



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Experimentální design

Klára Hilscherová

RECETOX, Přírodovědecká fakulta MU Brno



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Typy empirických studií v ekotoxikologii

- pozorovací studie - pozorování objektů a měření proměnných, bez pokusného zásahu
- experimentální studie (intervenční studie) – studium účinků specifických pokusných zásahů, které nás zajímají. Můžeme kontrolovat prostředí pokusného zásahu, a držet na konstantní úrovni faktory, jejichž vliv nás momentálně nezajímá, ale které by mohly ovlivnit výsledky

Vysoké náklady (na čas, materiál, práci, etické aspekty) – každý experiment by měl získat co možná nejvíce informací k zodpovězení studované otázky



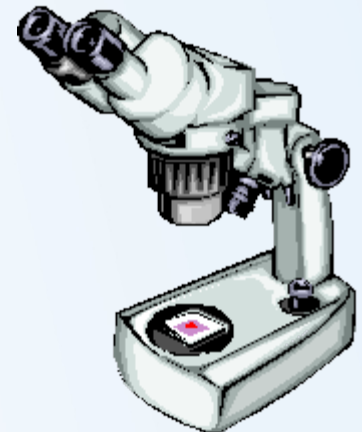
Pozorovací studie

- deskriptivní studie
 - kazuistiky
 - korelační studie (porovnávají se populace)
 - průřezové studie (cross-sectional study) (porovnávají se jedinci ale jen jednorázově)
- analytické studie
 - studie případů a kontrol (case-control study) porovnává se exponovaná skupina a skupina kontrol
 - kohortové studie (longitudinální) – stejné objekty se vyšetřují opakovaně a pátrá se po důsledcích případné expozice určitému faktoru (retrospektivní i prospektivní uspořádání)



Základní etapy v experimentální práci

- Stanovení cíle (přesně definovat otázku)
- Výběr vhodné metody (technické řešení)
- Vypracování projektu (kdy, kde, kdo, jak...)
- Technická příprava studie (prostředky, protokoly)
- Pilotní studie (proveditelnost, možná úskalí, N)
- Modifikace projektu
- Vlastní studie (protokoly a pracovní deník)
- Vyhodnocování výsledků (statistika, vedlejší výsledky, interpretace výsledků)



Experimentální design

= protokol zahrnující kompletní plán experimentu i hodnocení dat

Toxikologické studie - dva základní cíle:

1. Zjistit, zda studovaný faktor (chemická látka) způsobuje nějaký účinek ve studovaném biologickém systému
2. Zjistit, jak je tento účinek velký/ významný

Objekty zkoumání = **experimentální jednotky**

- sledován vliv různých faktorů na experimentální jednotky

pokusný zásah = kombinace specifické hodnoty všech faktorů, které mohou potenciálně odpověď ovlivňovat



Nezávislá proměnná



Proměnná, která je záměrně měněna experimentátorem
(stimul, podnět)

Závislá proměnná



Proměnná, která charakterizuje odpověď - reakci na podnět

Sleduji vztah mezi testovanými faktory /**nezávislé proměnné** – např.koncentrace/ a proměnnými, které charakterizují účinek /**závislé proměnné**/ - odpověď v závislosti na působení toho faktoru

Typy sledovaných parametrů: spojitě

diskrétní /mohou nabývat jen určitých hodnot,
kategorií – např. pohlaví – žena/muž



Základní požadavky experimentálního designu

Reprezentativnost (zobecnitelnost výsledků)

Homogenita souboru (zvyšuje sílu testu)

Základní otázka:

Co jsou cíle a hypotézy studie, jaké otázky chceme zodpovědět?

Stanovení cílů studie (Objectives, Goals) – zjistit, zda.....

Stanovení hypotézy

- Hypotéza = tvrzení, domněnka, jejichž pravdivost se ověřuje pomocí experimentu
- Jaké nové otázky mohou vyplynout z výsledků studie? Mohla by být ta studie uspořádaná tak, aby tyto otázky rovnou zodpověděla?
- **Nulová hypotéza**
= žádný rozdíl mezi kontrolami a pokusným zásahem
- **Alternativní /výzkumná/ hypotéza**
= pokusný zásah způsobuje významný rozdíl mezi skupinami
- **P menší než 0,05**
= **pravděpodobnost pravdivosti nulové hypotézy je menší než 5% - zamítáme nulovou hypotézu, platí alternativní hypotéza**



V Graf

Nezávislá proměnná/
Nezávislé proměnné

Závislá proměnná/
Závislé proměnné

+ sloveso

+ sloveso

Pokud **nezávislá proměnná** + sloveso,

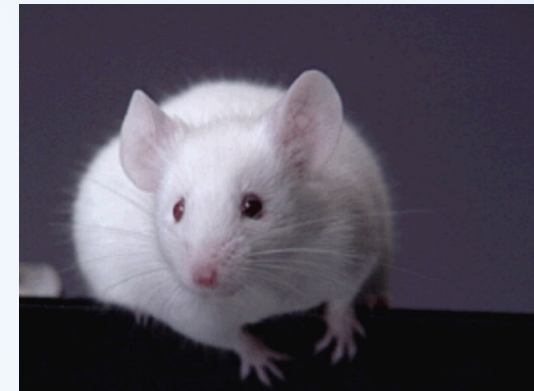
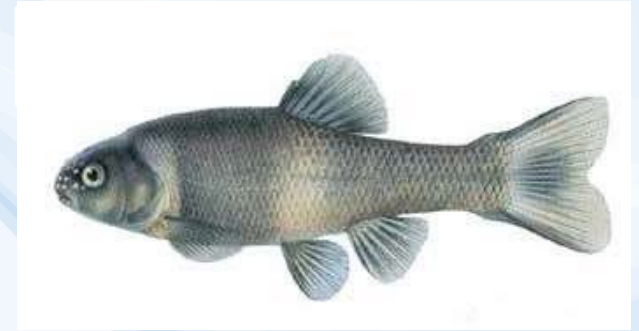
pak **závislá proměnná** + sloveso.

hypotéza



Organismy v testech ekotoxicity

- Základní kritéria
 - Snadný laboratorní chov – homogenní populace - opakovatelnost
 - Běžné – dostupné - ?reprezentativní
 - Známý životní cyklus
 - Levné
 - S krátkou dobou života



Uspořádání studie

- **Jednoduché a komplexní uspořádání**
 - jedna studie - jeden faktor? (Interakce!)
- **Základní a pokusný soubor**
 - reprezentativnost (zobecnitelnost výsledků)
 - homogenita souboru (zvyšuje sílu testu)
- **Kontroly**
 - randomizace - rozdělování objektů do skupin
 - placebo, slepý pokus, dvojnásobně slepý pokus, otevřený pokus
 - velikost vzorku kontrol – maximálně 1 : 5, jinak exaktní či randomizační testy
 - párování kontrol a případů (párové testy jsou silnější)



Základní principy experimentálního designu

1. **Kontrola** účinků **vnějších** /nestudovaných/ **faktorů** – kontrolní skupina
2. **Náhodnost** alokace organismů do pokusných a kontrolních skupin
3. **Opakování** a opakovatelnost
 - Pokud chci studovat vliv jednoho faktoru /jako koncentrace, doby expozice/ = nutno kontrolovat všechny další proměnné, které by mohly odpověď ovlivnit
 - jeden faktor jedna úroveň = vliv jedné koncentrace po určitém čase
 - většinou testováno několik úrovní sledovaného faktoru
 - Často stanovujeme vliv více faktorů současně = vícerozměrný design = vliv koncentrace na růst řas proměřovaný v čase, další parametry = intenzita záření, teplota



Pokusné a kontrolní skupiny

- porovnání exponované a kontrolní skupiny ze stejné výchozí populace = stejné organismy /buňky/ za stejných podmínek, liší se jen expozicí
- vždy je nutno do pokusu zahrnout všechny adekvátní kontroly
- negativní a pozitivní kontroly

- **Negativní kontroly**

= blanky bez jakéhokoli zásahu

= kontroly se slepým pokusným zásahem

= všechny rozpouštědlové kontroly

= pokud kombinace rozpouštědel - všechny kombinace

Když opakované experimenty prokáží, že používané rozpouštědlo nemá v používané koncentraci žádný vliv na sledované parametry, je možno nadále používat pouze rozpouštědlovou kontrolu.

- **Pozitivní kontroly, Standardy**

- **Pokusné zásahy**

= různé úrovně pokusného zásahu, různých testovaných faktorů

= případně spárování kontrol a případů /párové testy jsou silnější/



Náhodná alokace organismů z populace do kontrolních a pokusných skupin – před zásahem všechny skupiny stejné = abychom se vyhnuli zkreslení výsledků kvůli rozdílnosti pokusných skupin.

Opakování experimentu na větším počtu objektů ke snížení náhodného rozptylu výsledků

- experimentální jednotky = jednotlivá opakování experimentu – např. ryby v sinicové expozici
- opakování pokusného zásahu
- pokud třikrát opakují měření mikrocystinu nebo biomarkeru v hepatopankreatu ryby – je to pouze opakování stanovení (technické opakování) pro lepší přesnost a pro stanovení opakovatelnosti měření (nejsou nezávislé hodnoty), ale není to opakování pokusného zásahu



Opakování pokusného zásahu na dostatečném počtu experimentálních jednotek, který umožní odhalení systematického účinku

počet opakování – pokud možno stejný ve všech skupinách -
stejný počet pozorování pro každou úroveň znaku

Pro maximalizaci síly testu je třeba maximalizovat počet nezávislých opakování – Power analysis

Dostatečná velikost pokusného souboru závisí na:

- variabilitě sledované veličiny
- počtu sledovaných nezávislých faktorů
- technických možnostech
- požadované míře jistoty
- velikosti očekávaného efektu
- Pozor na příliš velké soubory!



PRE-TESTY



Analýza síly studie (power analysis)

- Jak velký rozdíl chceme detekovat?
- Jak velký rozptyl sledovaného parametru je v populaci?
- Určení vhodné velikosti vzorku
- Interpretace negativního výsledku studie



- Umožňuje předem zvolit nebo zpětně kvantifikovat pravděpodobnost chyby II. druhu, tj. pravděpodobnost, že neodhalíme asociaci i když ve skutečnosti existuje.
- Obvykle se považuje za rozumnou hodnota 80%.



Součásti experimentálního designu I.

- **Cíle** studie – co chci zjistit a jak to chci zjistit
- Stanovení nulové **hypotézy** a alternativní /výzkumné/ hypotézy
- Jaký pokusný zásah, jaké **faktory** /**nezávislé proměnné**/, jejichž účinky na experimentální jednotky budou sledovány
- Jaké **sledované parametry** /**závislé proměnné**/, jejichž odpověď na různou úroveň testovaných faktorů budeme sledovat **v jakých časech**
- Přesné **podmínky expozice**
- Naplánování **počtu opakování** a jejich uspořádání v experimentu



Součásti experimentálního designu II.

- **KONTROLY** - zařazení všech nezbytných **kontrol** /pre-test/
- Úroveň studovaného pokusného zásahu – všech faktorů
- Expozice čistou chemickou látkou : koncentrace v zásobních roztocích a pak finální koncentrace v expozici /molární konc./
- nutno znát rozpustnost ve vodě, nesmí být v testu překročena
- Standard /pozitivní kontrola/ - zahrnutí vhodných hodnot standardu
- **Časový design experimentu** – na více časových intervalech v závislosti na charakteru odpovědi, případně optimalizovat dobu expozice



Součásti experimentálního designu III.

- Pokud není hodnocení provedeno přímo po ukončení expozice, určit jak připravit a uchovávat vzorky před analýzou, jak jsou vzorky/standarty/reagenty při daném uchovávání stabilní
- Optimalizovaná metodika měření sledovaných parametrů v odpovědi na expozici /optimalizace předem/
 - koncentrací reagentů
 - množství vzorku
 - doby a teploty inkubace
 - podmínek měření apod.
- Vícefaktorové uspořádání: vliv koncentrace za různých světelných či tepelných podmínek při různých dobách expozice
- Jak budou získaná data hodnocena



Nezbytnost a výhody experimentálního designu

- důkladné promyšlení a naplánování experimentu
- snadná návaznost dalších experimentů – přesně popsány všechny podmínky – pro navazující experimenty netřeba přepisovat, jen překopírovat, doplnit a zvýraznit změny
- přehlednost, snadné dohledání důležitých informací
- výborně využitelné i po delší době pro psaní publikací a pod.
- snadné doplňování, zapisování změn – k designu je nutné doplnit krátký report o průběhu experimentu, pokud něco významného oproti designu – např. velká změna pH nebo teploty apod.
- odkazem možno propojit design na soubor s výsledky





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem
České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí