

Laboratuvar Hayvanlarının Kullanıldığı Özel Deney Tasarımları ve Örneklem Hacmi

Special Experimental Designs Using Laboratory Animals and Sample Size: Review

Şengül CANGÜR,^a
Handan ANKARALI,^a
Seyit ANKARALI^b

^aBiyostatistik ve Tıbbi Bilişim AD,
^bFizyoloji AD,
Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Düzce

Geliş Tarihi/Received: 27.09.2012
Kabul Tarihi/Accepted: 14.11.2012

Bu makale Uluslararası Katılımlı
XIV. Ulusal Biyoistatistik Kongresi
(4-7 Eylül 2012, Kayseri)'nde sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:
Handan ANKARALI
Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Biyostatistik ve Tıbbi Bilişim AD, Düzce,
TÜRKİYE/TURKEY
handanankarali@duzce.edu.tr

ÖZET Laboratuvar hayvanlarının kullanıldığı biyomedikal çalışmalarda bilimsel amaçlara ulaşabilmek için uygun deney tasarımı ve örneklem hacmine karar verme işlemi etik, ekonomik ve bilimsel açıdan önem taşımaktadır. Bu çalışmada laboratuvar hayvanlarının yer aldığı araştırmalarda kullanılan Change-over, Cross-over, Switchback, Reversal ve Latin kare tasarımları gibi özel deney tasarımları kısaca tanıtarak avantajlarından bahsedilmiş ve bu tip denemelerde yer alması gereken minimum denek sayısının nasıl belirlenebileceği konusu üzerinde durulmuştur. Laboratuvar hayvanları ile yapılan araştırmalarda kullanılan özel deney tasarımları simüle örnekler üzerinde kısaca tanıtılmıştır. Ayrıca uygun denek sayısına karar verirken veri yapısı, tasarım türü ve denek türü gibi faktörleri de dikkate alarak kaynak eşitlik yöntemi, güç analizi ve diğer pratik yaklaşımlar açıklanmıştır. Laboratuvar araştırmalarında özel deney tasarımlarının bilimsel açıdan daha gerçekçi tahminler ürettiği ve gerekli denek sayısını da en aza indirdiği vurgulanmıştır. Ayrıca etik sorunların getirdiği kısıtlamalar da dikkate alındığı zaman, laboratuvar hayvanları ile yapılan araştırmaların farklı yer, zaman ve koşullarda tekrar edilmesi ve aynı konu üzerinde yapılan araştırmaların sonuçlarının ise meta analizi ile birleştirilmesi gerekliliği açıklanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Laboratuvar hayvanları; cross-over; örneklem hacmi; latin kare denemeleri

ABSTRACT To achieve the scientific objectives in biomedical studies using laboratory animals, decision-making procedure of the appropriate experimental design and the sample size is important ethics, economic, and scientific. In this study, the special experimental designs such as Change-over, Cross-over, Switchback, Reversal and Latin square designs used in research involving laboratory animals have briefly introduced and their advantages are referred, and it is dwelled upon how the necessary minimum number of subject will be identified in the type of this experiments. The special experimental designs used in researches with laboratory animals have been briefly summarized on the simulated examples. In addition, when deciding the number of appropriate subjects, it is described to resource equation method, power analysis, and other practical approaches also taking into account factors such as data structure, the type of design and subject. In laboratory researches, it is emphasized that the special experimental designs produce scientifically more realistic estimates, and also minimize the needed number of subjects. Furthermore, when considering the restrictions imposed by the ethics problems, it is explained which the researches with laboratory animals are repeated in different the place, time, and conditions, also and the necessity of merging the results of the researches on the same topic by the meta-analysis.

Key Words: Laboratory animals; cross-over; sample size; latin square experiments

Türkiye Klinikleri J Biostat 2013;5(2):75-88

Deney planlama aşaması her araştırma için hayati önem taşıyan aşamalardan bir tanesidir. Bu aşamada uygun deney planı seçilir ve buna uygun istatistik model belirlenir. Laboratuvar hayvanlarının kullanıldığı biyomedikal çalışmalarda bilimsel amaçlara ulaşabilmek için

uygun deney tasarımı ve örneklem hacmine karar verme işlemi etik, ekonomik ve bilimsel açıdan önem taşımaktadır.¹ Deneyin uygun bir şekilde tasarlanmasında etkili olan etkenlerin (deney birimi, denek cinsi, deneyin tekrar sayısı, randomizasyon, körleme vb) iyi tanımlanması, bilimsel sonuçların doğruluğunu arttıracak ve biyolojik önemin yorumlanmasını kolaylaştıracaktır.^{2,3}

Az denekle çalışılan veya çalışılmak zorunda kalınan araştırmalara özgü geliştirilmiş ve özellikle sağlık alanında çalışan birçok araştırmacının aşına olmadığı özel deney tasarımları mevcuttur. Tıbbın farmakoloji, fizyoloji, psikiyatri ve patoloji bilim dalları başta olmak üzere birçok alanında laboratuvar hayvanları üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Kronik hastalıklar, öğrenme veya davranış problemlerini inceleyen laboratuvar araştırmalarında daha az denekle daha güvenilir sonuçlar elde etmek için klasik olarak kullanılan deney tasarımlarının yerine, Change-over, Cross-over, Switchback, Reversal denemeler, çeşitli latin kare tasarımları gibi özel tasarımlardan yaygın bir şekilde yararlanılabilir. Bu tasarımlar farklı gözlem zamanlarında aynı deneklerin tekrarlı ölçümleri doğrultusunda tasarlandığından deney kaynaklarının daha etkili kullanımını sağlamaktadır.⁴ Özellikle diğer deney tasarımlarına göre daha az sayıda denekle çalışılabilmesi avantajını kullanırken, randomizasyonu olumsuz yönde etkilememesi için deney hayvanlarının özellikleri (cinsiyet, yaş, ağırlık, cins, vb bilgileri) doğrultusunda seçim yapılmalı³⁻⁵ ve her bir tasarım için minimum düzeyde gerekli denek sayısına karar verilmelidir.⁶ Bu aşamada özellikle hayvan deneylerinde önemli sayılan “3R kuralı” (replacement, reduction, refinement) dikkate alınmalıdır.^{6,7} Biyoetik kuralları arasında geçen bu kurallardan replacement (yerine geçirme) mümkün olduğu kadar alt sınıf hayvan kullanmayı hatta mümkünse bilgisayar simülasyonu gibi yöntemler kullanmayı; reduction (azaltma) denek sayısını mümkün olduğunca düşük tutmayı; refinement (arındırma) yöntemin olumsuz yönlerini azaltma ve verimliliği artırmayı ifade eder.

Bu çalışmada laboratuvar koşullarında ve özellikle hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda 3R

kuralını karşılamada da faydalı olacak daha etkin, daha ucuz ve daha güvenilir sonuçlar elde etmek için kullanılabilir ve tıp literatüründe sık rastlanmayan özel deney tasarımlarından kısaca bahsedilerek, bu araştırmalarda uygun denek sayısını belirlemede kullanılabilir yaklaşımlar açıklanacaktır.

CHANGE-OVER DENEY TASARIMLARI

Change-over deney tasarımları, aynı deneğin farklı periyotlarda değerlendirildiği, iki ya da daha fazla işlemin yer aldığı ve işlemlerin aynı denek üzerinde değiştirildiği tasarımlardır. Bu tasarımlarda her bir denek, blok olarak kullanılabilen ve işlem sırası, rasgele olarak yapılmaktadır.⁸⁻¹²

İki işlemler ve iki periyotlu basit change-over deney tasarım örneği Tablo 1’de verilmiştir. Bu tasarımda denekler başlangıç periyodunda, rasgele olarak iki gruba ayrılır. Birinci gruptaki deneklere birinci işlem, ikinci gruptaki deneklere ise ikinci işlem uygulanır. Daha sonra ikinci periyoda geçilir ve birinci gruba ikinci işlem, ikinci gruba da birinci işlem uygulanarak işlem sırasından kaynaklanacak etki incelenmiş olur. İşlemler arası etkileşim veya işlemlerin gizli etkilerinin söz konusu olabileceği düşüncesiyle işlem uygulanan periyot sonunda denekler için arındırma periyodu (wash-out period) verilebilir. Ancak arındırma periyodu süresince deneklerden alınan ölçümler kullanılmaz (Tablo 1).^{8,10}

Örneğin;

1) Damarıçi uygulanan iki kimyasal maddenin (A ve B maddesi) sıçanlarda kalp atım hızına etkisinin araştırıldığı varsayalım. Klasik (paralel) deney tasarımlarında verilecek her madde için ayrı bir grup (A ve B grubu) oluşturulur. Bu tasarım için örnek genişliği 12 olarak hesaplanmış ise 2 madde

TABLO 1: İki işlemlerli (A, B) ve iki periyotlu basit change-over deney tasarımı.

| Periyotlar | İşlem Grupları | |
|------------|----------------|---|
| | 1 | 2 |
| 1 | A | B |
| 2 | B | A |

TABLO 2: Change-over deney tasarımı.

| | Denek | | | | | | | | | | | |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|
| | Sıçan 1 | Sıçan 2 | Sıçan 3 | Sıçan 4 | Sıçan 5 | Sıçan 6 | Sıçan 7 | Sıçan 8 | Sıçan 9 | Sıçan 10 | Sıçan 11 | Sıçan 12 |
| Periyot 1 | A | A | B | B | A | A | B | B | A | A | B | B |
| Periyot 2 | B | B | A | A | B | B | A | A | B | B | A | A |

A madde grubu (işlem sırası: AB): 1, 2, 5, 6, 9, 10 nolu sıçanlar; B madde grubu (işlem sırası: BA): 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12 nolu sıçanlar

TABLO 3: Change-over deney tasarımı.

| | Denek | | | | | | | | | |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|
| | Sıçan 1 | Sıçan 2 | Sıçan 3 | Sıçan 4 | Sıçan 5 | Sıçan 6 | Sıçan 7 | Sıçan 8 | Sıçan 9 | Sıçan 10 |
| Periyot 1 | A | A | T | T | A | T | T | A | A | T |
| Periyot 2 | T | T | A | A | T | A | A | T | T | A |

Atipik antipsikotik madde grubu (işlem sırası: AT): 1, 2, 5, 8, 9 nolu sıçanlar

Tipik antipsikotik madde grubu (işlem sırası: TA): 3, 4, 6, 7, 10 nolu sıçanlar

için toplam 24 deneye ihtiyaç duyulur. Buna karşın söz konusu deneyde change-over deney tasarımının kullanımında bir sakınca yok ise toplam 12 denekle deney tamamlanabilir. Bu denemede, toplam 12 sıçan alınmış ve iki ayrı periyot için rasgele olarak seçilen 6 sıçana önce A sonra B maddesinin uygulandığı AB işlem sırası diğer 6 sıçana ise önce B sonra A maddesinin uygulandığı BA işlem sırası seçilmiştir. Her bir periyot sonunda kalp hızı ölçülmüş ve iki işlem arasında 10 günlük bir arındırma periyodu bırakılmıştır. Bu denemeye ait change-over tasarımı Tablo 2'deki gibidir. Böylece denek sayısı 24'ten 12'ye düşmüş ve yarı yarıya azaltılmıştır. Ayrıca farklı denekler üzerinde denemek yerine aynı denekler üzerinde her iki maddenin etkisi de incelendiği için muhtemel biyolojik farkların etkisi de giderilmiş olur (Tablo 2).

2) Tipik (T) ve atipik (A) antipsikotik madde uygulanan sıçanlarda, madde uygulamasının “koşullu kaçınma tepkisi-CAR” üzerindeki etkilerinin araştırıldığı varsayalım. Rasgele olarak seçilen 10 sıçan, denek sayısı eşit olacak şekilde iki madde grubuna atanmıştır. 1. periyot sonunda CAR için yapılan test ve eğitim sonucunda sıçanlar, “kaçınma yanıtı” (10 sn içinde şartlı uyarıcıya yanıt) açısından incelenmiştir. Belirlenen bir arındırma periyodundan sonra atipik uygulanan sıçanlara tipik, tipik uygulanan sıçanlara da atipik antipsikotik uygulanmıştır. 2. periyotta sıçanlar aynı

test ve eğitimden geçirilmiş ve bu periyot sonunda da ilgilenilen değişken ölçülmüştür. Bu denemeye ait change-over deney tasarımı Tablo 3'te verilmiştir.

Bir change-over tasarımda istatistiksel model eşitlik (1)'deki gibi ifade edilir.¹¹

$$Y_{hijk} = \mu + \pi_h + \tau_i + \rho_j + \psi_k + \epsilon_{hijk} \quad (1)$$

$$h=1, \dots, p; \quad i, j=1, \dots, v; \quad k=1, \dots, n$$

Y_{hijk} , ($h-1$). periyotta j . işlemin uygulanmış olduğu ve h . periyotta ise i . işlemin uygulandığı k . denek biriminden elde edilen gözlemi gösterir. μ , genel ortalamayı π_h , h . periyodun etkisi ψ_k , k . denegin etkisi τ_i , i . işlem etkisi ve ρ_j ise j . işlemin artık etkisini ifade eder. ϵ_{hijk} ise ortalaması sıfır ve varyansı σ^2 olan normal ve bağımsız dağılımlı (NID(0, σ^2)) rasgele hata bileşenidir. İlk periyotta gözlemlerin tüm j değerleri için $\rho_j = 0$ 'dır.

Change-over deney tasarımı:

- Mali kısıtlılık nedeniyle her bir denegin birkaç test için kullanılması gerektiğinde,
- İşlem etkilerinin denekler üzerinde ciddi boyutta zarar verici etkisi olmadığına,
- Madde, beslenme, davranış ve öğrenme deneylerindeki gibi deneyin amaçlarından birinin, farklı ardışıkların etkisini ortaya çıkarmak olduğunda,

■ Bazı deneklere ulaşmak zor olduğunda kullanılabilir.^{11,13}

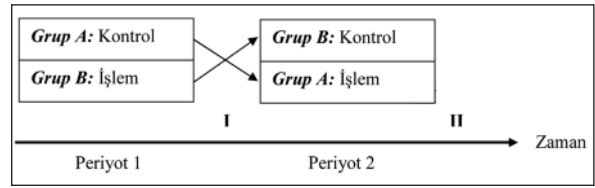
Change-over tasarımları, denekler arasındaki farkı, hata varyasyonundan elimine ettiği için işlem karşılaştırmalarındaki doğruluk derecesi artar. Tasarımın bu avantajı, özellikle modelin ölçemediği hata etkilerinden (artık etkiler) kaynaklanan olası komplikasyonlar olmadığında görülebilir. Artık etkilere bağlı ortaya çıkabilecek komplikasyonları engellemenin bir yolu, ardışık deney periyotları arasına *dinlenme periyodunun (rest period)* ya da arındırma periyodunun eklenmesidir. Ancak bazı durumlarda dinlenme periyodunun çalışmaya eklenmesi mümkün olmayabilir. Böyle bir durumda direkt ve artık etkilerin ayrımı, uygun işlem sırası izlenerek yapılacak deney tasarımı ile sağlanabilir.^{11,14}

Change-over tasarımının en basit türü, satırları periyotlardan, sütunları ise deney birimlerinden oluşan latin dikdörtgen formülü tasarımıdır. Taşıyıcı (carry-over) ya da artık (residual) etkiler yoksa ve işlem etkileri, periyotlar arasında değişkenlik gösteren deneysel koşullara sahip değilse change-over tasarımları yerine klasik latin kare tasarımları kullanılabilir.¹¹ Ancak taşıyıcı (ya da artık) etki sözkonusu olduğunda change over tasarımlarını, bir grupta yer alan denek sayısı kadar tekrarlayarak latin dikdörtgen formunda göstermek mümkündür. Bu durumda iki periyotlu ve periyot-işlem etkileşimini de içeren *Balaams tasarımı* kullanılabilir.¹²

CROSS-OVER DENEY TASARIMI

Sadece iki etkenin iki farklı periyottaki etkisinin (2x2) araştırıldığı change-over tasarımı, *cross-over tasarımı* olarak adlandırılır. Bu denemenin ana amacı, denekler arasındaki farklılıklarla ilgili herhangi bir etkiyi, işlem (ve periyot) etkisinden arındırmaktır. Eğer farklı işlemleri aynı denekler üzerinde denemek mümkün ise farklı denekler içeren grupları kullanmak yerine aynı deneklerden farklı periyotlarda ölçüm almak, işlem etkisi açısından daha doğru tahminler yapmayı sağlamaktadır.^{4,9,15,16} Şekil 1'de en basit cross-over deney tasarımı örneği verilmiştir.¹⁶

Bu tasarım için istatistiksel model eşitlik (2)'deki gibi verilebilir.



ŞEKİL 1: Cross-over deney tasarımı.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + c_k + \epsilon_{ijk} \quad (2)$$

$$i=1,2,\dots,t; \quad j=1,2,\dots,p; \quad k=1,2,\dots,c$$

Y_{ijk} , j . periyotta i . işlemin uygulandığı k . denneğin gözlem değerini gösterir. α_i , i . işlemin sabit etkisi β_j , j . periyodun sabit etkisi ve c_k ise $\sigma^2 c$ varyans bileşeniyle k . denneğin rasgele etkisini ifade eder. ϵ_{ijk} ise NID(0, σ^2) dağılımına uyan rasgele hata bileşenidir.¹⁷

Örneğin; Anjina pektoris tedavisinde kullanılan pronethalolun (Pr) plasebo (P) ile karşılaştırılması istenmektedir. Sıçanlar üzerinde yapıldığı varsayılan bu denemede rasgele olarak seçilen 10 adet sıçan, plasebo ve pronethalol grubu olarak ikiye ayrılmıştır. Bir haftalık süreç sonrasında atak sayıları ölçülmüş ve belirli bir dinlenme periyodu sonrasında da pronethalol uygulanan gruba plasebo, plasebo verilen sıçanlara da pronethalol ilacı verilmiştir. İlaç verildikten 1 hafta süre sonrasında her iki gruptaki sıçanların atak sayıları kaydedilmiştir. İlgili cross-over deney tasarımı Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tasarımın kullanım alanı ve avantajları

■ Biyolojik deneylerde ve Biyo-yararlanım (Bio-availability) çalışmalarında aynı denneğin farklı ölçümleri arasındaki değişkenliği ortaya çıkarmak için en çok kullanılan tasarımıdır.

■ İşlem sayısı az olduğunda (2 ya da 3) diğer tasarımlara göre daha uygundur.

■ Paralel grup tasarımı (aynı anda oluşturulan farklı denekler içeren benzer özellikli gruplar) için gerekli denek sayısının yarısından da az denek ile çalışılabilir.

■ Her bir denneğin kendi kontrolü olması model hatasını azaltır.

TABLO 4: Cross-over deney tasarımı.

| | Denek | | | | | | | | | |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|
| | Sıçan 1 | Sıçan 2 | Sıçan 3 | Sıçan 4 | Sıçan 5 | Sıçan 6 | Sıçan 7 | Sıçan 8 | Sıçan 9 | Sıçan 10 |
| Periyot 1 | Pr | Pr | P | P | Pr | Pr | P | P | Pr | P |
| Periyot 2 | P | P | Pr | Pr | P | P | Pr | Pr | P | Pr |

Pronethalol grubu (işlem sırası: Pr, P): 1, 2, 5, 6, 9 nolu sıçanlar; Plasebo grubu (işlem sırası: P, Pr): 3, 4, 7, 8, 10 nolu sıçanlar

■ İşlemlerin taşıyıcı ya da artık etkileri söz konusu olduğunda kullanılması avantajlıdır. Verilen iki işlem arasında arındırma periyodu yardımıyla işlemlerin direkt etkilerini ölçebilme yeteneğine sahiptir.

■ Bu tasarımda davranış özellikleri gibi çok sayıda subjektif değişken kullanılabilir.^{15,16,18-20}

Tasarımın dezavantajları

■ İşlemlerin taşıyıcı etkilerini doğru analiz etmek için optimum arınma periyodunun seçilemeyebilir veya dinlenme periyodu sonunda deneklerin başlangıç koşullarına ulaşması mümkün olmayabilir.

■ Deneyin tamamlanması uzun zaman alabilir. Bu durum yaş veya cinsi olgunluk gibi denekte fizyolojik değişimlere neden olabilir.

■ Çalışmadan denneğin düşmesi (drop-out) durumuna duyarlıdır.

■ Denek üzerinde geçici etkiye sahip olan prosedürler ve uzun süre run-in periyotta (işlemsiz periyot) kalan denekler için uygun olmayabilir.^{16,18,19,21,22}

SWITCHBACK DENEY TASARIMI

Switchback tasarımı, latin kare tasarımı ile ilişkili bir tasarımdır. Satırlar ve sütunların bloklandığı bu tasarımda sütun sayısı, genellikle $[t(t-1)/2]$ 'e eşittir (t: işlem sayısı). Satır sayısı da çoğunlukla 3 ya da

4'tür ve işlem sayısı ile ilişkili değildir. Bu tasarımın amacı, satır ve sütun farklılıklarını ve satır-sütun etkileşimini kontrol etmektir. 3 satırın yer aldığı bir deneyde sütunlar, satırlar boyunca elde edilen doğrusal değişimler açısından incelenirken, 4 satırın kullanıldığı bir denemede de sütunlar, bu sefer karesel değişimler açısından (her bir satır içinde) farklı olup olmadıkları incelenir.^{17,23}

Tablo 5'te switchback deney tasarımı örneği verilmiştir. Çalışmada yer alan deneklerin yarısına $A_1B_2A_3$ sırasında işlem uygulanırken, diğer yarısına $B_1A_2B_3$ şeklinde işlem uygulanmıştır. Hangisine hangi işlem sırasının uygulanacağı ise rasgele belirlenmiştir (Tablo 5).²⁴

Switchback deney tasarımında istatistiksel model eşitlik (3)'teki gibidir.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{k(i)} + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad (3)$$

Y_{ijk} , i . sıra j . periyottaki k . gözlem değerini, genel ortalamayı μ , i . sıra etkisi α_i , j . periyot etkisi β_j , i . sıra ve j . periyottaki sıra-periyot etkileşim etkisi $\alpha\beta_{ij}$, i . sıradaki k . deneye ait hatayı ve ϵ_{ijk} ise NID(0, σ^2) dağılımına uyan rasgele hata bileşenini gösterir.

İlk gruptaki bir denek için periyot başına A ve B işlemleri arasındaki fark, $[(A_1 + A_3)/2 - B_2]$ ile tahmin edilir. Bu tahmine ilişkin en önemli nokta, tahminin periyot etkilerinin lineer bileşenlerine

TABLO 5: Switchback deney tasarımı.

| Periyot | Denekler | | | | | |
|---------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | A_1 | A_1 | B_1 | B_1 | A_1 | B_1 |
| 2 | B_2 | B_2 | A_2 | A_2 | B_2 | A_2 |
| 3 | A_3 | A_3 | B_3 | B_3 | A_3 | B_3 |

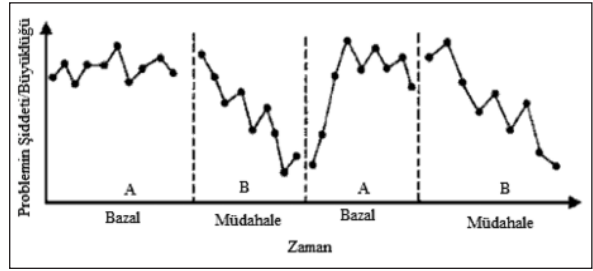
Grup 1 (işlem sırası: A,B,A): 1, 2, 5 nolu deney birimleri; Grup 2 (işlem sırası: B,A,B): 3, 4, 6 nolu deney birimleri

ortogonal (dik) olmasıdır. İkinci gruptaki bir denek için işlem farkı ise, $[A_2 - (B_1 + B_3)/2]$ ile tahmin edilir.²⁴

Örneğin; Üç farklı diyetin etkisi önce laboratuvar hayvanları üzerinde denenmek istensin. Bu amaçla 6 tane tavşan seçilsin ve diyetin total kolesterol üzerine etkisi araştırılsın. Her bir tavşan genetik yapısının getirdiği farklılıklar nedeniyle diyete karşı aynı tepkiyi vermeyebilir. Aynı tavşan üzerinde bütün periyotlarda diyetlerin etkisi incelenecektir. Böylece zaman periyotları blok olarak kabul edilmiş olacaktır. Tavşanlar sütunlara, periyotlar ise satırlara yerleştirilecektir. Sütunlar arasındaki farklılıklar satırlara göre değişebileceği için 4 periyotlu switchback deneme düzeni ile satırlar boyunca ortaya çıkan karesel farklılıkların incelenmesi önerilir. Burada tek bir sütunda sadece tek bir işlem çifti incelenmekte ve satır boyunca da işlemlerin uygulanmasına devam edilmektedir. Deney planı şematik olarak Tablo 6'daki gibidir.

REVERSAL DENEY TASARIMI

Reversal deneyler, tek denekli denemeler (single-subject design) olarak da bilinir. Bu denemelerde hedef davranış (veya hedef değişken) başlangıç periyodunda ölçülür (A), daha sonra deneysel işlem uygulanır ve davranış ölçümü yapılır (B), bu işlemin etkisi geçtiği zaman tekrar işlem uygulanmadan davranış ölçümü yapılır (A). Bu şekilde sonlandırılan reversal denemeler ABA denemeleri olarak bilinir. Bu deney tasarımları artık etkisinin incelenmek istendiği durumlarda da kullanılabilir. Çünkü işlem denemeden çıkarıldığında geriye kalan etki, artık etkisi olacaktır. Bir ABA deneme düzeni Şekil 2'de gösterilmiştir.^{17,25,26}



ŞEKİL 2: ABA deneme düzeni.

Örneğin, Madde kullanımı üzerine yapılan araştırmalarda ABA reversal denemeleri uygun sonuçlar verecektir. Mesela sigara kullanımı üzerine nikotin ihtiyacını azalttığı ileri sürülen bir ilacın etkisi bu deneme ile incelenebilir.

ABA düzeni 3 periyotta uygulanırken, işlemin bir sonraki periyotta tekrarlandığı 4 periyotlu ABAB düzenine, *çift (double) reversals tasarım* denilmektedir. Bu denemeler, ilk uygulandığında yararlı olduğu gözlenen tedavilerin yeniden uygulanmasını sağladığından ABA tasarımına göre daha yararlıdır. ABAB denemeleri, kalıcı veya uzun süreli etki gösteren tedavilerin değerlendirilmesi için uygun değildir ve başarılı tedavinin geri çekilmesi etik sorunlar oluşturabilir. Ayrıca bu tasarımda çok sayıda işlem/televi uygulaması çoğu kez mümkün olmamakta ve çoğu zaman da tedavi sonrası başlangıç düzeyine dönme gerçekleşmeyebilir. İkisinin de kullanılması uygun olduğu durumlarda ABAB denemeleri, ABA denemelerine tercih edilir. Her ikisi de çevresel değişim ile davranış arasındaki fonksiyonel ilişkiyi göstermek için oldukça güçlü denek içi deneme düzenleridir.^{17,25,26}

ABAB reversals denemelerin farklı türleri vardır. Bunlar;

| TABLO 6: Switchback deney tasarımı. | | | | | | |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Denek | | | | | |
| | Tavşan 1 | Tavşan 2 | Tavşan 3 | Tavşan 4 | Tavşan 5 | Tavşan 6 |
| Periyot 1 | A | C | B | A | C | B |
| Periyot 2 | C | B | A | B | A | C |
| Periyot 3 | A | C | B | A | C | B |
| Periyot 4 | C | B | A | B | A | C |

Grup 1 (işlem sırası: A,B,A): 1, 2, 5 nolu deney birimleri; Grup 2 (işlem sırası: B,A,B): 3, 4, 6 nolu deney birimleri

■ **Tekrarlayan Reversal Denemeler:** A-B-A-B-A-B şeklinde yapılan reversal denemelerdir. Yapılan tekrarlar sayesinde fonksiyonel ilişkilerin daha uygun gösterimi sağlanır. Bazı denemelerde tekrarlar gereksiz olabilir.

■ **B-A-B Reversal Denemeler:** Bu denemelerde müdahale öncesi etkinin ne olduğu bilinmez. Olası sıra etkileri söz konusu olabilir. Psikiyatride anormal davranışlar konusunda yapılan araştırmalarda kullanılabilir. Etkili tedavinin kesilmesi etik sorunlar çıkarabilir.

■ **Çoklu İşlem İçeren Reversal Denemeler:** Sıra etkisine karşı duyarlı olan bu denemeler, A-B-A-B-C-B-C, A-B-C-B-C-B-C şeklinde kurulabilir. İki veya daha fazla deneysel koşulların birbirleriyle veya bazal ölçümleriyle karşılaştırılması mümkündür. Ayrıca verilerin değerlendirilmesine devam edilme kararı verildiğinde uygulanacak denemelerdir

■ **NCR (Noncontingent Reversal) Tekniği:** Olumsuz pekiştirmenin etkilerini gösterir. Olumsuz pekiştirme olarak kullanılan aktivitenin giderilmesi mümkün olmadığında yararlıdır.

■ **DRO Reversal Tekniği:** Hedef davranış dışındaki herhangi bir davranışla pekiştirilen denemelerde (DRO), pekiştirme etkisini gösteren deneysel bir tekniktir.

■ **DRI Reversal Tekniği:** Hedef davranışla uyumlu olmayan bir davranışın pekiştirildiği denemelerde (DRI), pekiştirme etkisini gösteren deneysel bir tekniktir.

■ **DRA Reversal Tekniği:** Hedef davranış dışında alternatif bir davranışın pekiştirildiği denemelerde (DRA), pekiştirme etkisini gösteren deneysel bir tekniktir.²⁵

Bir periyottan diğer periyota değişim gözlenildiğinde uygulanan işlemin etkili olduğu kabul edilir. İşlem süresince elde edilen yanıtların bazal koşullarda elde edilenlere göre daha yüksek olduğu varsayılın. Bu durumda, bir periyottan bir sonraki periyota ardışık değişimin kestirimi kolaylıkla belirlenir. Yani, ilk periyottan sonra artış, ikinci periyottan sonra azalış ve üçüncü periyottan sonra da azalış olacağı tahmin edilebilir. Kestirilen değişim yönü, negatif ve pozitif işaretler (azalış ve artış)

kullanılarak kaydedilir. Bu işaretlerin toplamı, bir periyottan diğer periyota geçerken meydana gelebilecek değişimin olası şeklini gösterir. Böylece hem düzey-değişimi hem de eğim-değişimini içeren ABAB reversal tasarımı için regresyon modeli eşitlik (4)'teki gibi verilebilir.²⁷

$$Y_t = \beta_0 + \beta_1 T_t + \beta_2 L_{1t} + \beta_3 S_{1t} + \beta_4 L_{2t} + \beta_5 S_{2t} + \beta_6 L_{3t} + \beta_7 S_{3t} + \epsilon_t \quad (4)$$

Y_t , t. zamandaki bağımlı değişken değeridir. β_0 ve β_1 sırasıyla 1. periyot için kesme ve eğim değerlerini gösterir. β_2, β_4 ve β_6 sırasıyla 1., 2. ve 3. düzey-değişim değerleridir. β_3, β_5 ve β_7 ise sırasıyla 1., 2. ve 3. eğim-değişim değerlerini ifade eder. T_t , t. zamanda ölçülen zaman değişken değeridir. L_{1t}, L_{2t} , ve L_{3t} sırasıyla t. zamanda ölçülen düzey-değişim kukla (dummy) değişkenlerinin değerlerini gösterir. S_{1t}, S_{2t} ve S_{3t} sırasıyla t. zamanda ölçülen eğim-değişim değişkenlerinin değerlerini ve ϵ_t ise t. zamanda ölçülen hata terimidir.

Tasarımın avantajları

■ Bağımlı ve bağımsız değişken arasındaki fonksiyonel ilişki gösterilebilir.

■ Deneysel değişken tekrarlı bir şekilde uygulandığında ya da çekildiğinde deneysel değişkenin etkisini gösterir. Böylece davranış değişikliği ölçülebilir.

Tasarımın dezavantajları

■ İşlemin geri çekilemediği veya müdahalenin kaldırılamadığı durumlarda,

■ Başlangıç fazındaki davranış düzeyine aynı koşullar altında tekrar ulaşamadığında tasarım yetersiz kalabilir.

■ Eğer deney sonucundan şüphe duyuluyorsa, kontrol veya çoklu bazal denemeler olarak DRO veya DRI/DRA kullanılabilir.

Sosyal, eğitim ve etik açıdan problemlerle karşılaşılabılır.²⁵⁻²⁷

LATİN KARE DENEY TASARIMLARI

Latin kare ve *Greco-latin kare tasarımları*, cross-over tasarımının çeşitleridir. Bu tasarımlarda ikiden fazla işlem grubu vardır ve tüm işlemler tüm deneklere uygulanır.¹¹ İlgilenilen faktörün iki et-

TABLO 7: Standart latin kareler ve çeşitli boyutlarda latin kare sayısı.

| Boyut | 3x3 | 4x4 | 5x5 | 6x6 | 7x7 | p x p |
|--------------------------|-------------------|------------------------------|---|--|---|--|
| Standart Kare Örnekleri | ABC BCA CAB | ABCD BCDA CDAB DABC | ABCDE BAECD CDAEB DEBAC ECDBA | ABCDEF BCFADE DEABFC EADFCB FDECBA | ABCDEFG BCDEFGA CDEFGAB DEFGABC EFGABCD FGABCDE GABCDEF | ABC...P BCD...A CDE...B . . PAB...(P-1) |
| Standart Kare Sayısı | 1 | 4 | 56 | 9408 | 16942080 | - |
| Toplam Latin Kare Sayısı | 12 | 576 | 161280 | 818851200 | 61479419904000 | $p(p-1) \times (\text{Standart Kare Sayısı})$ |

menle bloklandığı bu tasarımlarda çoğu zaman sütun blokları denekleri, satır blokları ise periyotları gösterir. Bu denemelerde satır, sütun ve işlem sayısı eşit olup, bu faktörlerden birinin seviyesi diğer faktörlerin seviyeleri ile yalnız bir kez birlikte bulunur. Bu nedenle satırlar ve sütunlar işleme ortogonaldır. Gözlem sayısı ise işlem sayısının karesi kadardır. İşlemler büyük harflerle (A, B, C, D, \dots, P) gösterilirse,^{10,12} çeşitli boyutlarda standart latin kare tasarımları ve latin kare sayıları Tablo 7'de olduğu gibi özetlenebilir.²⁸

Her bir deneğe farklı periyotlarda tüm işlemler uygulandığından, latin kare aslında bir change-over tasarımıdır.¹⁰ Eşitlik (5)'te, latin kare tasarımı için istatistiksel model verilmiştir.²⁸

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_k + \tau_j + \epsilon_{ijk} \quad (5)$$

$i, j, k = 1, 2, \dots, p$

Y_{ijk} , j . işlem için i . satır ve k . sütundaki gözlemdir. μ , genel ortalamayı α_i , i . satır etkisini β_k , k . sütun etkisini τ_j , j . işlem etkisini ve ϵ_{ijk} ise NID(0, σ^2) dağılımına uyan rasgele hata bileşenini gösterir. Bu tasarım, faktörler arasında etkileşim olmadığını varsayar.

Tasarımın kullanım alanları ve avantajları

■ Satırlar ve sütunların faktörleri gösterdiği ve randomizasyon kısıtının olmadığı durumlarda latin kareleri kullanmak yararlı olabilir.

■ İşlemler artık etkiye sahipse (yani 1. periyotta uygulanan A işleminin etkisinin 2. periyot-taki B işleminin etkisine az da olsa karıştığı durumlarda) latin kare tasarımları kullanılabilir.

■ Latin kare ve Greco-latin kare tasarımları da cross-over tasarımı gibi benzer avantajlara sahiptirler.²⁹⁻³¹

Tasarımın dezavantajları

■ Çalışmadan denek düşmesine (drop-out) karşı çok duyarlıdır.

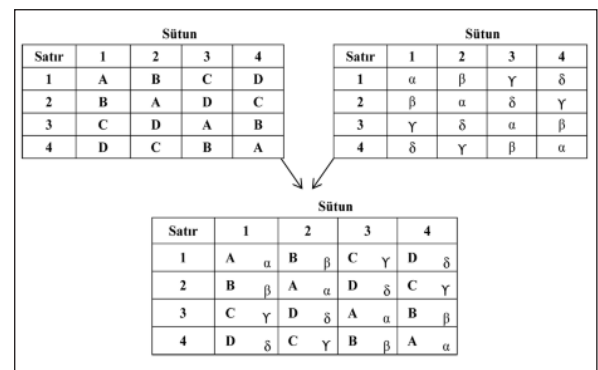
■ İşlem sayısı 5'ten az olan Latin kare tasarımlarının istatistiksel gücü daha azdır.

■ Tasarımının tamamlanması uzun zaman alabilir.

■ Bu tasarımlar, cross-over tasarımı gibi benzer dezavantajlara sahiptirler.²⁹⁻³¹

Greco-latin kare tasarım, iki latin karenin çakıştırılmasıyla elde edilen ortogonal bir latin kare tasarımıdır. Şekil 3'te (4x4) boyutlu Greco-latin kare tasarımı verilmiştir.^{12,30,31}

Bu tasarıma ait istatistiksel model eşitlik (6)'da verilmiştir.²⁸

**ŞEKİL 3:** Greco-latin kare tasarımı.

$$Y_{ijkl} = \mu + \theta_i + \omega_k + \tau_j + \psi_l + \epsilon_{ijkl} \quad (6)$$

$i, j, k, l = 1, 2, \dots, p$

Y_{ijkl} , j latin harfi ve k yunan harfi için i . satır ve l . sütundaki gözlemi gösterir. μ , genel ortalamayı θ_i , i . satır etkisini τ_j , latin harfiyle gösterilen j . işlem etkisini ω_k ise yunan harfiyle gösterilen k . işlem etkisini ψ_l , l sütun etkisini ve ϵ_{ijkl} ise NID($0, \sigma^2$) dağılımına uyan rasgele hata bileşenini ifade eder. Dört alt indisten sadece iki tanesinin bilinmesiyle bir gözlem tanımlanabilir. Genel olarak $(p-1)$ ortogonal latin kareler setinden oluşan bir tasarımda, en fazla $(p+1)$ faktör sayısı yer alabilir. Bu tasarımda faktörler arasında etkileşimin olmadığı kabul edilir.

Tekrarlı Ölçümler İçeren ve Tekrarlanan Latin Kare Deneysel Tasarımları

İşlem sayısı az olan (genellikle 2, 3 ve 4) latin karelerde hata serbestlik derecesini arttırmak için latin karelerin tekrarlanması yani yinelenmesi istenebilir. Bu tasarımlarda farklı periyotlarda aynı deneklere ait ölçümler yer aldığından işlemlerin taşıyıcı etkisini dengelemek ve test edilebilir hale getirmek için işlemlerin verilmiş sırasında düzenleme yapılması gerekir. Yani tüm karelerde her bir işlem diğer bir işlemi eşit sayıda takip etmelidir. Latin karelerin tekrarlanabilmesi için kare-işlem etkileşim etkisinin anlamlı olmaması gerekir. Aksi takdirde

model, eklemeli model olmayacaktır. Latin karelerin tekrarı, üç farklı yöntem kullanılarak elde edilebildiğinden, *tekrarlı latin kare tasarımlar*, her bir kare içinde periyot ya da denek değişikliğine bağlı olarak aşağıdaki gibi incelenebilir.²⁸⁻³⁰

1) Her bir karede farklı periyotlarda aynı denek setinin kullanıldığı (Tablo 8a)

Bu düzende 1. kare, farklı 3 periyotta aynı işlem sırasında 2. bir kare olarak da tekrarlanabilir. Ancak bu şemada taşıyıcı etki kontrol altına alınmış olur. Böylece tekrarlı latin karelerin yinelenmesiyle taşıyıcı etki kontrol altına alınmış olur. Tek kare kullanılması gerektiğinde bu etkiyi kontrol etmek mümkün olmayacaktır.

2) Her bir karede aynı zaman periyotlarında farklı denek setinin kullanıldığı (Tablo 8b)

3) Her bir karede farklı zaman periyotlarında farklı denek setinin kullanıldığı (Tablo 8c)

Örneğin; Omega-3 çoklu doymamış yağ asitli ve bitkisel kaynaklı 3 farklı diyetin (A, B, C), kemiğe özgü serum alkalin fosfat düzeyi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı varsayalım. Fareler üzerinde yapıldığı varsayılan bu deneme için 3 adet fare, 3 farklı diyet grubuna rasgele olarak atanmıştır. İkişer haftalık 3 farklı periyot sonunda farelerin kemiğe özgü serum alkalin fosfat düzeyleri

TABLO 8a: Her bir karede farklı periyotlarda aynı denek setinin kullanıldığı tekrarlı latin kare .

| Kare 1 | | | | Kare 2 | | | |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Periyot | Denek 1 | Denek 2 | Denek 3 | Periyot | Denek 1 | Denek 2 | Denek 3 |
| 1 | C | B | A | 4 | A | C | B |
| 2 | A | C | B | 5 | C | B | A |
| 3 | B | A | C | 6 | B | A | C |

TABLO 8b: Her bir karede aynı zaman periyotlarında farklı deneklerin kullanıldığı tekrarlı latin kare.

| Kare 1 | | | | Kare 2 | | | |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Periyot | Denek 1 | Denek 2 | Denek 3 | Periyot | Denek 4 | Denek 5 | Denek 6 |
| 1 | C | B | A | 1 | A | C | B |
| 2 | A | C | B | 2 | C | B | A |
| 3 | B | A | C | 3 | B | A | C |

TABLO 8c: Her bir karede farklı zaman periyotlarında farklı deneklerin kullanıldığı tekrarlı latin kare.

| Kare 1 | | | | Kare 2 | | | |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Periyot | Denek 1 | Denek 2 | Denek 3 | Periyot | Denek 4 | Denek 5 | Denek 6 |
| 1 | C | B | A | 4 | A | C | B |
| 2 | A | C | B | 5 | C | B | A |
| 3 | B | A | C | 6 | B | A | C |

TABLO 9: Tekrarlanan latin kare deney tasarımı.

| Kare 1 | | | | Kare 2 | | | | Kare 3 | | | |
|---------|-------|---|---|---------|-------|---|---|---------|-------|---|---|
| Periyot | Denek | | | Periyot | Denek | | | Periyot | Denek | | |
| | 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | A | B | C | 4 | B | C | A | 7 | C | A | B |
| 2 | B | C | A | 5 | C | A | B | 8 | A | B | C |
| 3 | C | A | B | 6 | A | B | C | 9 | B | C | A |

ölçülmüştür. Her bir periyot sonunda farelere belirli bir arındırma periyodu uygulanmıştır. Denek sayısının az olmasından dolayı bu deneme düzeni, aynı denekler üzerinde 3 kez tekrarlanmış ve ilgili deney tasarımı Tablo 9'da verilmiştir.

Tekrarlı latin kare tasarımına ait istatistik modeli, eşitlik (7)'deki gibi yazılabilir.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + c_k + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad (7)$$

$i=1,2,\dots,t; j=1,2,\dots,p; k=1,2,\dots,c$

Burada Y_{ijk} , j . periyotta i . işlemin uygulandığı k . denegın gözlem değerini, α_i , i . işlemin sabit etkisi β_j , j . periyotun sabit etkisi c_k ise σ^2c varyans bileşeniyle k . denegın rasgele etkisini gösterir. $\alpha\beta_{ij}$, i . işlem j . periyottaki işlem-periyot etkileşim etkisi ve ϵ_{ijk} ise NID(0, σ^2) dağılımına uyan rasgele hata bileşenini ifade eder. Aynı periyotlar, her bir kare içinde dikkate alınırsa işlem-periyot etkileşimlerinin incelenmesi ancak tekrarlı latin kare tasarımlarıyla sağlanabilir. Aynı zamanda tekrarlı latin kareler, birbirlerine ortogonal olduğunda ve/veya Williams tasarımlar söz konusu olduğunda taşıyıcı etkiler, eşitlik 7'ye eklenerek modellenabilir. Kareler, taşıyıcı etkiler açısından dengeli olduğunda taşıyıcı etkiler, işlem-periyot etkileşim etkilerinden ayrı olarak tahmin edilebilir.¹⁷

Williams Deneysel Tasarımı

Williams tasarımı, cross-over ve latin kare tasarımlarının özel bir halidir. Her bir işlemin, her bir sütunda ve işlem dizisinde sadece ve sadece bir kez gösterildiği bir latin karedir. Olası en yüksek etkinliği elde etmek için tasarım, dengeli olmak zorundadır. Denge, işlem sayısının tek ve çift sayıda olmasına bağlı olarak ya özel tek bir latin kare (Williams teki) ya da uygun iki latin kare (Williams çifti) ile elde edilebilir.^{15,32,33}

Williams tasarımı, bir düzeyli (first-order) taşıyıcı etkiler için dengeli olan genelleştirilmiş bir latin karedir. Taşıyıcı dengesi, çok az sayıda denek ile elde edilebilir. Çalışmada yer alan işlemlerin her biri, deneklerin her birine uygulanıyorsa, Williams satır-sütun tasarımları kullanılır.^{32,33}

Örneğin; İşlem sayısı ve periyot sayısı 4 olan her bir deneye her bir işlemin sadece bir kez uygulandığı "ABCD", "BDAC", "CADB" ve "DCBA" işlem dizimli bir cross-over tasarımı için Williams tasarımı örneği, Tablo 10'daki gibi gösterilebilir.¹⁵

ÖRNEKLEM HACMİNİN BELİRLENMESİ

Hayvan deneylerinde ve özellikle laboratuvarla gerçekleştirilen araştırmalarda uygun denek sayı-

TABLO 10: (4×4) Cross-over tasarımı için Williams tasarım örneği.

| Denek | İşlem dizini no | İşlem dizini | Periyot | | | |
|-------|-----------------|--------------|---------|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 1 | ABCD | A | B | C | D |
| 2 | 2 | BDAC | B | D | A | C |
| 3 | 3 | CADB | C | A | D | B |
| 4 | 4 | DCBA | D | C | B | A |

sına karar verirken mali durumlar, çalışmanın amacı, veri yapısı, tasarım türü ve denek türü gibi bilimsel faktörler ve etik konular birlikte ele alınmalıdır. Hayvan denemelerinde önemli sayılan “3R kuralı” denek sayısını belirleme aşamasında da göz önünde bulundurulmalıdır. Bu kuralda *yerine koyma (replacement)*: denek olarak hayvan yerine model ya da farklı materyal kullanımını, *azaltma (reduction)*: en az sayıda denek kullanımını ve *uygun koşullar sağlama (refinement)*: deneklerin fizyolojilerine uygun ortamlarda barındırılması ve uygun işlemlerden geçirilmesini ifade eder.

Bu tip araştırmalarda uygun denek sayısına karar verirken *daha önce yapılmış çalışmalar* ya da *pilot çalışmalar*, *güç analizi* (power analysis), *ardışık örnekleme* (sequential sampling), *kaynak eşitlik yöntemi* (resource equation method) veya *deneyimlerimize bağlı olarak tespit ettiğimiz diğer yaklaşımlardan* yararlanılabilir.

LİTERATÜR BİLGİSİ VEYA PİLOT ÇALIŞMALAR

Hayvan deneylerinin planlanma aşamasında, daha önce benzer çalışmalar yapıp yapılmadığı, benzer çalışmalar varsa kullanılan deney tasarımları, denek türü ve denek sayıları hakkında bilgiler literatür inceleyerek elde edilebilmektedir. Bu nedenle yayınlanmış çalışmaların gelecekte yapılacak çalışmalara temsil olabileceği düşüncesiyle çalışmaya ait tüm özet bilgilerin doğru ve eksiksiz olarak verilmesi önemlidir. Deney sorumlusu, pilot çalışmanın uygulanıp uygulanmadığından bağımsız olarak örneklem hacmini belirlemek veya doğrulamak amacıyla *literatür bilgilerinden* yararlanabilir.^{1,5}

Yeni bir araştırma alanını araştırmak amacıyla yapılan *pilot denemeler*, önerilen deneyin

lojistiklerini kontrol etmek kadar değişkenlerin farklı deneysel koşullarda da yeterli kesinlikte ölçülebilir olup olmadığını belirlemek için tasarlanmaktadır.³⁴ Bu çalışmalar, çok az sayıda denek ile yürütülebildiği gibi sadece tek bir deney hayvanını içerdiğinden küçük ölçekli deneylerdir.³⁵⁻³⁷ Bu tarz çalışmaların sonuçları normalde yayınlanmasa da daha büyük denemeler yapılması durumunda deney koşullarının çerçevesinin belirlenmesinde deney sorumlularına bilgi vericidir. Örneğin bir çalışmada önerilen doz miktarlarının çok yüksek (beklenmedik bir şekilde tüm deneklerin öldüğü) ya da çok düşük (beklenen yanıtın gözlenmemesi) olup olmadığı pilot çalışmalarla izlenebilir. İzlem sonucunda daha sonra gerçekleştirilecek büyük çaptaki deneylerde zaman, mali ve denek açısından kayıplar engellenmiş olacaktır.^{3,36-38} Ayrıca pilot çalışmalardan elde edilecek tahminler (ortalama, standart sapma ve olası bazı indikasyonlar vs.), gelecekte yapılacak deneylerin örneklem hacmini belirlemek için kullanılabilir. Bu nedenle bu çalışmanın büyük çaplı denemeler öncesinde büyük bir titizlikle yapılması önerilmektedir.³⁵⁻³⁸

GÜÇ ANALİZİ

Güç analizi, örneklem hacminin belirlenmesinde en çok kullanılan yaklaşımdır. Bu yaklaşım, materyal değişkenliği, klinik ya da biyolojik önemin etki büyüklüğü (D), anlamlılık düzeyi, güç, hipotez testi yönü ve örneklem hacmi gibi etmenlere bağlıdır.^{2,36} Bu analiz, basit ve pahalı klinik denemeler için seçilecek bir yöntemdir ve kolay uygulanabilecek doğrulayıcı deneyler için tavsiye edilmektedir. Buna karşın, açıklayıcı deneylerde tercih edilmektedir. Ayrıca laboratuvar hayvanları ile yapılan araştırmalarda denek sayısını sınırlayan birçok faktörün bulunması nedeniyle en son başvuru yöntem durumundadır.

Günümüzde birçok istatistik model için uygun örneklem genişliği hesaplayan formüller geliştirilmiştir. Güç analizi yapılırken:

- Çalışılacak değişkenin varyasyonunun tahmini değeri olarak planlanan deney tasarımına uygun daha önce yapılmış bir çalışmanın standart sapma değeri kullanılabilir. Eğer literatürde benzer

bir çalışma yoksa pilot çalışma sonuçlarından yararlanılabilir.

■ İki grup karşılaştırıldığında klinik ya da biyolojik önemin standardize edilmiş etki büyüklüğü yani D, ortalamalar ya da oranlar arasındaki farkın standart sapmaya bölünmesiyle elde edilebilir.

■ Bu tarz çalışmalarda örnekleme hatasına göre yanlış-pozitif sonucun elde edilme şansı olan Tip I hata, genellikle 0,05 ya da 0,01 olarak alınır.

■ Verilen anlamlılık düzeyi ve standart sapma için belirlenen etki büyüklüğünü saptama şansı olan güç (1-β), genellikle 0,80 olarak alınır.

Bu etmenlerin tümü belirlendiğinde çalışma için gerekli denek sayısı kolaylıkla hesaplanabilir.^{34,36,37}

KAYNAK EŞİTLİK YÖNTEMİ

Kaynak eşitlik yöntemi, örneklem hacmini belirlemek için kullanılan ve “*azalan değer kuralına-the law of diminishing returns*” dayanan alternatif bir yöntemdir. Örneklem hacmi, işlem, blok ve hata serbestlik derecelerine bağlı olarak hesaplanır. Araştırmacı, literatür bilgisi veya pilot çalışmalardan yararlanarak hata serbestlik derecesini belirleyebilir. Biyolojik önemi ortaya çıkarmak için yapılan biyomedikal çalışmalarda denek sayısına karar verirken, genellikle hata serbestlik derecesinin belirli değerler (10-20) arasında alınması tavsiye edilir. Seçilen hata serbestlik derecesi alt sınırdan küçük ise çalışmaya eklenecek her bir denek, çalışmadan daha fazla bilgi elde edilmesini sağlar. Ancak üst sınırdan daha büyük hata serbestlik derecesi seçilmiş ise çalışmaya denek/lerin eklenmesi çalışma sonucuna pek katkı sağlamaz. Bu azalan değer kuralı, oldukça büyük etki boyutunu gerektirmesine rağmen tüm hayvan deneylerinde tercih edilir.^{5,35-37}

■ *Yöntemin uygulanabildiği durumlar*

- Tanımlayıcı araştırmalarda,
- Birkaç faktör etkisinin araştırıldığı deneylerde,
- Standart sapmaya ilişkin bilgi yoksa,
- Etki büyüklüğünü belirlemek çok zorsa,
- Nispeten pahalı olmayan kompleks deneylerde,

■ Güç analizinin uygulanamadığı deneylerde kullanışlı yöntemdir.^{5,36,37}

ARDIŞIK ÖRNEKLEME

Ardışık örnekleme yaklaşımı, örneklem hacminin belirlenmesinde kullanılan olasılıklı olmayan bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım ile gerekli denek sayısına karar verirken ortalama, varyans ve etki büyüklüğü gibi etmenlerin bilinmesi gerekir. Ardışık zaman aralıklarında denek/deneklerin çalışmaya alındığı, her bir zaman periyodunda deneklerden elde edilen gözlem sonuçlarının değerlendirildiği ve elde edilen sonuçlara göre örnekleme devam edildiği ya da durdurulduğu bir yaklaşımdır.^{5,39,40}

Çalışmaya alınacak denek sayısının üst sınırı konusunda *açık* ve *kapalı ardışık yöntem* olmak üzere iki farklı yaklaşım vardır. Etik, bilimsel ve mali kısıtlılıklar yoksa denegın temini açık ardışık yöntemle, eğer denek sayısı için belirlenmiş bir üst sınır öngörülüyorsa da kapalı ardışık yöntem ile belirlenmelidir.⁴¹

Yaklaşımın avantajları

■ Örneklem hacmi, araştırmacının karar verme sürecine bağlı olarak değiştiğinden örneklem hacmi oldukça küçük olabilir.

■ Araştırmacı örnekleme süresince minör değişiklikler ve düzeltmeler yapabilir.

■ Pahalı ve zaman alıcı bir yaklaşım değildir.

■ Var olan anlamlı etkileri bulmak için mükemmel bir tekniktir.^{38,40}

Yaklaşımın dezavantajları

■ Bu yaklaşımla randomizasyonun sağlanması zordur.

■ Bu örnekleme tekniğiyle elde edilen çalışma sonuçları, çok geniş sınırlarda genellenemeyebilir.^{38,40}

Örneğin; Randomize bir denemede, iki grup ortalamasının karşılaştırılmak istendiğini varsayalım. Grupların her birinde “n” tane denekle ara değerlendirme yapıldıktan sonra eğer alternatif hipotez kabul edilirse deney sonlandırılır. Aksi durumda, toplam “2n” adet farklı denekle deneye devam edilir. Ölçümler alındıktan sonra toplam “4n” denekten elde edilen sonuçlar istatistik yön-

temlerle analiz edilir ve alternatif hipotez kabul edilirse deney sonlandırılır. Diğer durumlarda yeni denek ilaveleri ile periyodik değerlendirmelere devam edilir.⁴²

DENEYİMLERİMİZE DAYALI YAKLAŞIMLAR

■ Özellikle laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan araştırmaların birden çok araştırma merkezi, coğrafik bölge veya farklı kişiler tarafından tekrarlanması yapılan denemelerden elde edilecek sonuçların güvenilirliğini artıracaktır. Bu tekrarlardan elde edilen sonuçlar uygun bir meta analizi ile birleştirilerek doğruluk derecesi yüksek tahminler elde edilebilir.

■ Karşılaştırılacak gruplar hakkında önem sıralaması yapıldığında grupların önemlilik dereceleri ile orantılı olacak şekilde denek sayısı belirlenebilir. Asıl ilgilenilen gruplara daha fazla denek, üzerinde azda olsa bilgi sahibi olduğumuz gruplara ise daha az denek atanabilir.

■ Denemelerde ölçülmek istenen özelliklerin önem dereceleri dikkate alınmalı ve en önemli özelliğin bilgilerine dayalı olarak denek sayısı belirlenmelidir.

■ Ardışık denemelerle örneklem genişliği belirlenmek istendiği zaman, ara değerlendirmelerde hesaplanan p değerinin büyüklüğü denemeye dahil edilebilecek denek sayısını etkileyebilir. Ara değerlendirmede hesaplanan p değeri 0,50 değerinin üzerinde ise deneme sonlandırılabilir, ancak 0,20 veya daha altında ise yeni denekler eklenerek sonuç yeniden gözden geçirilir. Ayrıca p değeri küçüldükçe bir sonraki değerlendirmede ilave edilecek denek sayısı azaltılmalıdır.

Hayvan deneylerini içeren yayınlanmış çalışmalardan elde edilen sonuçların gelecek çalışmalarda kullanılabilmesi için (1) hayvan deneylerini içeren kılavuzlar doğrultusunda hazırlanıp, (2) sonuçların da uygun bir şekilde okuyucuya sunulması gerekir. Bu tip araştırmaların sonuçları, *meta analizi* adı verilen istatistiksel bir değerlendirmeye tabi tutulabilir. Bu analiz neticesinde daha fazla denekle daha güvenilir sonuçlar üretilmiş olur.^{5,43}

Meta analizini uygulayabilmek için yayınlanmış çalışmalarda bazı özelliklerin bulunması gerekir. Bunlar;^{18,44}

■ Her bir deney tasarımı, analize dahil edilebilecek kalitede mi?

■ Denemelerde yer alan verilerin nasıl ve ne şekilde kaydedildiği?

■ Denemeler için hangi istatistiksel yöntemlerin kullanıldığı?

■ Her bir deney tasarımından elde edilecek bilgiler (ortalama, standart sapma, güven aralığı vb) uygun bir formda sunulmuş mu?

■ Denemeler arasında heterojenlik varsa deneme sonuçları uygun bir şekilde birleştirilebilir mi?

SONUÇ VE ÖNERİLER

Laboratuvar koşullarında ve özellikle hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda daha etkin, daha ucuz ve daha güvenilir sonuçlar elde etmek amaçlanmaktadır. Bu da uygun deney tasarımının seçilmesi, denemenin doğru planlanması ve uygun örneklem genişliğinin belirlenmesiyle sağlanabilir. Bu gerekçelerle çalışmamızda araştırmacıların tıp literatüründe sık rastlanmayan özel deney tasarımlarını kullanmasına yönelik yararlı bilgiler verilmiştir. Ayrıca araştırmacıların uygun denek sayısına karar verme aşamasında zorluklar yaşamamasından dolayı uygun denek sayısını belirlemede kullanılacak yaklaşımlar açıklanmıştır.

Çalışmanın sonucunda laboratuvar araştırmalarında kullanılacak özel deney tasarımlarının, bilimsel açıdan daha gerçekçi tahminler ürettiği ve gerekli denek sayısını da en aza indirdiği vurgulanmıştır. Ayrıca etik sorunların getirdiği kısıtlamalar da dikkate alındığı zaman, laboratuvar hayvanları ile yapılan araştırmaların farklı yer, zaman ve koşullarda tekrar edilmesi ve aynı konu üzerinde yapılan araştırma sonuçlarının ise meta analizi ile birleştirilmesi gerekliliği açıklanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E, Festing MF, Cuthill IC, Fry D, et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS One* 2009;4(11):e7824.
2. Festing MF. Principles: the need for better experimental design. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24(7):341-5.
3. Festing MF. Design and statistical methods in studies using animal models of development. *ILAR J* 2006;47(1):5-14.
4. Ott LR, Longnecker MT. Using Surveys and Experimental Studies to Gather Data. An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. 5th ed. Belmont, CA: Brook Cole, Cengage Learning; 2010. p.1-26.
5. Festing MFW, Baumans V, Combes RD, Halder M, Hendriksen CFM, Howard BR, et al. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: Problems and possible solutions. *ATLA* 1998;26(3):283-301.
6. Festing MF. The design and statistical analysis of animal experiments. *ILAR J* 2002;43(4):191-3.
7. Johnson PD, Besselsen DG. Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR J* 2002;43(4):202-6.
8. Beall G. Change-Over Experiments in Practice. Report Number: RB-71-38. Princeton, NJ: Educational Testing Service; 1971. p.4-29.
9. Gürbüz F, Başpınar E, Çamdeviren H, Keskin S. [The analysis of repeated-measures experimental designs]. *Tekrarlı Ölçümlü Deneme Düzenlerinin Analizi. Genişletilmiş 2. Baskı. Van: 100.Yıl Üniversitesi Yayınları; 2003. p.115-20.*
10. Kaps M, Lamberson W. Change Over Designs. *Biostatistics for Animal Science*. Wallingford: CABI Publishing; 2004. p.294-312.
11. Varghese C. Change-over designs. In: Jaggi S, Varghese C, Batra PK, Sharma VK, eds. *Statistical Methods for Agricultural Research*. 2nd ed. New Delhi: Indian Agricultural Statistics Research Institute; 2007. p. 1-9.
12. Hinkelman K, Kempthorne O. Factorial Experiments: Basic Ideas. *Design and Analysis of Experiments: Intro to Experimental Designs, Vol 1*. 2nd ed. New Jersey: Wiley; 2008. p.390-418.
13. Hedayat A, Afsarinesad K. *Repeated Measurements Designs*. 1st ed. Florida: Defense Technical Information Center; 1973. p.1-26.
14. Patterson HD, Lucas HL. Change-over designs. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin* 1962;147:3-37.
15. Jones B, Kenward MG. *The 2x2 Cross-Over Trial. Design and Analysis of Cross-Over Trials*. 2nd ed. London: Chapman and Hall/CRC; 2003. p.1-199.
16. Eide DM. Design of animal experiments. In: Hem A, Eide DM, Smith A, eds. *Laboratory Animal Science*. Oslo: Norwegian Reference Center for Laboratory Animal Science and Alternatives; 2001. p.168-80.
17. Tempelman RJ. Experimental design and statistical methods for classical and bioequivalence hypothesis testing with an application to dairy nutrition studies. *J Anim Sci* 2004;82(E-Suppl): E162-172.
18. Elbourne DR, Altman DG, Higgins JP, Curtin F, Worthington HV, Vail A. Meta-analyses involving cross-over trials: methodological issues. *Int J Epidemiol* 2002;31(1):140-9.
19. Wang D, Bakhai A. *Crossover trials. Clinical Trials: A Practical Guide to Design, Analysis, and Reporting*. 1st ed. London: Remedica; 2006. p.91-100.
20. Yang M, Stufken J. Optimal and efficient crossover designs for comparing test treatments to a control treatment under various models. *J Stat Plann Infer* 2007;138(1):278-85.
21. Laska E, Meisner M, Kushner HB. Optimal crossover designs in the presence of carryover effects. *Biometrics* 1983;39(4):1087-91.
22. Lasserre V. Determination of optimal designs using linear models in crossover trials. *Stat Med* 1991;10(6):909-23; discussion 924.
23. Oman SD, Seiden E. Switch-back designs. *Biometrika* 1988;75(1):81-9.
24. Cochran WG, Cox GM. *Completely Randomized, Randomized Block, and Latin Square Designs*. *Experimental Designs*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1968. p. 95-147.
25. Barker C, Pistrang N, Elliott R. *Small-N designs. Research Methods in Clinical Psychology: An Introduction for Students and Practitioners*. 2nd ed. New Jersey: John Wiley&Sons; 2002. p.162-77.
26. Shaughnessy JJ, Zechmeister EB, Zechmeister JS. *Analyzing and Reporting Research. Research Methods in Psychology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 2000. p.348-55.
27. Huitema B. Analysis of single-case reversal designs. *The Analysis of Covariance and Alternatives: Statistical Methods for Experiments, Quasi-Experiments, and Single-Case Studies*. 2nd ed. New Jersey: Wiley; 2011. p.433-52.
28. Montgomery DC. *Randomized Blocks, Latin Squares, and Related Designs. Design and Analysis of Experiments*. 5th ed. New York: John Wiley&Sons; 2001.p.144-53.
29. Mead R, Curnow RN, Hasted AM. *Control of Random Variation by Blocking. Statistical Methods in Agriculture and Experimental Biology*. 3rd ed. New Jersey: Chapman & Hall; 2002. p. 63-92.
30. Lee W. *Latin Squares Designs. Experimental Design and Analysis*. 2nd ed. San Francisco, CA: W.H. Freeman and Company; 1975. p.211-44.
31. Winer BJ, Brown DR, Michels KM. *Latin Squares and Related Designs. Statistical Principles in Experimental Design*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 1991.p.674-738.
32. Bate ST, Jones B. The Construction of nearly balanced and nearly strongly balanced uniform cross-over designs. *J Stat Plann Infer* 2006; 136(9):3248-67.
33. Wang BS, Wang XJ, Gong LK. The construction of a williams design and randomization in cross-over clinical trials using SAS. *J Statist Softw* 2009;29(1):1-10.
34. Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample size determination. *ILAR J* 2002;43(4):207-13.
35. Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J* 2002;43(4): 244-58.
36. Festing M. Together with notes on genetic nomenclature of laboratory animals. *ANZCCART News* 2000;13(3):1-8.
37. Festing MFW. How to reduce the number of animals used in research by improving experimental design and statistics. *ANZCCART Fact Sheet* 2011;T10:1-11.
38. Fitts DA. Ethics and animal numbers: informal analyses, uncertain sample sizes, inefficient replications, and type I errors. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011;50(4):445-53.
39. Robbins H. Some aspects of the sequential design of experiments. *Bulletin of the American Mathematical Society* 1952;58(5):527-35.
40. Dattalo P. Methodological alternatives and supplements to random sampling. *Strategies to Approximate Random Sampling and Assignment*. 1st ed. New York: Oxford University Press; 2009. p. 20-54.
41. Krauth J. *Experimental Design A Handbook and Dictionary for Medical and Behavioral Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences)*. Volume 14. 1st ed. New York: Elsevier; 2000. p. 1-263.
42. Korosteleva O. Interim data monitoring. *Clinical Statistics: Introducing Clinical Trials, Survival Analysis, and Longitudinal Data Analysis*. 1st ed. Ontario: Jones and Bartlett; 2008. p.15-21.
43. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010;8(6):e1000412. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.
44. Karasoy D, Kadılar C, Ata N. [The statistical properties required for meta-analysis in medical papers]. *Turkiye Klinikleri J Biostat* 2009;1(1):26-32.