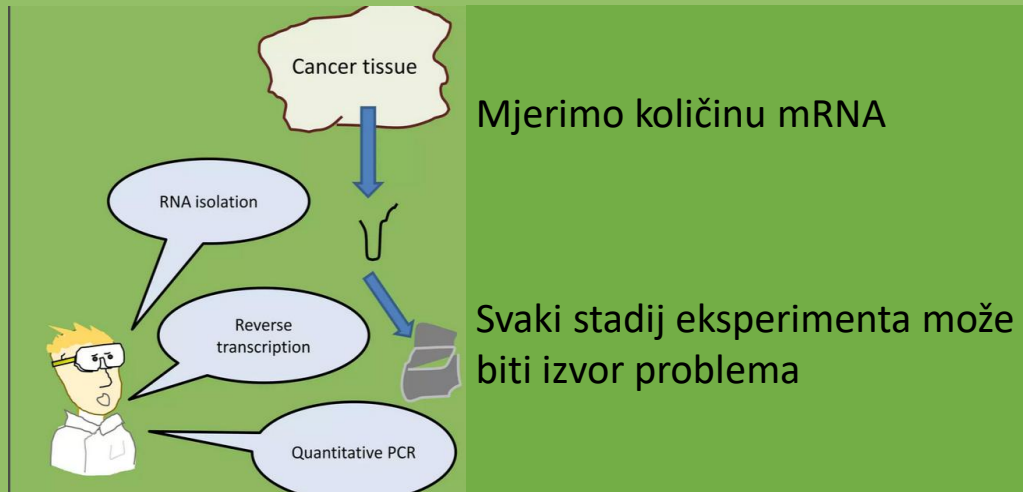
Negativnom kontrolom doznajete da nemate kontaminaciju, ili da primeri ne umnazaju nespecifično, što doznajete pozitivnom kontrolom?



**KONTROLA REAGENSA i EKSPERIMENTA**

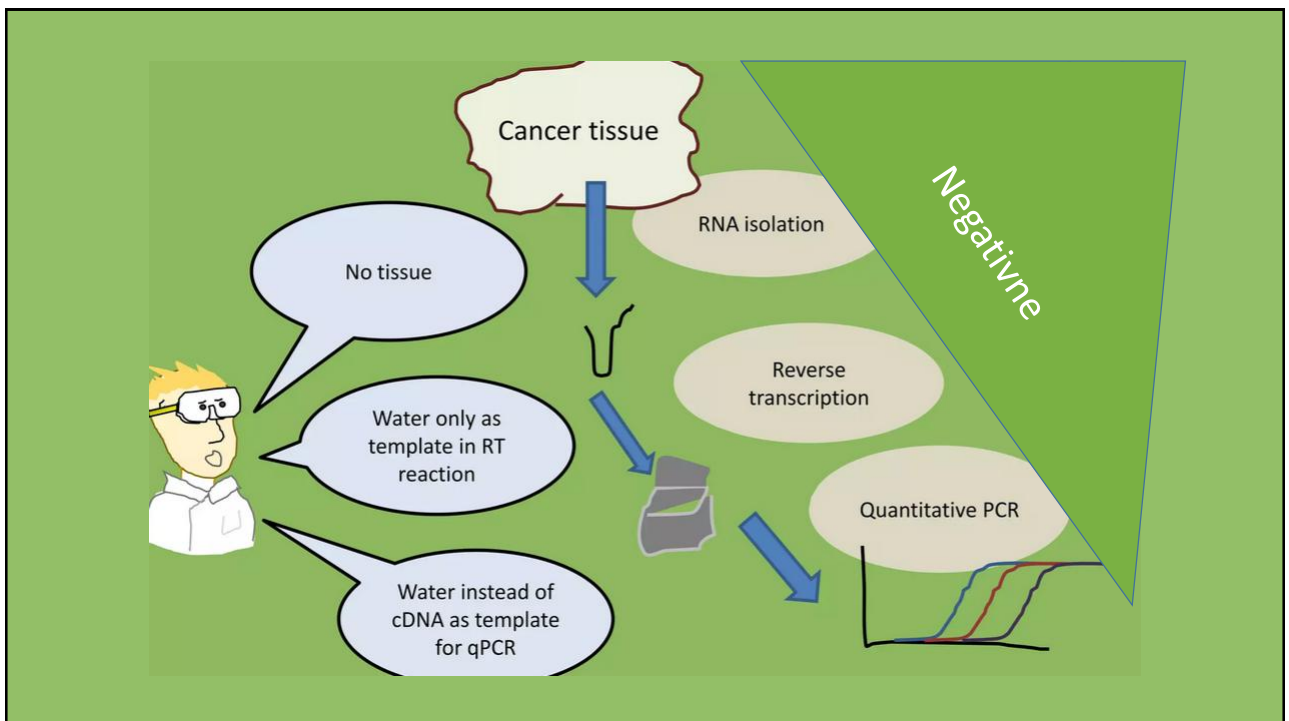
## Eksperimentalne kontrole

H: mRNA proteina A i mRNA proteina B su smanjene u bolesnom tkivu u odnosu na zdravo



## POZITIVNA EKSPERIMENTALNA KONTROLA

- Većina laboratorijskih eksperimenata može (i hoće) poći po zlu na ovaj ili onaj način, a vi ćete morati znati zašto.
- Zbog toga provodite eksperimentalne kontrole koje će vam pomoći u rješavanju problema provedbe i prilagodbi vaših protokola.
- Trebali biste uključiti: Uzorak koji će vam dati pozitivan rezultat u svaki korak eksperimenta. Obično će to biti uzorak koji ste pripremili prije eksperimenta i za koji znate da radi. To bi moglo biti tkivo/protein/DNA/RNA koji ste izolirali jednom drugom prilikom i već ste testirali.
- Poanta je da što više znate o ovom uzorku to bolje. Trebali biste znati što možete očekivati i stoga ćete znati da postoji problem ako ne dobijete rezultat koji očekujete.
- Eksperimentalne i biološke kontrole se često poklapaju



## NEGATIVNE KONTROLE

- Važne su opet u svakoj fazi.
- Često su to jednostavne poput korištenja vode umjesto jednog ključnog reagensa (npr. umjesto kalupa u PCR-u)
- Eksperimentalna negativna kontrola povremeno može biti ista kao vaša biološka kontrola, ali opet, ona služi drugoj svrsi: strogost bioloških kontrola trebala bi biti najveća. Broj i specifičnosti svake kontrole ovisit će o tome što zapravo radite.

**Poanta je u tome da želite imati neku mjeru uspješnosti u svakoj fazi svog višefaznog protokola kako biste mogli uočiti ne samo da postoji problem, već i koji mu je uzrok (u kojem mu je koraku uzrok)**

### Primjer

recimo da želite napraviti qPCR eksperiment uspoređujući količine dviju mRNA između stanica nakon liječenja lijekom ili neliječenih. Ovaj eksperiment ima više faza - vijabilnost stanica, liječenje (doza) lijekovima, izolacija RNA, reverzna transkripcija i qPCR za oba gena.

Kad bi proveli cijeli eksperiment i ne bi dobili nikakve podatke, ne bismo znali gdje je problem.

Dakle, u svom eksperimentalnom dizajnu treba razmišljati što se sve može dogoditi. **Treba unaprijed pogledati stanice kako bi se znalo jesu li uopće vijabilne – procjena vijabilnost može biti i usporedba sa staničnom linijom za koju znamo da je OK**

- **Treba odrediti količinu/razinu tretmana odnosno liječenja na temelju poznavanja sustava ili pilot istraživanja**
- Međutim, izolacija RNA mogla bi poći po zlu iz čisto eksperimentalnog razloga – stari reagensi ili neodgovarajući protokol za tip stanice ili bilo što drugo – pa bih uključili pozitivnu kontrolu RNA za koju već znamo da je u redu.
- Sljedeći korak je reverzna transkripcija koja bi mogla ne uspjeti iz nekog razloga, zato dodajemo RNA za koju znamo da je OK za RT i primere.
- Sada imamo cDNA za qPCR, ali uzimamo i kontrolnu cDNA...
- Takvom provedbom imamo kontrolu nad svakim korakom

## BIOLOŠKE KONTROLE

Pozitivne i negativne biološke kontrole – kako biste potvrdili jesu li rezultati koje dobijete stvarno onakvi kakvima mislite da jesu **odnosno da je pozitivan rezultat stvarno pozitivan, a negativan rezultat stvarno negativan**

You can't prove a negative without a positive!

You can't prove a positive without a negative!

- Potrebnu seriju bioloških kontrola treba procijeniti sagledavajući sve moguće ishode eksperimenta
- Za svaki ishod moramo imati kontrole koje će omogućiti interpretaciju
- Utemeljeno na postojećem znanju (dugotrajno i temeljito praćenje dostupne relevantne literature)

## IDEALIZACIJA BIOLOŠKIH KONTROLA

- na primjer, ako želimo istražiti učinak pušenja na tkivo pluća, kontrolnu skupinu čine uzorci tkiva nepušača

Sve ostale okolnosti eksperimenta moraju biti identične

## Što znači – identična u svakom smislu?

- Pitanje koje treba definirati u skladu s hipotezom
- ista linija životinja, isto porijeklo, isti uvjeti kultivacije i sl.
- Kontrolna grupa nam omogućuje praćenje utjecaja dodatka vitamina u hrani

## Interpretacijske kontrole

- Uklanjanje zbunjujućih čimbenika ili alternativnih tumačenja
- **Budite jako kritični prema podacima koje biste mogli dobiti te razmisliti o svim drugim potencijalnim razlozima zbog kojih biste mogli dobiti isti ishod i razmislite kako biste to mogli kontrolirati.**

Za interpretaciju i eliminaciju zbunjujućih čimbenika važan je i sam tip uzorkovanja

## Primjer jednostavne interpretacijske kontrole (eliminacija zbunjujećeg čimbenika)

- Recimo da tretirate svoj uzorak (bilo da se radi o stanicama, miševima, ljudima, bilo čemu) sa spojem razrijeđenim u nekom otapalu (DMSO je prilično uobičajen). Spoj bi mogao imati učinak, a isto tako i otapalo, tako da će vam trebati kontrolni tretman za samo otapalo.
- Često će ovaj uzorak tretiran otapalom biti vaša prava skupina za usporedbu.

- **Kompliciraniji primjer:** Proučavanje utječe li trening na visini na VO2 max (maksimalni aerobni kapacitet kojeg tijelo može iskoristiti u jednoj minuti tijekom napora). Krenuli bi u eksperiment uz pretpostavku da su dob, spol i BMI sudionika zbunjujuće varijable, dok bi općenito razina vježbanja, učestalost vježbanja i nadmorska visina na kojoj vježbaju bile relevantni faktori.

1) Mogli bih stratificirati grupe tako da proporcionalno odražavaju populaciju koja se proučava.

2) Mogli bi blokirati zbunjujuće čimbenike

U analizi se kompariraju međusobno.

## Kalibracijske kontrole ENDOGENE

- Možda ćete također trebati unutarnju normalizaciju. Na primjer, možda će vam trebati referentni transkripti (obično više od jednog) za eksperimente tipa ekspresije qPCRom ili kontrolni proteini za western blot (iako se općenito preferiraju ukupni proteini).
- Ono što ćete koristiti ovisi o postavkama eksperimenta,
- U najmanju ruku, navest ćete svoj pristup unutarnje normalizacije u svojim metodama i legendama slika. Bitno je zapamtiti da ako ćete trebati ove stvari, ne zaboravite ih isplanirati u svoj eksperimentalni dizajn!

## Balansirani (uravnotežen) dizajn/ balansirani uzorak

- Isti broj replika u tretiranim i kontrolnim uzorcima
- Treba uvijek težiti balansiranom dizajnu no postoje iznimke koje opravdavaju nebalansirani dizajn s ciljem smanjivanja jedinki u tretiranim uzorcima

## Eksperimenti na životinjama – odstupanje od normalnog balansiranog uzorkovanja

- Patnja životinja – pitanje etičnosti istraživanja
- Broj jedinki u tretiranoj (visoka razina patnje) i kontrolnoj grupi (niska razina patnje)
- Nebalansirani ima nižu snagu
- Nadomjestak je povećan broj jedinki u kontrolnoj grupi
- Predmet odluke eksperimentatora (uvijek slušati savjete)

## Drop out cases

- Uzrokuju pretvaranje balansiraniog u nebalansirani dizajn

## Efektivnost kontrole

- Istraživanje “srčanog elektrostimulatora” na dugovječnost štakora.  
Kontrolna skupina?

### Etičnost kontrola

- Bolje ne eksperimentirati uopće nego izbaciti kontrole (ili koristiti loše i zastarjele statistike kao kontrole (povijesne kontrole)
- Primjena nebalansiraniog dizajna

## Priistranost eksperimentatora obzirom na kontrolnu skupinu

Istraživač treba biti indiferentan u određivanju subjekta i kontrole.

Nasumično dodjeljivanje (uzorkovanje) s istim dodatnim pretpostupcima

### Tipovi pokusa s obzirom na kontrolnu skupinu

- **sljepi** (procjenjivač ne zna je li uzorak iz tretirane ili netretirane skupine)
- **dvostruko sljepi** (procjenjivač ni uzorak kada se radi o ljudima, ne znaju u kojoj su skupini, dodatno se pokus ojačava placebo = potpuno identičan pravom tretmanu, osim parametra koji se istražuje)

I jos neke vrste kontrola...

## Povijesna kontrola

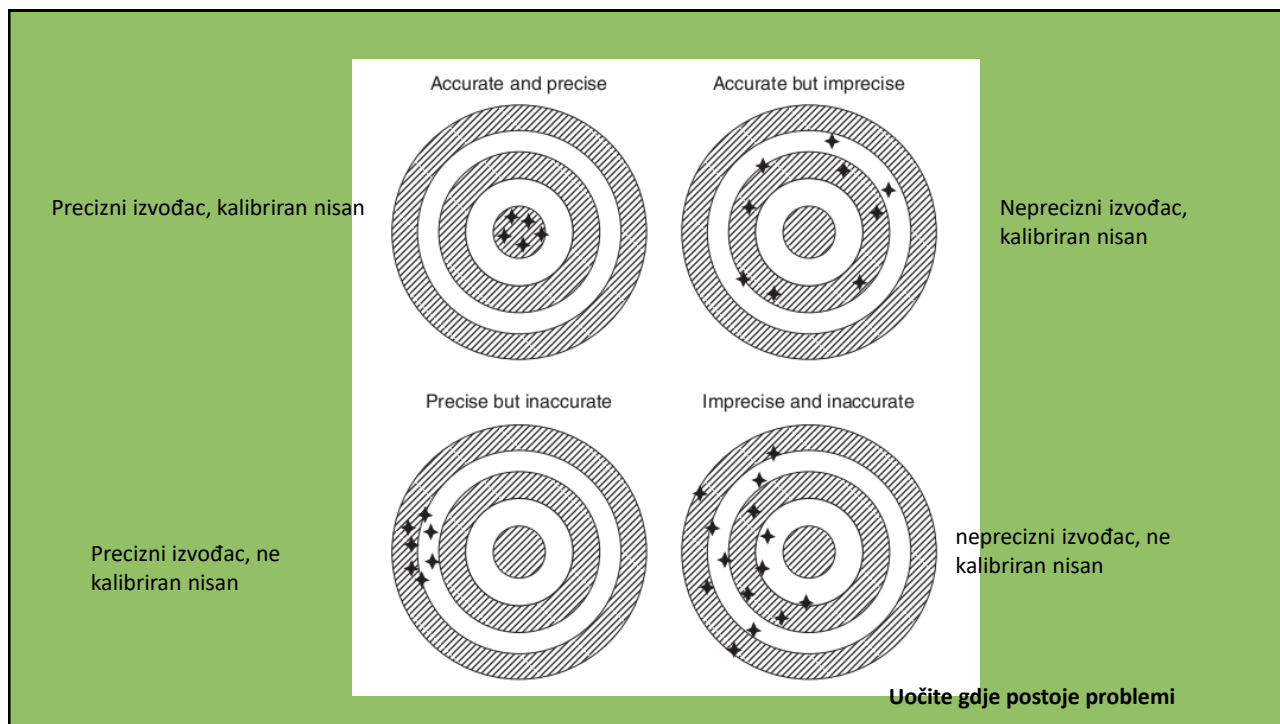
H: Novi tretman u liječenju bolesti daje bolje rezultate od trenutno primjenjivanog (ranije testiranog).

- 1) Usporedba novog tretmana i netretiranog –ne odgovara na pitanje nego pokazuje odnos tretiranog s novim tretmanom i netretiranog (jednostavan dizajn, jednofaktorijski s dvije razine)
- 2) Uvođenje starog tretmana bilo bi poželjno ali ponekad neetično
- 3) Primjena “**povijesne**” kontrole tj. postojećih znanja o primjenjivanoj metodi (kada koristiti)?
- 4) Povijesna kontrola uvodi faktor vremena

Što još moramo kontrolirati?

## Kontrola mjerenja/uređaja (netočnost i nepreciznost)

- Uključuje provjeru uređaja i podešavanje mjerne skale ako je potrebno
- Ne oduzima puno vremena
- Problem **netočnih** mjerenja (krivo kalibriran uređaj)
- Problem **nepreciznih** mjerenja (neprecizan uređaj ili provedba)
- Posvetiti vrijeme procjeni točnosti mjerenja



## Ponavljanje mjerenja/nekalibriran uređaj

- Dobivanje istih rezultata višestrukim ponavljanjem govori u prilog preciznosti pri mjerenju ali ne i točnosti rezultata (ako je uređaj nekalibriran)

• **Vaša su mjerenja ponovljiva ali ponovljivo kriva!**

## Varijabilnost unutar promatrača

Promatračev pomak

Zamislite da imate 1000 fotografija muškaraca od 25 godina te brojevima od 1 do 5 morate procijeniti dlakavost na licu. To radite oko 3 sata.

TIJEKOM TOG VREMENA NESVJESNO MOŽEMO PROMIJENITI UVJETE KATEGORIZIRANJA

## Rješenje problema

1. način: Detaljan opis kategorija npr. ako brkovi prelaze 80% dužine gornje usne smatraju se punima i samo takvi brkovi su kategorija 2.

### **Definiranje graničnih slučajeva**

- Sve manje od toga je kategorija 1

2. način: Definiranje graničnih slučajeva fotografijama

NA TAJ SE NAČIN SMANJUJE tzv. VARIJABILNOST UNUTAR PROMATRAČA

Istu kategorizaciju morate napraviti za još 1000 fotografija nakon mjesec dana

- Prije analize treba provesti STUDIJU PONOVLJIVOST što znači na određen broj fotografija iz prve analize treba ponovo procijeniti i nova procjena mora biti u skladu s onom prvom

## Dodatna kontrola metode, drugim metodolozkim pristupima s istim ciljem

- Osim pažljivim odabirom pozitivnih kontrola, KONTROLA METODE podrazumijeva **upotrebu druge metode s ciljem postizanja istog rezultata**
- Smanjuju rizik ali ne eliminiraju opasnost dobivanja krivog rezultata zbog nepoznatih efekata
- Najbolje je uvijek koristiti drugu (treću) alternativu i kemikalije i metode

Zanima nas signalni put koji potiče NGF\*, preko vezanja na kinazni receptora TrkA što dovodi do fosforilacije proteina Akt

**Treba definirati koji uvjet moraju zadovoljiti stanice za istraživanje (moraju imati receptor za NGF)**

**Treba definirati eksperiment u kojem bude mjerljiva promjena fosforilacije**

**Treba definirati dozu**

*\*NGF (nerve growth factor) je mali protein koji određene stanice potiče da postaju "neuron- like" i kasnije neuroni.*

*TrkA je receptor kinaza, NGF se veže na receptor i potice fosforilaciju kinazne domene unutar stanice– prijenos fosfata na Akt*

Negativna kontrola u eksperimentima u kulturi tkiva (stanica)

P: da li NGF\* uzrokuje fosforilaciju proteina Akt ?

**KOJE SU KONTROLE POTREBNE ?**

- EXP:
1. stanice tretirane NGF-om (NGF se otapa u puferu X)
  2. netretirane stanice – **NEGATIVNA kontrola 1**
  3. ????

\*NGF se otapa u puferu – tretman puferom **INTERPRETACIJSKA kontrola 2**

## Pozitivne kontrole u ovom eksperimentu

P1 Kontrola koja ukazuje da li je signal NGF uopće prenesen u stanice (treba pratiti promjenu tj. Aktivaciju receptora – TrkA protein)

➤ *Na temelju toga saznati koliko **NGFa** je potrebno za fosforilaciju (aktivaciju) receptora TrkA*

P2 Kontrola da se događa aktivacija Akt upotrebom nečeg za što se zna da aktivira Akt (to je IGF1)

➤ *Kontrola koja pokazuje da je fosforilaciju proteina Akt moguće mjeriti*

Uzorak 1-3      Ništa – neg. Kontrola

Uzorak 4-6      Pufer (isti za oba faktora rasta)

Uzorak 7-9      NGF, razina dostatna da aktivira TrkA, u puferu

Uzorak 10-12    IGF, razina dostatna da stimulira IGF receptor, u puferu –**pozitivna kont**

Interpretacijske

Dodatan parametar za mjerenje je aktivacija receptora Trk A, kontrola metode

## Ishod 1 (kompletan eksperiment, 1. set rezultata):

| Plate | Treatment | Akt activation | TrkA activation | IGF-1R activation |
|-------|-----------|----------------|-----------------|-------------------|
| 1     | Nothing   | (-)            | (-)             | (-)               |
| 2     | Nothing   | (-)            | (-)             | (-)               |
| 3     | Nothing   | (-)            | (-)             | (-)               |
| 4     | Buffer    | 1%             | 2%              | 0%                |
| 5     | Buffer    | 3%             | 3%              | 2%                |
| 6     | Buffer    | 2%             | 0%              | 1%                |
| 7     | IGF-1     | 220%           | 3%              | 500%              |
| 8     | IGF-1     | 380%           | 8%              | 625%              |
| 9     | IGF-1     | 340%           | 4%              | 400%              |
| 10    | NGF       | 410            | 745%            | 4%                |
| 11    | NGF       | 290            | 333%            | 4%                |
| 12    | NGF       | 320            | 530%            | 5%                |

### Zaključak 1

Pozitivna kont – radi; IGF aktivira Akt fosforilacija je mjerljiva

Dodano je dovoljno NGF da aktivira TrkA

NGF aktivira Akt jednako uspješno kao i IGF

## Ishod 2 (kompletan experiment, 2. set rezultata):

| Plate | Treatment | Akt activation | TrkA activation | IGF-1R activation |
|-------|-----------|----------------|-----------------|-------------------|
| 1     | Nothing   | (-)            | (-)             | (-)               |
| 2     | Nothing   | (-)            | (-)             | (-)               |
| 3     | Nothing   | (-)            | (-)             | (-)               |
| 4     | Buffer    | 1%             | 2%              | 0%                |
| 5     | Buffer    | 3%             | 3%              | 2%                |
| 6     | Buffer    | 2%             | 0%              | 1%                |
| 7     | IGF-1     | 220%           | 3%              | 500%              |
| 8     | IGF-1     | 380%           | 8%              | 625%              |
| 9     | IGF-1     | 340%           | 4%              | 400%              |
| 10    | NGF       | 3%             | 745%            | 4%                |
| 11    | NGF       | 7%             | 333%            | 4%                |
| 12    | NGF       | 4%             | 530%            | 5%                |

### Zaključak2

NGF aktivira receptor ali ne Akt !!!; uspješnost mjerenja aktivacije Akt pokazana je s IGF-1 (poz. kont.)

## bez IGF pozitivne kontrole, 2. set rezultata

| Plate | Treatment | Akt activation | TrkA activation |
|-------|-----------|----------------|-----------------|
| 1     | Nothing   | (-)            | (-)             |
| 2     | Nothing   | (-)            | (-)             |
| 3     | Nothing   | (-)            | (-)             |
| 4     | Buffer    | 1%             | 2%              |
| 5     | Buffer    | 3%             | 3%              |
| 6     | Buffer    | 2%             | 0%              |
| 7     | NGF       | 3%             | 745%            |
| 8     | NGF       | 7%             | 333%            |
| 9     | NGF       | 4%             | 530%            |

Sumnja: ili nema aktivacije ili antitijela za detekciju fosforiliranog Akt ne rade

## bez TrkA pozitivne kontrole, 2. set rezultata

| Plate | Treatment | Akt activation | IGF-1R activation |
|-------|-----------|----------------|-------------------|
| 1     | Nothing   | (-)            | (-)               |
| 2     | Nothing   | (-)            | (-)               |
| 3     | Nothing   | (-)            | (-)               |
| 4     | Buffer    | 1%             | 0%                |
| 5     | Buffer    | 3%             | 2%                |
| 6     | Buffer    | 2%             | 1%                |
| 7     | IGF-1     | 220%           | 500%              |
| 8     | IGF-1     | 380%           | 625%              |
| 9     | IGF-1     | 340%           | 400%              |
| 10    | NGF       | 3%             | 4%                |
| 11    | NGF       | 7%             | 4%                |
| 12    | NGF       | 4%             | 5%                |

Sumnja: ili stvarno nema aktivacije ili je nedostatna količina NGFa

### Ishod 3 (kompletan experiment, treći set rezultata)

| Plate | Treatment | Akt activation | TrkA activation | IGF-1R activation |
|-------|-----------|----------------|-----------------|-------------------|
| 1     | Nothing   | (-)            | (-)             | (-)               |
| 2     | Nothing   | (-)            | (-)             | (-)               |
| 3     | Nothing   | (-)            | (-)             | (-)               |
| 4     | Buffer    | 1%             | 2%              | 0%                |
| 5     | Buffer    | 3%             | 3%              | 2%                |
| 6     | Buffer    | 2%             | 0%              | 1%                |
| 7     | IGF-1     | 220%           | 3%              | 500%              |
| 8     | IGF-1     | 380%           | 8%              | 625%              |
| 9     | IGF-1     | 340%           | 4%              | 400%              |
| 10    | NGF       | 50%            | 745%            | 4%                |
| 11    | NGF       | 40%            | 333%            | 4%                |
| 12    | NGF       | 32%            | 530%            | 5%                |

Akt je znatno slabije aktiviran NGF-om nego IGF-1-om, iako je aktivacija receptora visoka

### bez IGF-1R pozitivne kontrole, treći set rezultata

| Plate | Treatment | Akt activation | TrkA activation |
|-------|-----------|----------------|-----------------|
| 1     | Nothing   | (-)            | (-)             |
| 2     | Nothing   | (-)            | (-)             |
| 3     | Nothing   | (-)            | (-)             |
| 4     | Buffer    | 1%             | 2%              |
| 5     | Buffer    | 3%             | 3%              |
| 6     | Buffer    | 2%             | 0%              |
| 7     |           |                |                 |
| 8     |           |                |                 |
| 9     |           |                |                 |
| 10    | NGF       | 50%            | 745%            |
| 11    | NGF       | 40%            | 333%            |
| 12    | NGF       | 32%            | 530%            |

NGF aktivira Akt, nema šanse da uočimo značajniji učinak drugog faktora rasta  
Ne zna se da li je ovakva razina aktivacije fiziološki važna

## Standardi i apsolutna mjerenja

- Univerzalno prihvaćene vrijednosti upotrebljive su i za druge istraživače

(moguća je šira komparacija rezultata)

Ukoliko je moguće pokušajte također izvršiti mjerenja koja su apsolutna; izraziti ih u vrijednostima koje su univerzalno prihvaćene kao standardi.

npr. Sadržaj RA u kalusu raslom na mediju s dodatkom tvari X u odnosu na komercijalnu RA (standard) za HPLC visoke čistoće.

## Dnevnici i protokoli

- Dobro bilježenje rada čini glavni ključ za učinkovitost.

## Laboratorijski dnevnik

(što je poželjno)

- Treba biti trajno i čvrsto povezan
- Bilježnica formata A4
- **Stranice - numerirane**
- Podaci se unose **neposredno** u bilježnicu u vrijeme kad su promatrani
- Memoriranje NIJE DOZVOLJENO!!!

## Laboratorijski dnevnik/2

- Podaci se unose **kemijskom olovkom (?)**
- To je posebno važno ukoliko se dnevnik koristi kao dokaz u slučaju patentiranja

### Koje podatke unosimo u Dnevnik istraživanja?

1. datum početka pokusa
2. sažeti naslov pokusa
3. kratak opis svrhe (cilja) pokusa, tj. hipoteze koja se provjerava
4. opis pokusnih skupina
5. opis pokusnog postupka
6. zapažanja tijekom pokusa
7. rezultati pokusa
8. kratak zaključak o pokusu

## Laboratorijski dnevnik/3

- Svaki “ulazak” treba **biti datiran**
- Podaci ne smiju biti natrpani na stranicama;
- **Unošenje podataka i referenci treba biti takvo da se i godinama kasnije može vidjeti koji je instrument (ili kemikalija) korišten i pod kojim uvjetima.**

## Laboratorijski dnevnik/4

- Katkad je potreban i opis instrumenta
- Ukoliko je **izvršena neka preinaka u postupku odmah treba biti opisana**
- Treba zabilježiti izvor npr. kalibrirane krivulje, korekcije i sl. s datumom kada je to urađeno.
- Treba zabilježiti gdje su pohranjeni uzorci

## Laboratorijski dnevnik/5

- Određeni navodi o cilju svakog eksperimenta i **sažetak zaključaka** koji su dobiveni čini dnevnik mnogo korisnijim
- Skice, crteži, dijagrami vrlo su važni
- Važno je zabilježiti što je istinski viđeno, uključujući i pojave koje u datom vremenu nisu bile savim razumljive
- Loši, neobećavajući pokusi kao i neuspješni trebaju se detaljno zabilježiti

## Laboratorijski dnevnik/6

- Potrebno je sistematizirati slike i ilustracije, kada postoje
- Kemikalije: važno je zapisati izvor (firmu), stupanj čistoće
- Obilježavanje bočica, kemikalija, aparatura, epica i dr.
- Lociranje laboratorija, frižidera, polica, kutija kamo su spremljeni