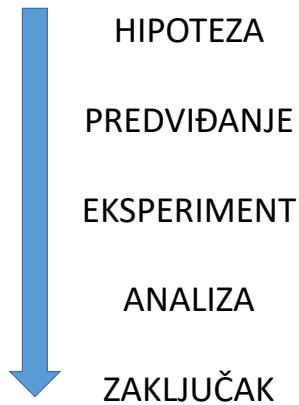
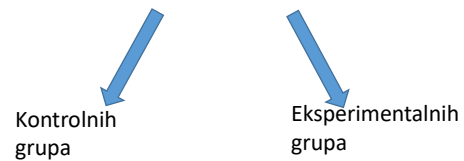


Testiranje hipoteze



Dobro dizajniran eksperiment

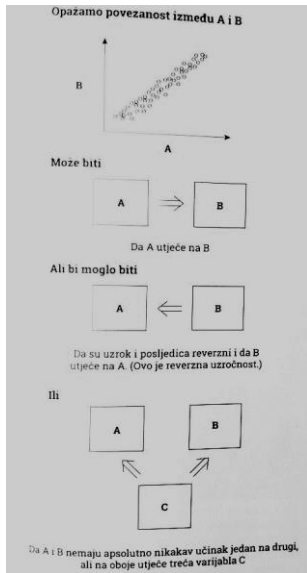
- Ponovljiv
- Uključuje replikate
- Uključuje nezavisne (tretman, okolnost) i zavisne varijable (posljedica, pojava)



Prirodni vs. Kontrolirani eksperiment

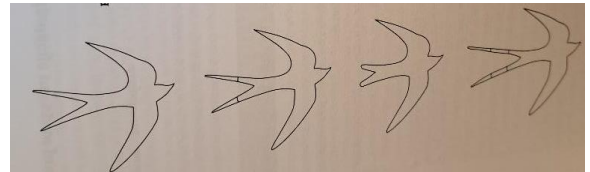
- Korelacijsko istraživanje (mjernim eksperimentom ili opažajno)
 - sustav se ne mijenja
 - uobičajeno su jednostavnija pa znače „manje posla”
 - manje su rizična za provedbu
 - 3 važna problema: „korelacija nije kauzacija”, problemi su tzv. **treća varijabla i reverzna uzročnost**
 - takva istraživanja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

„Treća varijabla” i reverzna uzročnost



- U gotovo svakom korelacijskom istraživanju postoji potencijalna „treća varijabla” koju nismo izmjerili, a koja može biti uzrok povezanosti koju primjećujemo
- Pouzdanost podataka može se stoga donekle povećati mjerenjem nekih najvjerojatnijih „trećih varijabli”, ali
- JEDINI način koji osigurava uklanjanje problema „treće varijable” jest izvođenje eksperimentalne manipulacije, koja također zaobilazi i problem reverzne uzročnosti (budući da tijekom pokusa manipuliramo eksperimentalnom varijablom)

H: dugi repovi ptica razvili su se evolucijski kako bi mužjaci bili privlačniji



Korelacijski: odaberemo lokalitet na kojem lovimo ptice, mjerimo im dužinu pera i prstenujemo u različite kategorije prema duljini pera. Pratimo im aktivnost parenja tijekom sezone

Manipulativni: odaberemo lokalitet na kojem lovimo ptice, te ih kategoriziramo u kategorije. U jednoj kategoriji su one kojima smo podrezali repove, u drugoj bi bile ptice kojima bismo pera produljili odrezanim ostacima prve kategorije. Prstenujemo ih u kategorije

Kontrolna grupa bila bi?

Ptice podrezanih pera kojima bismo odrezane dijelove vratili

Prednosti: proučavamo prirodni sustav i radimo s relevantnom populacijom koju nismo mijenjali

Nedostaci: što ako je dužina repa posljedica bolje prehrane a ženke su privučene snagom (veza između kvalitete teritorija i parenja, treća varijabla neće biti primjećena)

Prednosti: potpuna kontrola duljine pera

Nedostaci: rezanje pera može osim direktno na privlačnost utjecati i na sposobnost letenja pa samim time ptice gube atraktivnost

Čak i ako se provede genetičke modifikacije treba osigurati da nema nekih dodatnih efekata

Što ako smo pera skratili ili produljili na duljine koje ne postoje u prirodnoj populaciji?

H: količina prodanog sladoleda povezana je s porastom smrtnosti od utapanja

- Ako uočimo povezanost postoji li sumnja u treću varijablu?

NUŽNO JE POZNAVANJE SUSTAVA I/ILI KOMBINACIJA KORELACIJSKIH I MANIPULATIVNIH ISTRAŽIVANJA

Evolucijski biolog i strastveni pušač lule Ronald Fisher tvrdio je (o povezanosti pušenja i bolesti) da pušenje ne uzrokuje bolesti već da je stres treća varijabla koja uzrokuje da ljudi puše a i podložnost bolesti

Postoji li sumnja na treću varijablu u potvrdi hipoteze

da štakori sa više crijevnih parazita imaju manju masu (ulovljeni na terenu)

Postoji mogućnost treće varijable u dostupnosti pojedine vrste hrane, a neka je hrana lošija i pogodnija za razvoj parazita...

Unatoč tome, treća varijabla u ovom slučaju ne isključuje mogućnost izravnih učinaka parazita na masu

Nužnost kombinacije korelacijskog i manipulativnog istraživanja

- HIPOTEZA
- PREDVIĐANJE
- TESTIRANJE HIPOTEZE
- KORELACIJSKA I MANIPULATIVNO TESTIRANJE
- TREĆA VARIJABLA, ZBUNJUJUĆI ČIMBENIK

Varijabilnost
Klasifikacija
Uzorkovanje
Replikacija (replikati)
Veličina uzorka
Statističko testiranje hipoteze
Kontrole
(Ne)Balansirani uzorak
Ljudi kao ispitanici

Varijabilnost kao glavni problem zbog koje eksperiment mora biti planiran

- **Slučajna, randomizirana varijabilnost kao karakteristika bioloških sustava**



Varijabilnost

- Varijabilnost je pravilo u biologiji (varijabilnost veličine tijela, prirasta u bakt. kulturi i sl..) a uzroci varijabilnosti su brojni (dostupnost hranjiva, pogodan šećer u podlozi, soj, porijeklo...)
 - Varijabilnost uzrokovana faktorom od interesa
 - Slučajna varijabilnost ili buka
- Onemogućuje donošenje zaključaka na temelju pojedinačnih slučajeva

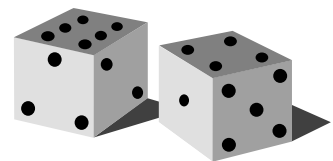
Varijabilnosti

- Samo jedan tip uzročnosti nas zanima 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

POSTOJE RAZLIČITE METODE VEZANE ZA UZORKOVANJE npr. KLASIFIKACIJA

Kada klasifikacija prethodi uzorkovanju



- Klasifikacija - raspoređivanje predmeta, pojmova i pojava u klase na temelju njihovih općih karakteristika

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

Bilo bi idealno ali nepraktično istraživati svakog pojedinog člana populacije (klase)

- U pravilu istraživanje se vrši na dijelu klase
→ **Pristupa se uopćavanju (indukcija i generalizacija) na temelju svojstava manjeg broja jedinki koje pripadaju toj klasi (ili populaciji).**
- Zbir jedinki (članova) koji čini dio klase zove se **uzorak** dotične klase, a sam postupak odabira uzorka naziva se **uzorkovanje**.

Populacija i uzorak

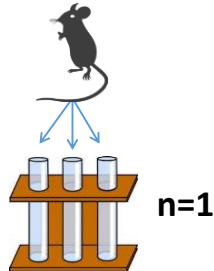
- Populacija: definiran set elemenata ("sampling units") o kojem želimo nešto zaključiti
- Uzorak: skup pojedinaca preuzet iz populacije, replikati, pokusne jedinice

Replikati

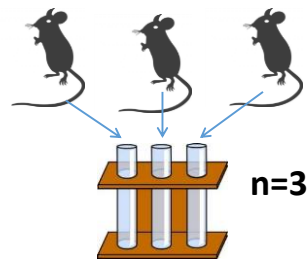
- = pokusne jedinice/jedinice
- Replikacijom rješavamo interindividualne varijacije koje su prisutne zbog tzv. slučajnih razlika
- Replikati su način na koji poništavamo utjecaj biološke varijabilnosti među jedinkama, i zavisnost mjerene varijable povezujemo s nezavisnom
- Čim imamo više mjerenja (replika), 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)

- Važno je razlikovati tehničke i biološke

Tehničke



Biološke



Provođenjem tehničkih replika kao da su biološke uvodimo najgoru pseudoreplikaciju

Pseudoreplikati

- Najčešći uzroci:
 - Srodnost (blisko srodne vrste su sličnije jedne drugima jer više dijele evolucijsku povijest, srodne jedinice 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
- Najbolji način izbjegavanja izvora pseudoreplikacije:
 - RANDOMIZACIJA – slučajan (nasumičan) odabir, ili kritičko promišljanje i odabir neovisnih replika, randomizacija je moguća i na drugim razinama

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

Pitanje: 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 koju 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 sunčanija itd...)

Nastambe se mogu međusobno razlikovati na razinama kojih nismo svjesni

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

Pitanje: Jesu li jeleni koji se hrane u šumi opterećeniji parazitima od onih koji se hrane na livadi (**različita staništa**)

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

Pitanje jeli 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 pseudoreplikata prethodnog mjerenja.

Procjenjujemo rast bakterija na LB podlozi s i bez antibiotika, mjerenjem stope rasta kolonija

- Imamo jednu petrijevku s antibiotikom i jednu bez, te na svakoj odredimo stopu rasta (povećanje kolonije) za 100 kolonija
- Imamo li tu pseudoreplikaciju?

Kako bi bilo pravilno?

Jesmo li sigurni da su dvije petrijevke po svemu drugom identične? Razlike među petrijevkama čine kolonije pseudoreplikatima te uvode zbunjujući faktor i treću varijablu.

Rj: Na 100 ploča s antibiotikom i na 100 bez antibiotika mjeriti po jednu koloniju

Učinak kohorte - izvor pseudoreplikacije

- Istraživanje koordiniranosti ruku u muškaraca od 20 god. (1 kohorta) i 40 god. (2 kohorta) pokazalo je da su koordiniraniji 40-godišnjaci.
- U ovakvim kohortama postoje brojni zbunjujući čimbenici, npr. poslovi koje rade 40-godišnjaci su češće fizički a oni koje rade 20-godišnjaci uredski
- **AKO ISTRAŽUJETE UČINKE RAZVOJA MORATE VODITI BRIGU O UČINKU KOHORTE KAO IZVORA PSEUDOREPLIKACIJE**
- Alternativa je longitudinalno (kroz vrijeme od 20 godina) istraživanje unutar 1 skupine, a najčešće kombinacija i jednog i drugog

Kohorta (lat. *cohors* - skupina, mnoštvo) je svaka skupina pojedinaca sa zajedničkom osobinom.

- 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!)

Kako umanjiti negativnosti pseudoreplikacije koje nismo svjesni?

RANDOMIZACIJA

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

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 **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

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 veci a neki su brži i to će utjecati na redosljed 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

Nasumično uzorkovanje (randomizirano)



- 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

Randomizacija pomoću računala

Randomiziran uzorak nije nužno reprezentativan

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

Izbor uzorka

- Osigurati uvjete u kojima će se eksperiment izvoditi na stvarno reprezentativnom uzorku klase. To nije lako i pogreška može pokvariti čitav pokus.
- Priroda uzorkovanja određuje uspješnost ili promašaj u indukciji i generalizaciji.

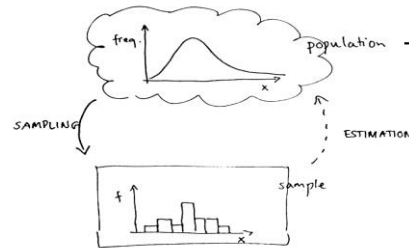
Populacija i uzorak

- 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

Nasumično uzorkovanje je najčešće u laboratorijskim istraživanjima

Iznimke od nasumičnog uzorkovanja

- Često u terenskim i biomedicinskim istraživanjima

Stratificirani (slojeviti) uzorak

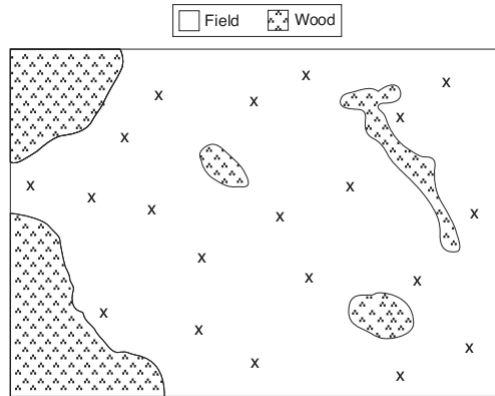
- Kad je potrebno da se populacija, po nekim značajkama, podijeli na grupe ili slojeve i da se iz svake grupe uzme nasumičan uzorak.
- Primjer: Proučavanje neke bolesti
(Stanovništvo se podijeli na grupe - po starosti, načinu života, društvenom statusu, vrsti zanimanja)
- Veličina svakog uzorka treba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

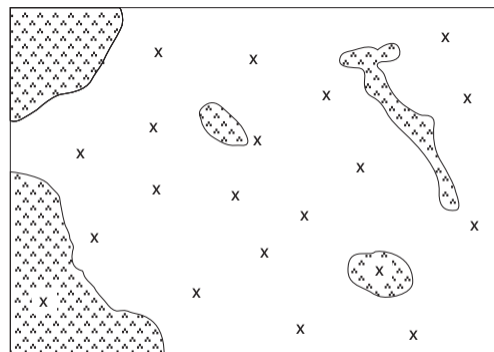
- npr. Treba odrediti broj moljaca u nekoj nizini. Nizina se sastoji od otvorenih polja i šuma. Šume se mnogo rjeđe.

Nasumičnim uzorkovanjem može se dogoditi da uopće ne zahvatimo šumu.



20 traps distributed randomly. (Notice that by chance none ended up in a wood, which makes up 10% of the area.)

- 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

Sistematsko uzorkovanje prihvatljivo je jedino kada smo sigurni da nema apsolutno nikakve "uređenosti" unutar klase nad kojom se provodi

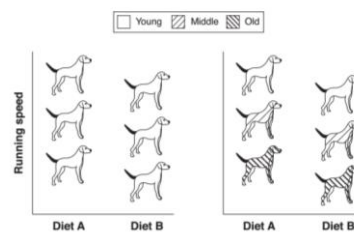
Statističke analize podrazumijevaju nasumično uzorkovanje a sustavno nije uvijek jednako nasumičnom

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

Primjer grupiranja (blocking)

- 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?
- 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 blokirajući faktor,**
 - 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

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

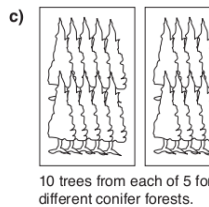
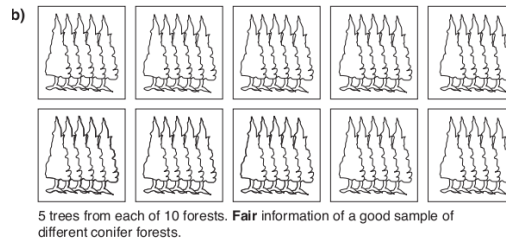
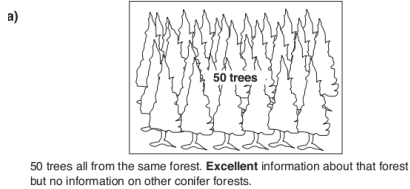
- Mogućnost 2: 10 šuma svake vrste i po 5 stabala

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



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

Kako odrediti razinu tretmana?

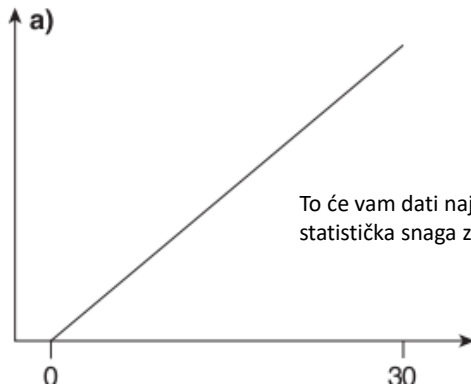
- Npr. Želite odrediti efekte djelovanja gnojiva na stopu rasta rajčice i imate na raspolaganju 30 biljaka.
- Kako bi proveli eksperiment?

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?

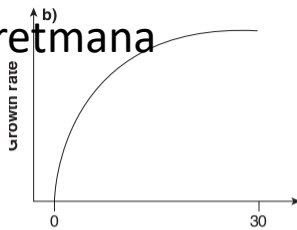
- Pretpostavka 1) znate da su efekti na stopu rasta linearni s količinom gnojiva i želite saznati koja je brzina porasta



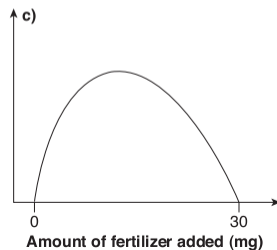
To će vam dati najbolju procjenu nagiba, a također najveća statistička snaga za otkrivanje razlika između tih skupina

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

Potreba za većim brojem tretmana



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

Određivanje razine tretmana

- Uvijek uvrstiti neke međuvrijednosti ako se ne zna kakav je odnos