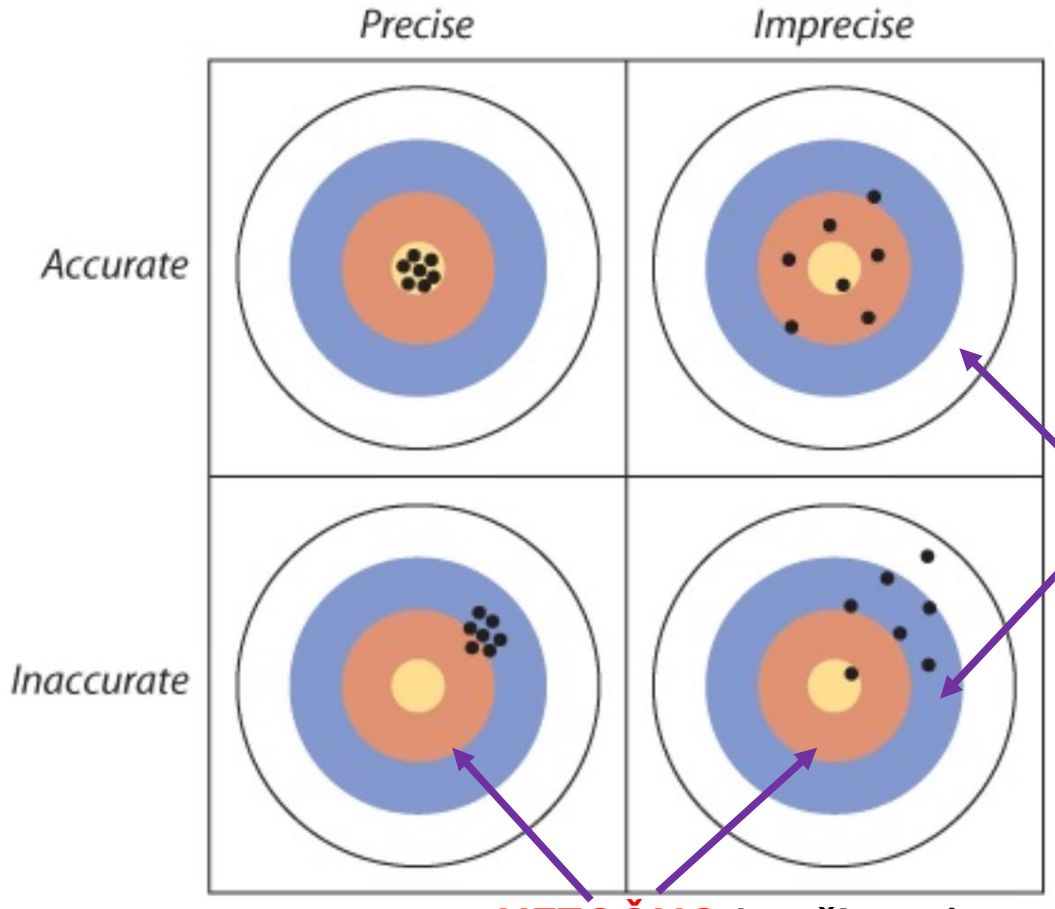
DIZAJN EKSPERIMENTA

- snaga testa
- veličina uzorka
- ponavljanja (replikati)
- slučajan raspored (randomizacija)
- kontrola
- višefaktorski pokusi

STATISTIČKE GREŠKE



NEPRECIZNO (greška uzorkovanja – slučajna, smanjuje se veličinom uzorka)

NETOČNO (greška pristranosti – nereprezentativni uzorci)

Figure 1.2-2
Whitlock et al., *The Analysis of Biological Data*, 2e, © 2015
W. H. Freeman and Company

GREŠKE TIPA 1 I 2

Greška tipa 1 – odbijanje točne nul hipoteze (definirana s *α, smanjuje se smanjivanjem α)*

- "lažno pozitivni rezultat" (npr. nalazimo razliku koja ne postoji)

npr. ako je *α=0.05 jednom u 20 puta činimo grešku tipa 1*

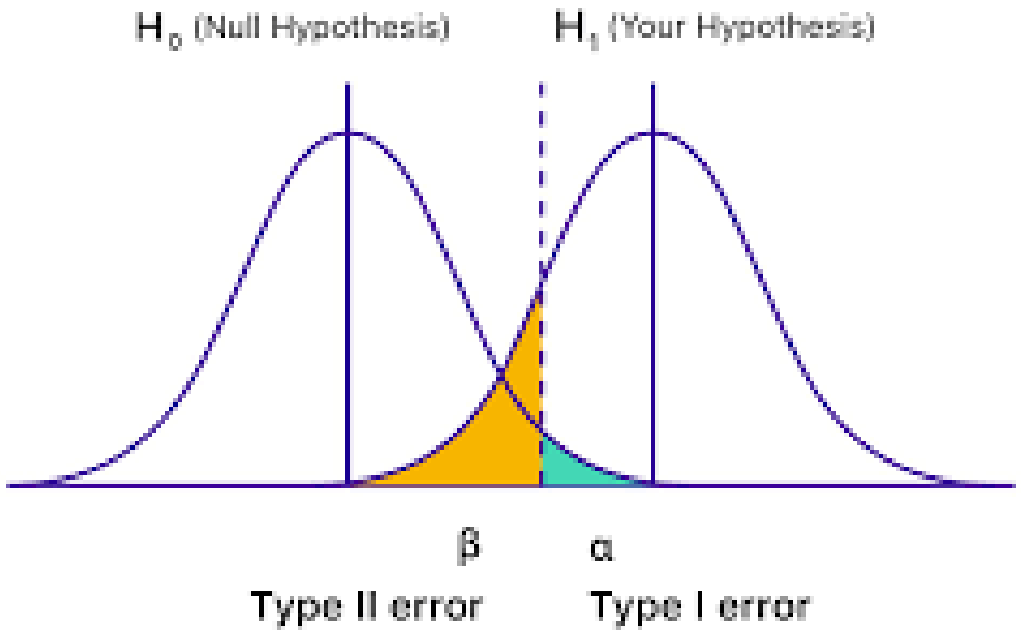
Greška tipa 2 – ne odbijanje netočne nul hipoteze (krivo prihvaćanje H_o)

- "lažno negativni rezultat" (npr. ne nalazimo razliku koja postoji)

Snaga testa – vjerojatnost da slučajan uzorak dovede do greške tipa 2

Povećana veličina uzorka smanjuje grešku tipa 2 i povećava snagu testa

	H_0 True	H_0 False
Accept H_0 /Reject H_1	True	False: Type II error
Reject H_0 /Accept H_1	False: Type I error	True



distribucije slučajnih prosjeka uzorka (st. error)

https://gallery.shinyapps.io/CLT_mean/

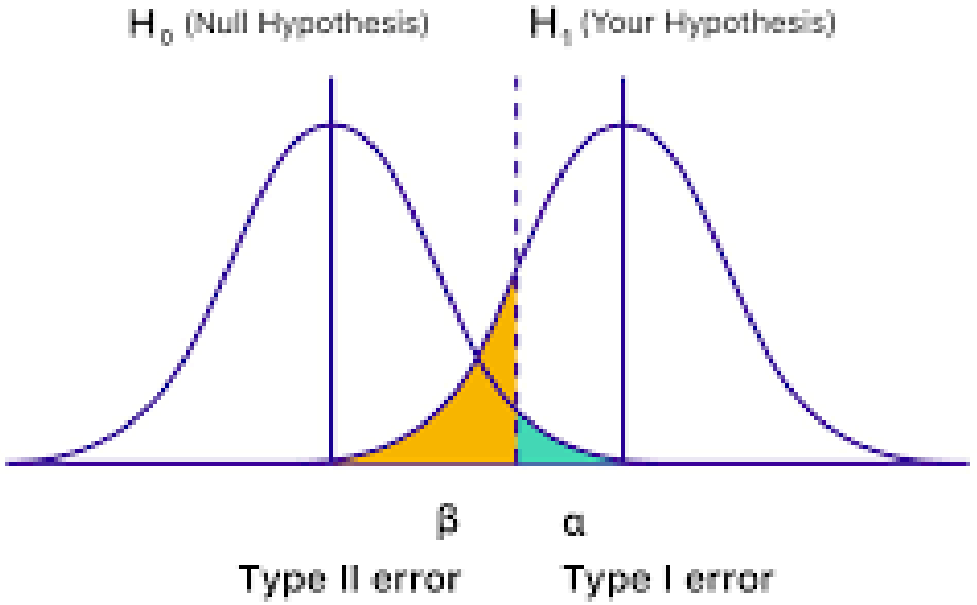
SNAGA TESTA

H0: μ1 − μ2 = 0.

HA: μ1 − μ2 ≠ 0.

α – razina značajnosti (npr. 0.05)

β - vjerojatnost za grešku tipa II



lažno negativan lažno pozitivan

Konvencija je da je poželjno da β bude najviše 0.2

Snaga testa = 1- β

- u 80 % eksperimenata možemo odbaciti netočnu H_0 hipotezu
- Snaga testa ovisi najviše o veličini uzorka
- **Poželjna veličina uzorka može se izračunati** (uz varijable stand. dev, relevantnu magnitudu učinka)
- npr. za dvostrani t- test, snaga testa 0.8, razina značajnosti 0.5

veličina uzorka (n) u svakoj grupi

$n \approx 16(\sigma \backslash D)^2$

D – unaprijed određena relevantna razlika u srednjim vrijednostima

σ pretpostavljena st. dev.

SNAGA TESTA

H0: μ1 − μ2 = 0.

HA: μ1 − μ2 ≠ 0.

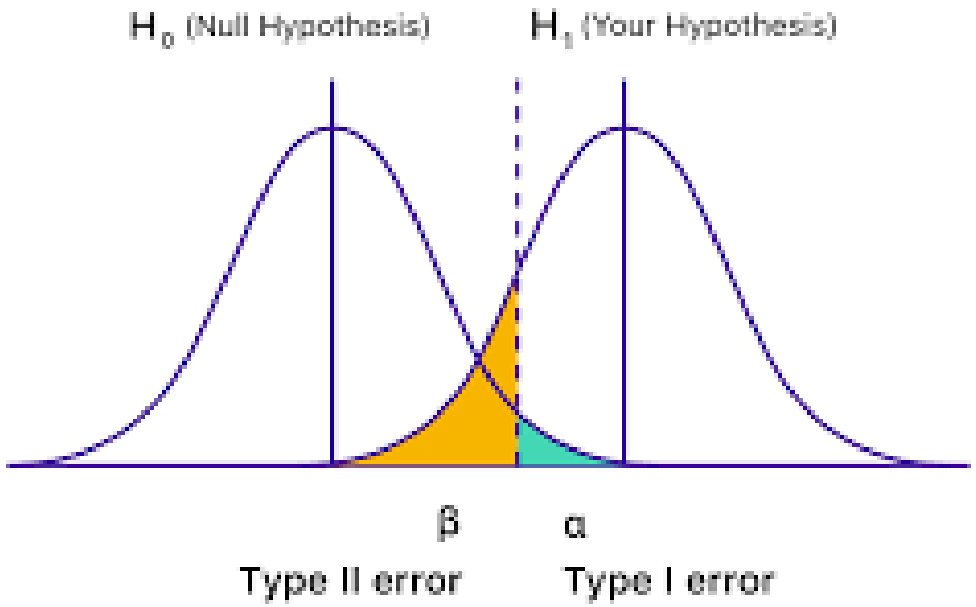
α – razina značajnosti (npr. 0.05)

β - vjerojatnost za grešku tipa II

Konvencija je da je poželjno da β bude najviše 0.2

Snaga testa = 1 - β

- u 80 % eksperimenata možemo odbaciti netočnu H_0 hipotezu
- Snaga testa ovisi najviše o veličini uzorka



lažno negativan lažno pozitivan

ŠTO JE VEĆA VELIČINA UZORKA VEĆA JE I SNAGA TESTA

snaga testa ovisi i o razlici u srednjim vrijednostima

velika varijanca smanjuje snagu testa

formule za veličinu uzoraka za intervale pouzdanosti, proporcije, srednje vrijednosti…

The Analysis of Biological Data

Michael C. Whitlock and Dolph Schluter

KAKO SMANJITI GREŠKU UZORKOVANJA (povećanje preciznosti)?

- **ponavljanja (replikati)**
- **balansiran dizajn**
- **blokovi**
- **kontrolirati što više varijabli** (stalna temp, svjetlo, pH, starost i genotip jedinki…)

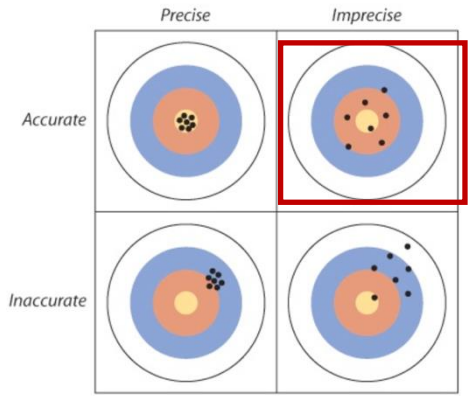


Figure 1.2-2
Whitlock et al., *The Analysis of Biological Data*, 2e, © 2015 W. H. Freeman and Company

Greška uzorkovanja *dovodi do* ***nepreciznosti*** *(koja se smanjuje što su uzorak i uzorkovanje veći)*

REPLIKATI

Repliciranje je primjena svakog tretmana na multipne, neovisne eksperimentalne jedinice (ne samo povećanje broja jedinki)

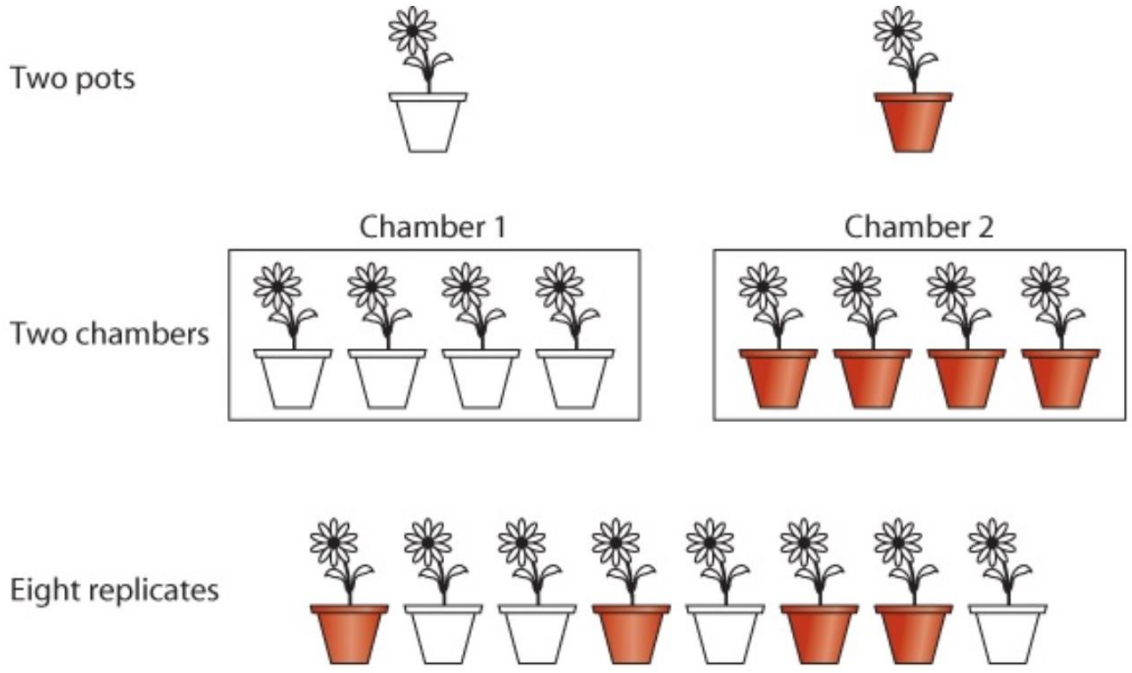


Figure 14.4-1
Whitlock et al., *The Analysis of Biological Data*, 2e, © 2015 W. H. Freeman and Company

randomizirani replikati

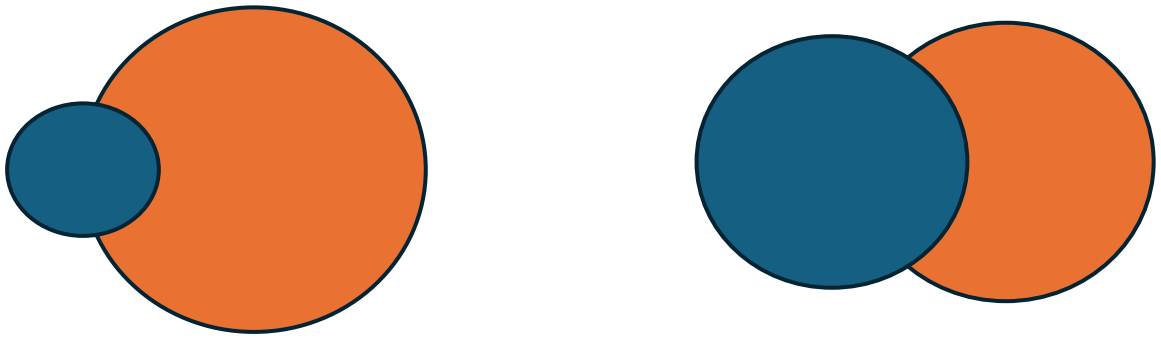
Mnogobrojni organizmi koji pripadaju istoj eksperimentalnoj jedinici (Petrijevka, tegla, polje, obitelj, lokva….) su **jedan replikat** ukoliko je vjerojatno da sliče u ciljanom svojstvu više nego s jedinkama u drugim eksperimentalnim jedinicama

BALANSIRAN (URAVNOTEŽEN) DIZAJN

Balansiran eksperimentalni dizajn podrazumijeva da svi tretmani imaju jednaku veličinu uzorka.

Metode usporedbe među grupama koje podrazumijevaju normalnu rasporedbu (linearni modeli, ANOVA, t-test… "parametrijska statistika") robusnije su na odstupanja od normalnosti ako je dizajn balansiran

Preciznost utvrđivanja razlike se povećava s povećanom veličinom uzorka (makar i jedne grupe), ali je **manja preciznost utvrđivanja srednje vrijednosti** manje grupe



uravnotežen dizajn

BLOKOVI

Blokovi su **grupe eksperimentalnih jedinica sa sličnim svojstvima**. Unutra svakog bloka tretmani su **nasumice** dodijeljeni eksperimentalnim jedinicama. Na taj način pokus se dijeli na skupine pokusnih jedinica.

- blokovi s biljkama u polju s istim tlom i vremenskim uvjetima
- životinje iz istog legla
- terariji na istoj polici u eksperimentalnoj prostoriji
- pacijenti iste klinike
- eksperimenti izvedeni u istom danu

Potpuni blokovi imaju prisutne sve tretmane, **nepotpuni blokovi** samo neke. **Potpuni blokovi su replikati!**

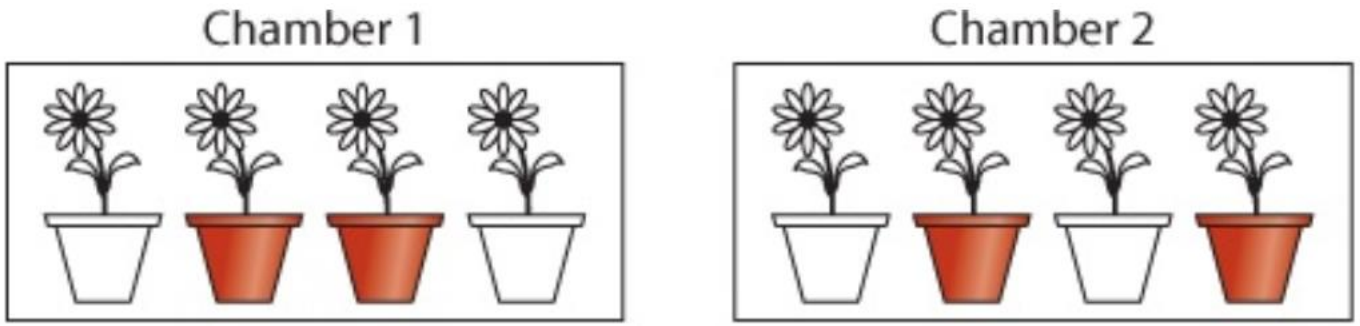
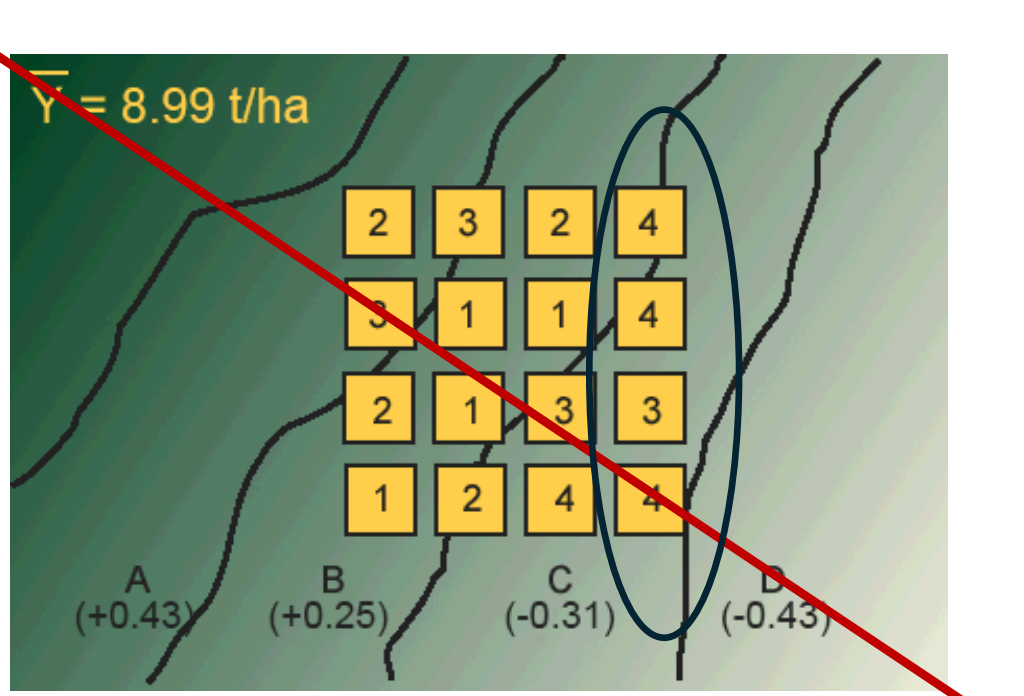


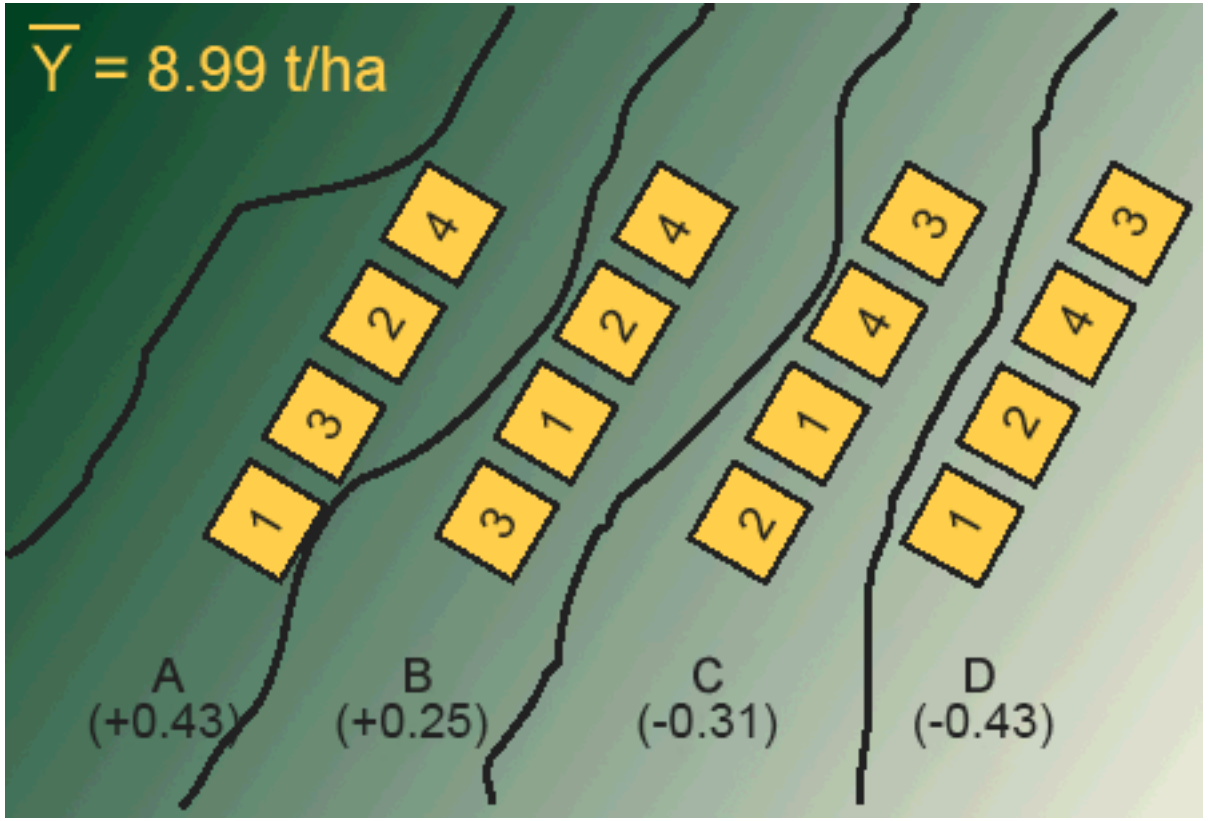
Figure 14.4-2
Whitlock et al., *The Analysis of Biological Data*, 2e, © 2015
W. H. Freeman and Company

Izrazito važna nasumičnost rasporeda po blokova (random)

BLOKOVI – slučajni blokni raspored

Blokovi su **grupe eksperimentalnih jedinica sa sličnim svojstvima**. Unutra svakog bloka tretmani su **nasumice** dodijeljeni eksperimentalnim jedinicama. Na taj način pokus se dijeli na skupine pokusnih jedinica.

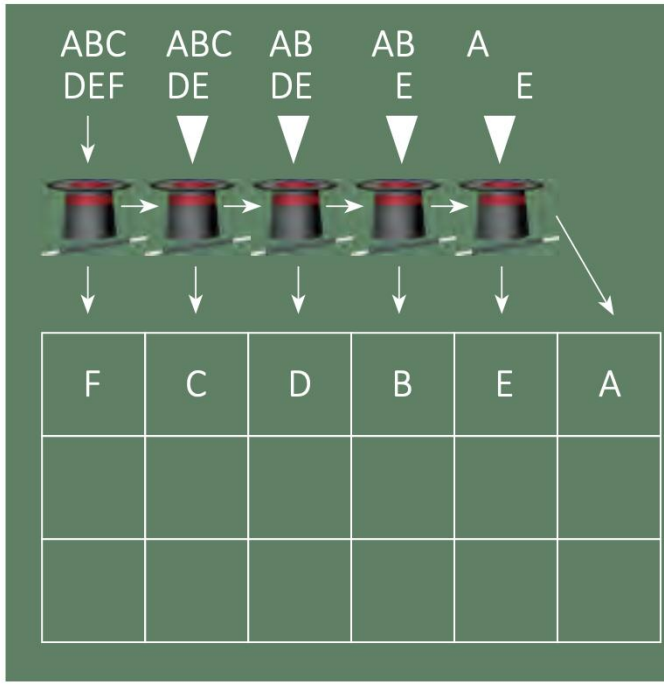




- četiri bloka s različitim vrijednostima okoliša, 1 do 4 različiti tretmani

BLOKOVI – slučajni blokni raspored

POTPUNI BLOKOVI



Slika 4.1 Shema izrade dizajna pokusa prema slučajnom bloknom rasporedu.

- eksperimentalne jedinice se nasumice raspoređuju po svakom bloku!
- svaki blok sadrži sve eksperimentalne jedinice
- (često korištenje algoritama za randomiziranje uzoraka)

NEPOTPUNI BLOKOVI

Repeticije

I				II				III			
Blokovi											
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	2	3	4	3	4	1	2	2	3	4	1
5	6	7	8	8	5	6	7	8	5	6	7
9	10	11	12	12	9	10	11	9	10	11	12
13	14	15	16	15	16	13	14	14	15	16	13
17	18	19	20	18	19	20	17	19	20	17	18

Slika 5.1 Primjer „radnog" alfa dizajna.

- svaki blok ne sadrži sve eksperimentalne jedinice, ali svaka repeticija da (više blokova)

Upareni dizajn (za npr. t- test) predstavlja blokove

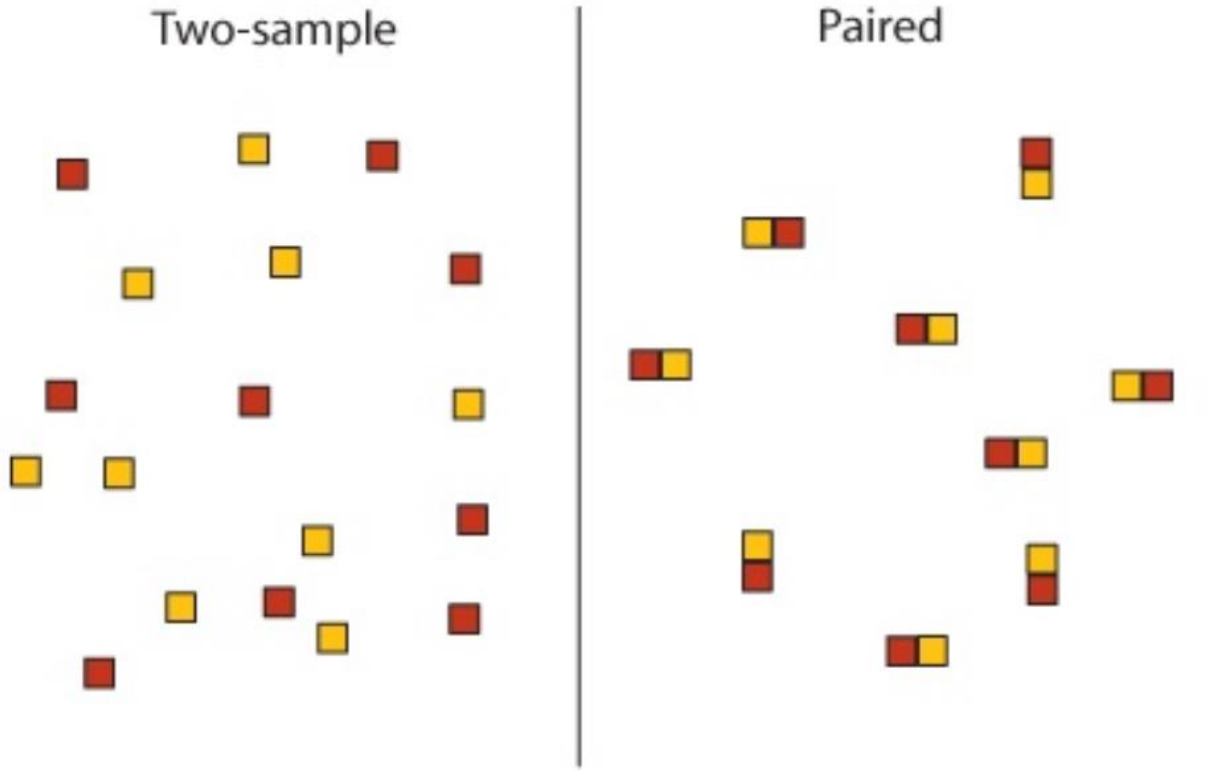
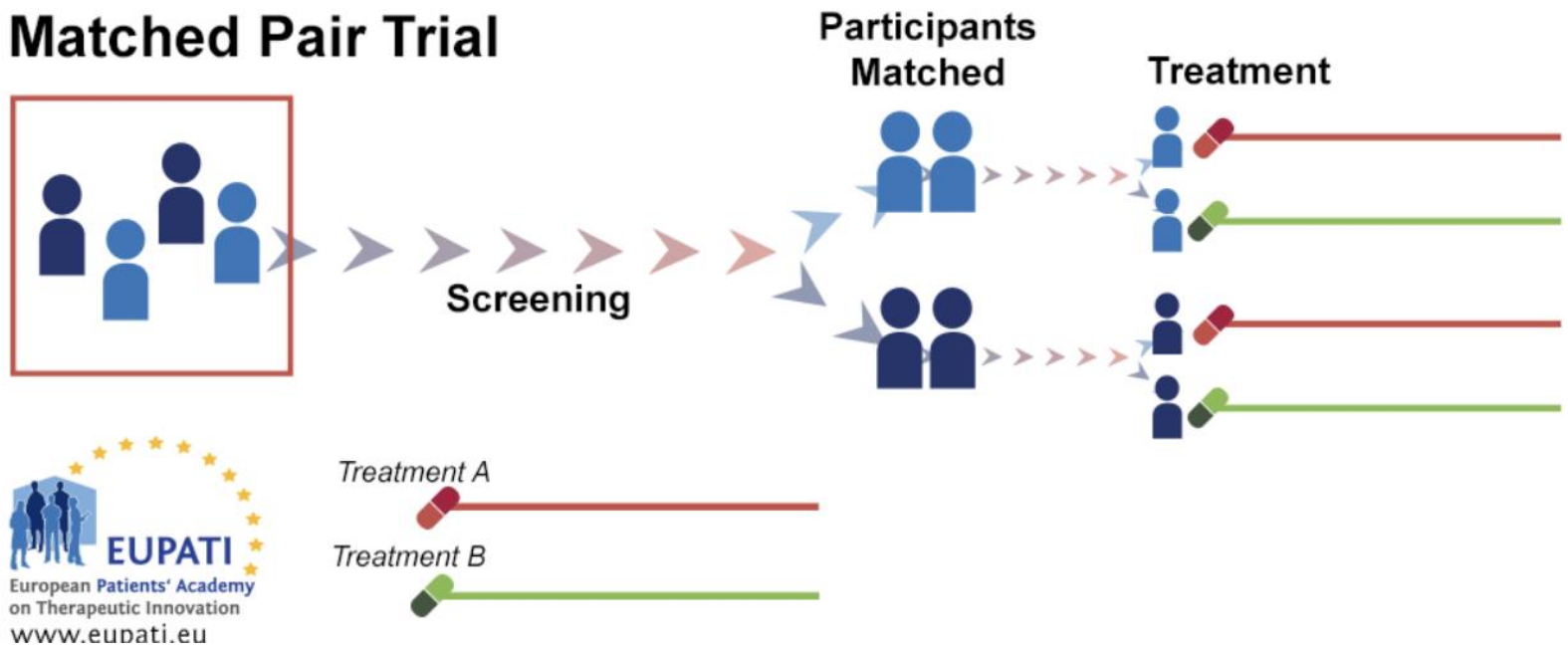


Figure 12.1-1
Whitlock et al., *The Analysis of Biological Data*, 2e, © 2015 W. H. Freeman and Company

Pri uparenom dizajnu, oba tretmana se apliciraju na svaku eksperimantalnu jedinicu – snažniji dizajn jer je veća kontrola za ostale uvjete

npr. daždevnjaci u šumi, svaki blok je ploha u šumi i na neposrednoj čistini

Upareni dizajn u kliničkim istraživanjima



- u kliničkim istraživanjima pacijenti mogu biti raspoređeni u parove na osnovu npr. spola i dobi, u svakom paru jedna jedinka izložena jednom tretmanu
- problemi: jedna jedinka može odustati, teškoće pri uparivanju, nepoznavanje svih svojstava

KAKO SMANJITI GREŠKU EKSPERIMENTA (povećanje točnosti)?

- randomizacija
- kontrole
- pažljiv dizajn – izbjegavanje eksperimentalnih artefakata
- slijepi pokus (blinding)
- kontrola “confounding” varijabli

EKSPERIMENTALNI ARTEFAKTI

Eksperimentalni artefakt je greška prouzročena tijekom ekperimenta.

Npr. stres prilikom rukovanja životinjama u tretmanu uzrokuje promjene fizioloških parametara



Rješenje? Minimaliziranje promjena prirodnih uvjeta, planiranje i razmišljanje o “confounding” varijablama, usaglašavanje tretmana i kontrole, randomizacija

Perspective | Open access | Published: 06 August 2025

How thoughtful experimental design can empower biologists in the omics era

Maggie R. Wagner & Manuel Kleiner

Nature Communications **16**, Article number: 7263 (2025) | Cite this article

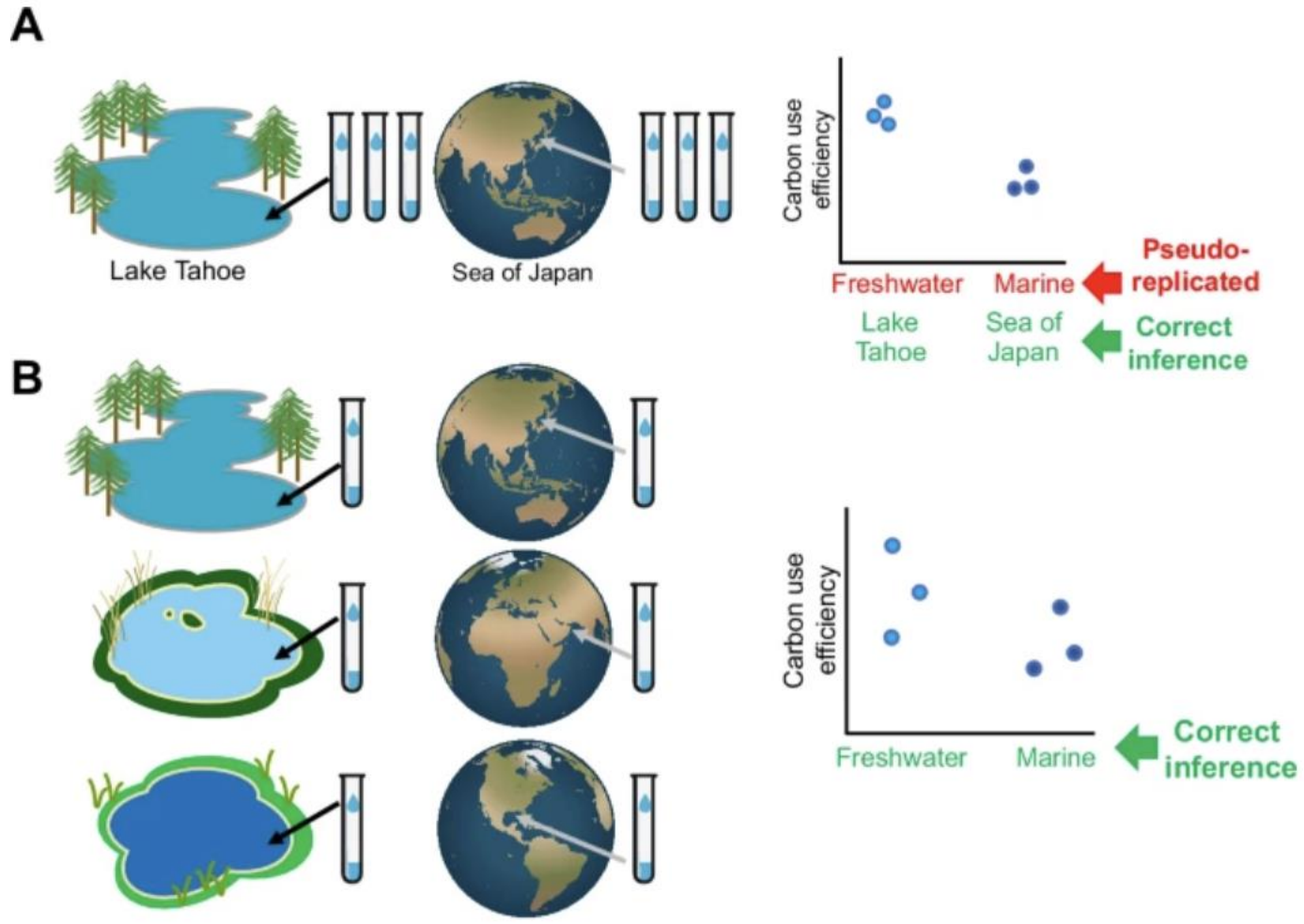
28k Accesses | **2** Citations | **65** Altmetric | Metrics

"First, we discuss how in -omics research, many errors arise because of the misconception that a large quantity of data (e.g., deep sequencing or the measurement of thousands of genes, molecules, or microbes) ensures precision and statistical validity. ***In reality, it is the number of biological replicates that matters****."*

Perspective | Open access | Published: 06 August 2025

How thoughtful experimental design can empower biologists in the omics era

Fig. 1: Valid experimentation requires independence of all replicates.

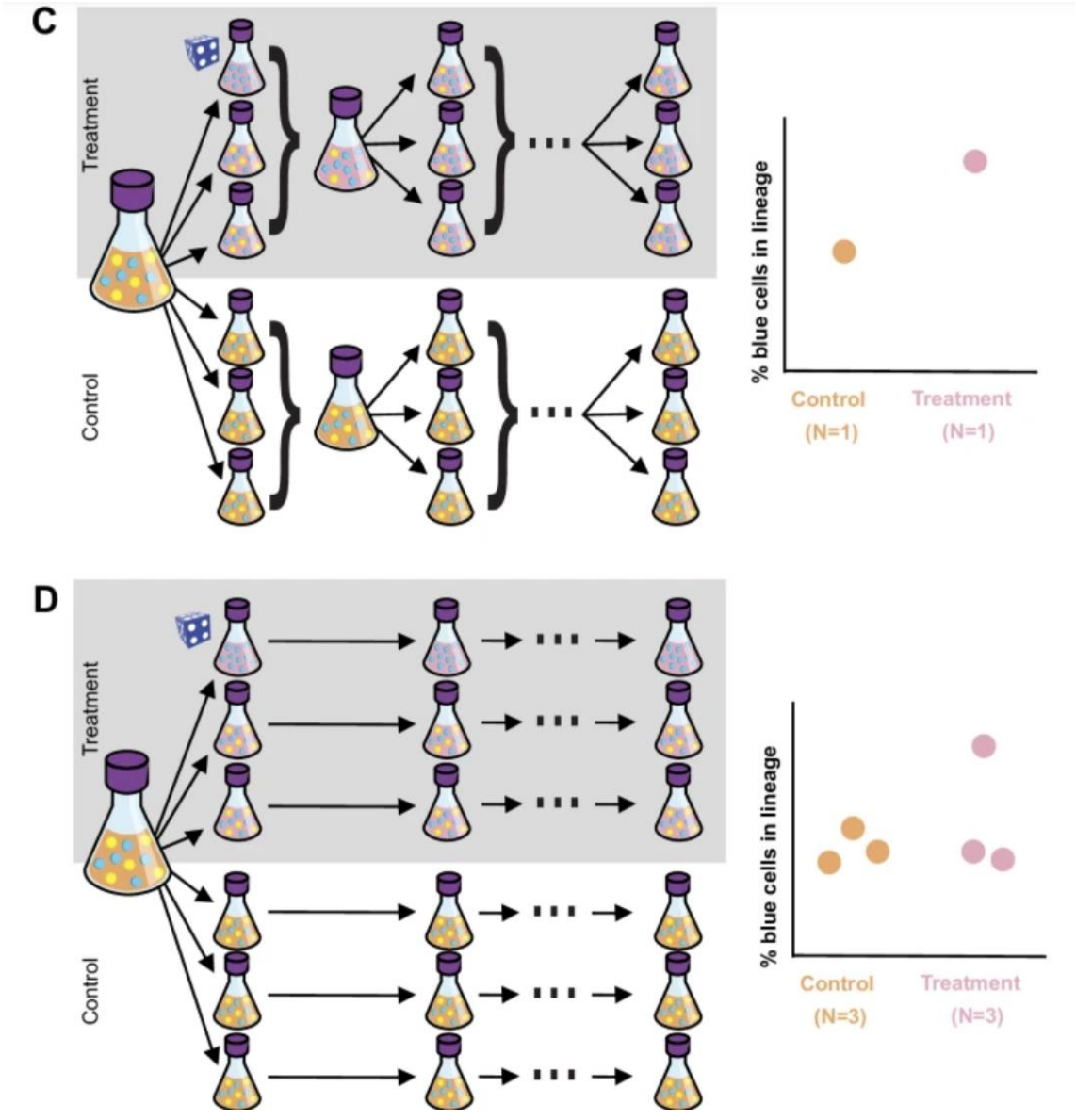


Metabolizam ugljika u mikrobnim zajednicama slatkovodnih i morskih ekosustava

- nisu neovisni uzorci!!!!!

Perspective | Open access | Published: 06 August 2025

How thoughtful experimental design can empower biologists in the omics era



Pokus eksperimentalne evolucije

- pseudoreplikacija pooliranjem – stohastični događaj u bilo kojoj eksperimentalno jedinici utječe na ukupni rezultat
- preporučljivo je svaku eksperimentalnu jedinicu tretirati odvojeno kao replikat

CONFOUNDING VARIJABLE
(*dodatne, zbunjujuće?)*

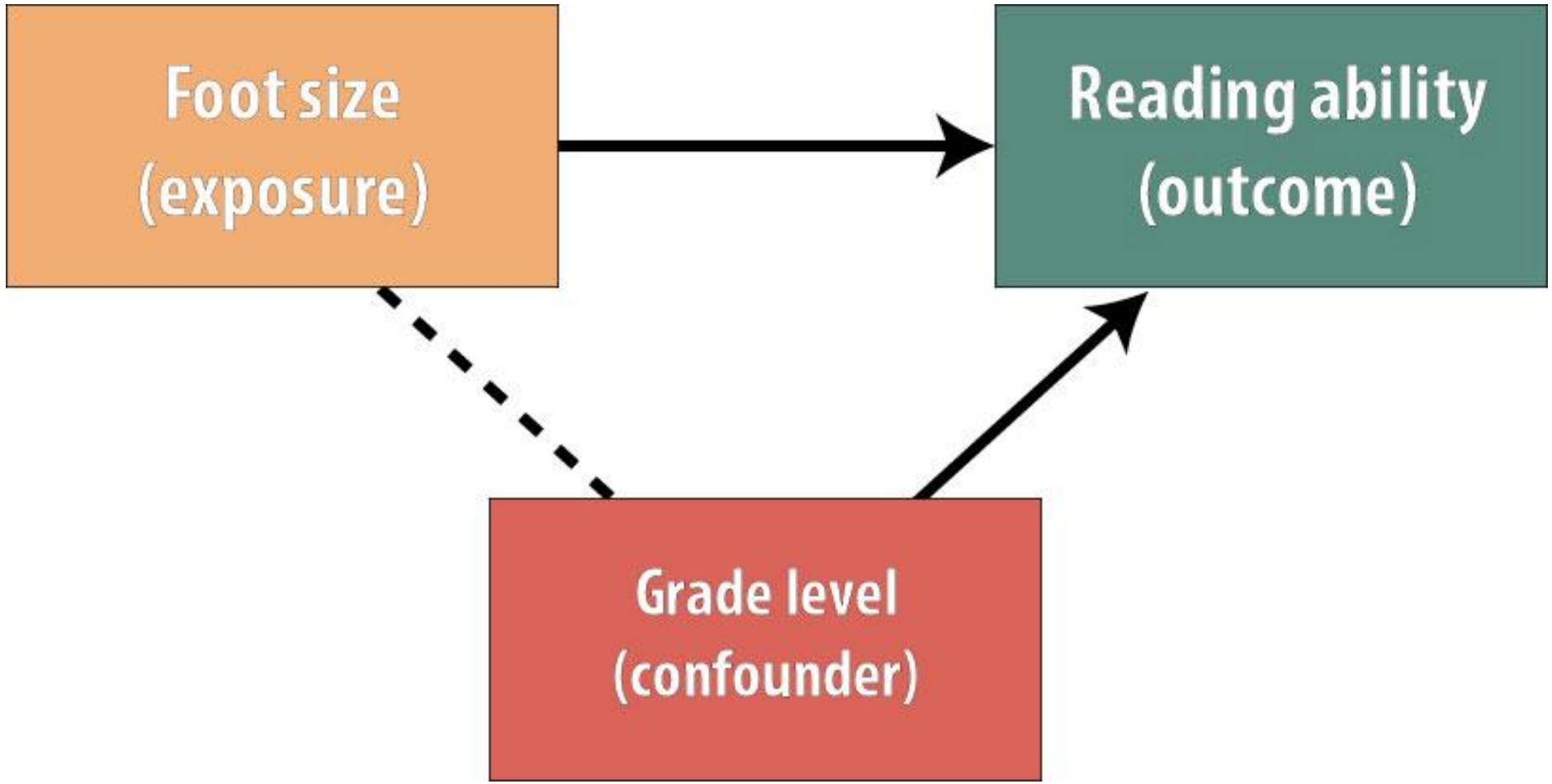
Confounding varijabla maskira ili izvitoperuje odnos među mjerenim varijablama u pokusu.

npr. visoke temperature povećavaju potrošnju sladoleda i stopu ubojstva, koje su stoga korelirane
npr. socioekonomski status je confounding varijabla za povezanost dojenja i rasta bebe
npr. pušenje je confounding varijabla za učinak lijeka

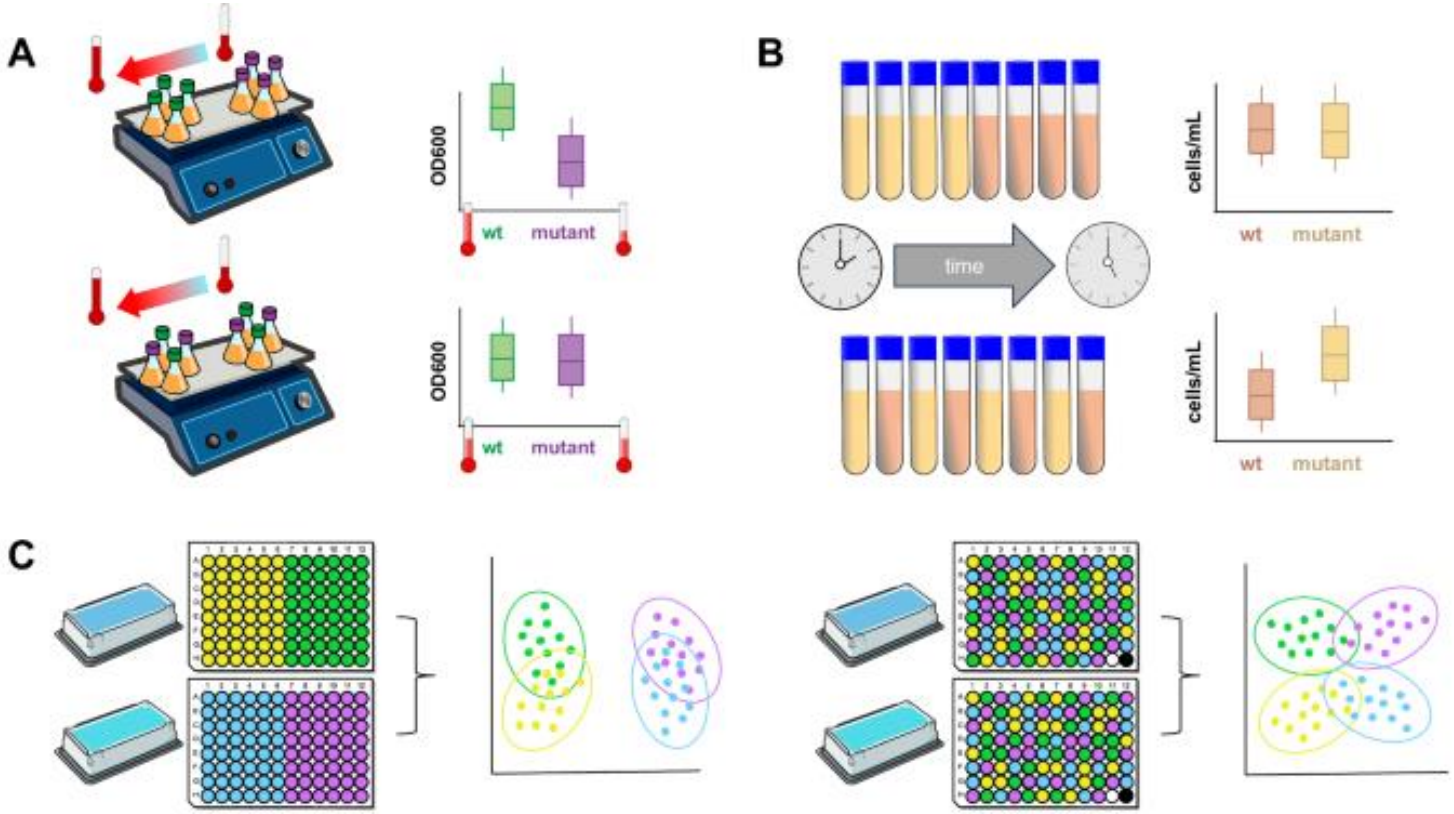
Spol je često confounding varijabla!

Randomizacija (nasumično raspodjeljivanje u grupe) smanjuje učinak confounding varijabli!

Randomizacija ne smanjuje učinak na varijancu varijabli, ali smanjuje njihov učinak na korelacju mjerenih varijabli – smanjuje se greška pristranosti (netočnost)

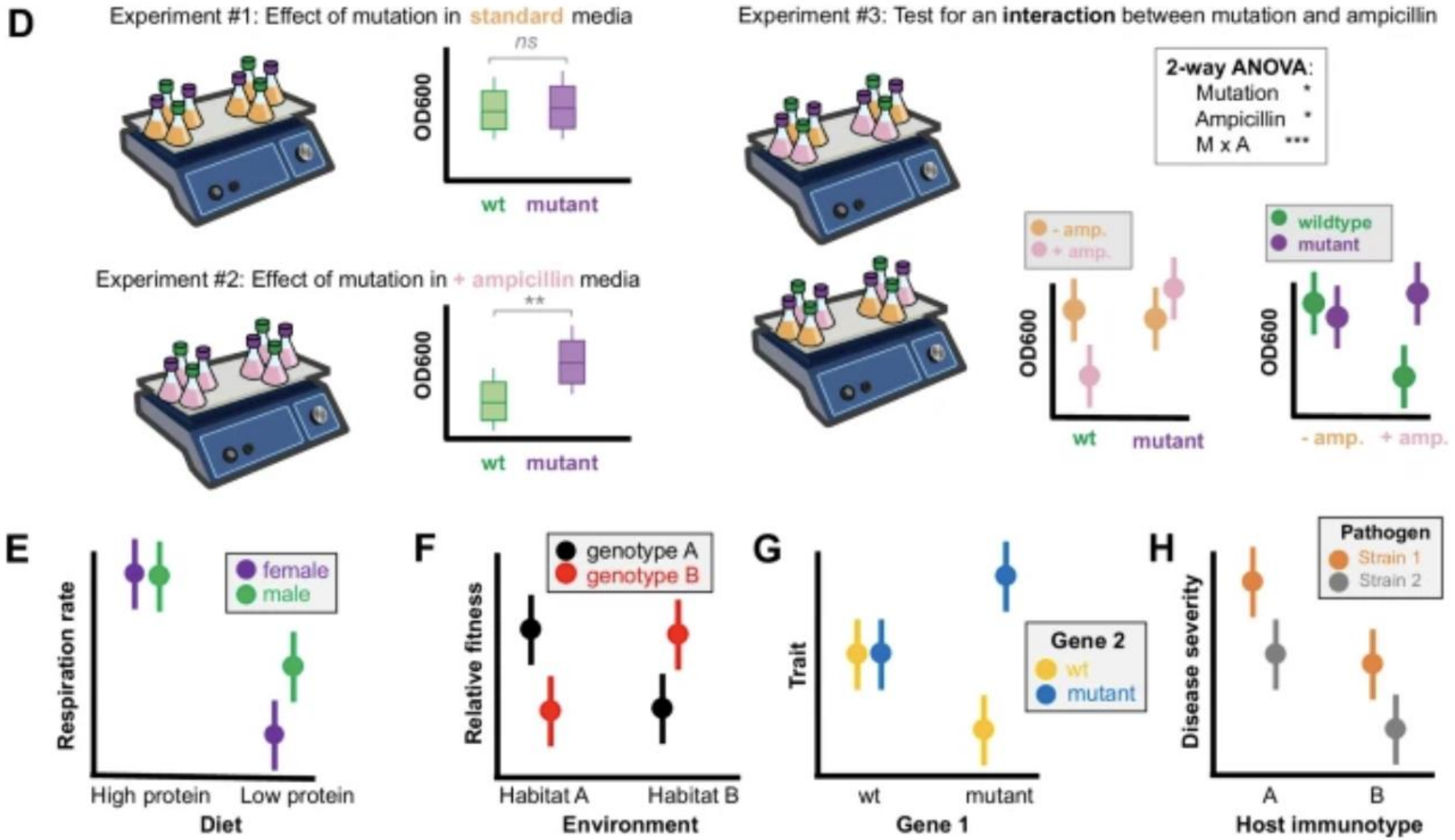

Foot size
(exposure)
Reading ability
(outcome)
Grade level
(confounder)

Randomizacija bioloških replikata kroz prostor, vrijeme i serije može smanjiti eksperimentalnu pristranost i otkriti interakcije između varijabli.



- temperaturni bias za tretmane
- vremenski bias u brojanju stanica u jednom tretamnu, drugi tretman ima više vremena za rast stanica
- randomiziranje uzoraka u plate-u, plus negativna i pozitivna kontrola

https://doi.org/10.1038/s41467-025-62616-x



D – obje varijable – i genotip i amplicilin su randomizirane u eksperimentu 3 – amplicilin inhibira rast divljeg soja
E – rata disanja ovisi drugačije o prehrani kod mužjaka i ženki
F – genotip biljke ima drugačiji učinak na fitnes ovisno o okolišu
H- imunotip A je osjetljiviji na patogen, a patogen 1 ima jači učinak na oba imunotipa
G – epistatski učinak gena na fenotip

KONTROLNA SKUPINA

Kontrola je eksperimentalna skupina izložena istim uvjetima kao tretirane grupe.

Kontrola smanjuje utjecaj *confounding* varijabli u analizi.

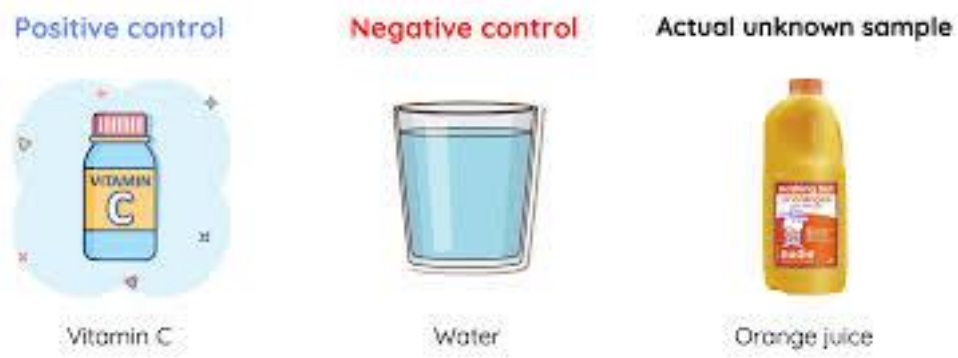
npr. operacija kontrolne skupine štakora kao kontrola za skupinu kojoj se vadio dio organa

npr. placebo tretman u kliničkim studijama

npr. administriranje otapala kontrolnoj skupini račića izloženim toksikantu u otapalu

To su sve **negativne kontrole.**

Pozitivna kontrola je npr. administriranje tretmana za kojeg je poznat očekivani učinak.



SLIJEPI POKUS

Slijepi pokus vrlo je relevantan u kliničkim studijama – **ne poznavanje rasporeda ispitanika u grupama tretmana od strane ispitanika i istraživača**

Jednostrano slijep pokus – samo ispitanici ne znaju tko je u kojoj skupini (tretman vs. placebo)

Dvostruko slijep pokus – ni istraživač ni ispitanici ne znaju tko je u kojoj skupini

U svim područjima biologije treba težiti barem jednostrano slijepom pokusu, jer se na taj način smanjuje subjektivni učinak istraživača (npr. ponavljanje mjerenja za vrijednosti koje smatramo da ne odgovaraju očekivanjima za određenu grupu ili uzorak, odbacivanje vrijednosti za uzorke s outlierima više za jednu grupu.. i sl.)



EKSPERIMENTI S VIŠE FAKTORA

Faktor je pojedina varijabla tretiranja (nezavisna) čiji nas učinak na zavisnu varijablu zanima. Ukoliko eksperiment testira učinak više faktora, onda ima **faktorijalni dizajn**. Učestalo vidimo **interakciju više faktora – učinak jedne varijable utječe na učinak druge**

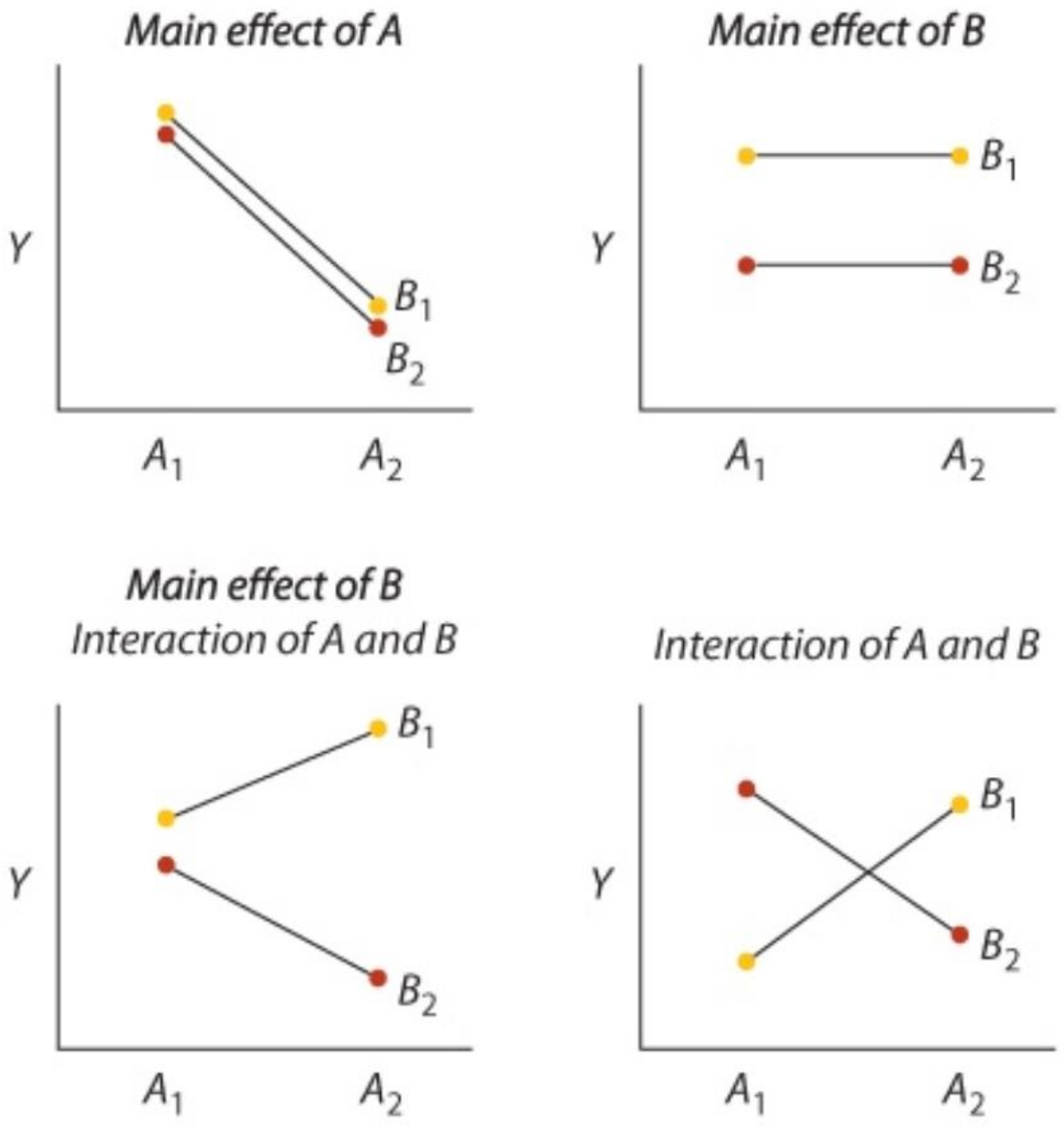


Figure 18.3-1
Whitlock et al., *The Analysis of Biological Data*, 2e, © 2015 W. H. Freeman and Company

TABLE 18.3-1 ANOVA results of fitting the two-factor model to the herbivory data.

Source of variation	Sum of squares	*df*	Mean square	*F*	*P*
HERBIVORY	1,512.18	1	1512.18	6.36	0.014
HEIGHT	88.97	1	88.97	0.37	0.543
HERBIVORY*HEIGHT	2,616.96	1	2616.96	11.00	0.002
Residual	14,270.52	60	237.84		
Total	18,488.63	63			

učinak herbivora na rast (površinu) crvene alge u dva pojasa u zoni plime i oseke

značajna je interakcija dva faktora!

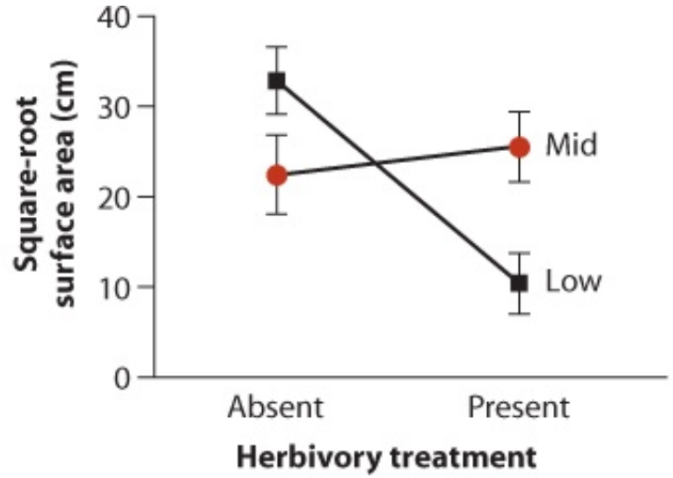


Figure 18.3-2
Whitlock et al., *The Analysis of Biological Data*, 2e,
© 2015 W. H. Freeman and Company

FIGURE 18.3-2 Mean surface area of algae at every combination of treatments.

Ugniježđeni dizajn

Ugniježđeni (nested, hijerarhijski) dizajn – razine jednog faktora su različite unutar svake razine drugog faktora

Tablica 3.8 Prikaz svih kombinacija dvofaktorskog pokusa s ugniježđenim faktorom.

A_1				A_2				A_3			
B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6	B_7	B_8	B_9	B_{10}	B_{11}	B_{12}
A_1B_1	A_1B_2	A_1B_3	A_1B_4	A_2B_5	A_2B_6	A_2B_7	A_2B_8	A_3B_9	A_3B_{10}	A_3B_{11}	A_3B_{12}



LOKALITET
STABLO



- npr. dimenzije listova na tri lokaliteta, na svakom lokalitetu 4 stabla – učinak stabla ugniježđen je unutar učinka lokaliteta