

Deney Hayvanı Kullanılan Çalışmalarda Örneklem Büyüklüğünün Kaynak Eşitlik Yöntemi ile Tahmini

Estimation of Sample Size with Resource Equation Method in Experimental Animal Studies

İsmet DOĞAN^a, Nurhan DOĞAN^a

^aAfyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim ABD, Afyonkarahisar, TÜRKİYE

ÖZET Amaç: Bu makalenin amacı, kaynak eşitlik yöntemini tanıtmaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Laboratuvar hayvanlarının kullanıldığı deneyler iyi tasarlanmalı, verimli bir şekilde yürütülmeli, doğru analiz edilmeli, bulgular açıkça sunulmalı ve doğru yorumlanmalıdır. Uygun yöntemlerin kullanılması, çalışmalardan elde edilen sonuçların bilimsel olarak güvenilir olmasını ve diğer araştırmacıların yanlış yönlendirilmemesini sağlamaya yardımcı olacaktır. Örneklem büyüklüğünün hesaplanması, hayvan çalışmaları dâhil olmak üzere hemen tüm araştırmaların tasarımında önemli bir bileşendir. **Bulgular:** Bir araştırmada olması gerekenden daha az sayıda hayvan kullanılması, popülasyonda mevcut olsa bile herhangi bir anlamlı farkın kaybolmasına; daha fazla sayıda hayvan kullanılması ise kaynakların gereksiz yere israfına ve etik sorunlara yol açabilir. Özellikle biyomedikal deneylerde kullanılan hayvan sayısını azaltmak hem etik nedenler hem de hayvan kullanılarak yapılan araştırmaların pahalı ve zaman alıcı olması nedeni ile önemlidir. **Sonuç:** Bilimsel dergilerde hakemlik yapanlar, finansman kuruluşları ve etik inceleme komiteleri, yanlış olmasına rağmen örneklem büyüklüğünü belirlemede objektif bir yöntem olduğunu düşündükleri için güç analizinin kullanılmasını giderek daha fazla talep etmektedirler. Dolayısıyla laboratuvar hayvanlarını kullanan bilim adamları, güç analizi kullanarak örneklem büyüklüğünü belirlemede baskı altında bırakılmaktadırlar. Ancak, güç analizi yöntemi, örneklem büyüklüğünü belirlemenin en güçlü yolu olsa da standart sapma veya etki büyüklüğü gibi gerekli bilgilere sahip olmak her zaman mümkün değildir. Bu tür durumlarda örneklem büyüklüğünü belirlemenin yollarından biri de kaynak eşitlik yöntemini kullanmaktır.

ABSTRACT Objective: The aim of this article is to introduce the method of resource equation. **Material and Methods:** Experiments using laboratory animals should be well designed, carried out efficiently, accurately analyzed, the findings clearly presented and interpreted correctly. The use of appropriate methods will help ensure that the results of the studies are scientifically reliable and that other researchers are not misguided. Calculation of sample size is an important component in the design of almost all studies, including animal studies. **Results:** The use of fewer animals than is required in a study may lead to loss of any significant difference, even if present in the population, and the use of more animals may lead to unnecessary waste of resources and ethical problems. In particular, it is important to reduce the number of animals used in biomedical experiments, both for ethical reasons and because the research using animals is expensive and time consuming. **Conclusion:** Referees in scientific journals, financial institutions and ethical review committees are increasingly demanding the use of power analysis because they think it is an objective method to determine sample size, although it is wrong. Therefore, scientists using laboratory animals are pressured to determine the sample size using power analysis. However, although the power analysis method is the most powerful way to determine the sample size, it is not always possible to have the necessary information such as standard deviation or effect size. In such cases, one of the ways to determine the sample size is to use the resource equation method.

Anahtar kelimeler: Hayvan çalışmaları; laboratuvar (deney) hayvanları; örnek büyüklüğü; kaynak eşitlik yöntemi

Keywords: Animal studies; laboratory (experiment) animals; sample size; resource equation method

Hayvanların kalıcı hasara neden olma ihtimali olan bilimsel deneylerde kullanılması önemli etik sorunlar doğurmaktadır. Bu tür sorunlardan kurtulmak için hayvanların mümkün olduğunca geçerli bilimsel hedefler içeren ve başka bir alternatifin olmadığı durumlarda kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır.¹ Hayvan deneylerinde de diğer deneylerin çoğunda olduğu gibi aynı temel prensipler takip edilmelidir. Daha açık bir

Correspondence: Nurhan DOĞAN

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim ABD, Afyonkarahisar, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: nurhandogan@hotmail.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Biostatistics.

Received: 22 Jan 2020 **Received in revised form:** 17 Feb 2020 **Accepted:** 19 Feb 2020 **Available online:** 19 Aug 2020

2146-8877 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ifade ile bu tür deneyler de tarafsız olmalı, güçlü olmalı, iyi bir uygulanabilirlik aralığına sahip olmalı, aşırı karmaşık olmamalı ve sonuçlardaki belirsizlik aralığını göstermek için istatistiksel olarak analiz edilebilir olmalıdır.² Klinik ve hayvan çalışmaları tasarlanırken güç ve örneklem büyüklüğü hesaplamaları, çalışmada kullanılan hayvan sayısının gerekçelendirilmesi için genellikle gereklidir. Deneylerde gerekli olan hayvan sayısını hesaplamak için evrensel bir kural yoktur. Örneklem büyüklüğünün tahmini;

- Bilimsel veya klinik ilgi etkisinin büyüklüğüne,
- Standart sapmaya,
- Deneyin istenen gücüne,
- Seçilen anlamlılık düzeyine,
- Testin taraflılığına (iki taraflı/tek taraflı),
- Kullanılacak istatistiksel testin türüne (deneyin tasarımına bağlı olarak)

bağlıdır.³ Örneklem büyüklüğü, gruplar arasında küçük bir anlamlı fark tespit edebilecek kadar yeterli olmalıdır. Küçük örneklem büyüklüğü sadece sonucun önemsizliğinin değil, aynı zamanda çalışmanın gücünün düşüklüğünün de sebebi olabilir.⁴ Örneklem büyüklüğünün artırılması ise deneyi hem daha pahalı hâle getirir hem de deneyin yürütülmesini zorlaştırır. Ayrıca örneklem büyüklüğünü artırırken diğer faktörlerin sabit tutulması genellikle zordur.⁵ Hayvanlar üzerinde yürütülen araştırmalar hem insanların hem de evcil hayvanların sağlığına ve refahına çok büyük katkılar sağlamış, dolayısıyla alternatif yöntemlerin geliştirilmesinde iyi ilerlemeler kaydedilmiştir. Bütün bunlara rağmen bu tür çalışmalarda deney hayvanları zarar görebilir ve bunu en aza indirmek için mümkün olan her şey yapılmalıdır. Hayvan sayısını azaltmak için yapılması gerekenler;

- Grup büyüklüğünün rasyonel seçimi (pilot çalışma, güç analizi),
- Dikkatli deney tasarımı,
- Her bir hayvanın kullanımının maksimize edilmesi,
- Hayvan kaybının en aza indirgenmesi;
- İstatistiksel analiz (minimum hayvan sayısından maksimum bilgi).

olarak önerilmektedir.⁶ Analiz için karmaşık istatistiksel modeller gerektiren karmaşık deneysel tasarımlar bile genellikle tek bir anahtar veya kritik bir soru ile basitleştirilebilir, böylece gerekli örneklem büyüklüğünü tahmin etmek için basit formüller kullanılabilir.⁷ Hayvan araştırmaları, klinik çalışmaların klinik öncesi aşamasında önemli bir rol oynamaktadır. Diğer çalışmalarda olduğu gibi hayvan çalışmalarında da örneklem büyüklüğünün hesaplanmasında güç analizi yaklaşımı önerilmektedir. Ancak, güç analizi yöntemi, örneklem büyüklüğünü belirlemenin en güçlü yolu olsa da standart sapma veya etki büyüklüğü gibi gerekli bilgilere sahip olmak her zaman mümkün değildir. Bu tür durumlarda güç analizi yaklaşımına alternatif bir yöntem olarak kaynak eşitlik yöntemi kullanılabilir.^{8,9} Kaynak eşitlik yöntemi, örneklem hacmini belirlemek için kullanılan ve azalan değer kuralına dayanan alternatif bir yöntemdir. Bu yöntemde örneklem büyüklüğü, grup/deneme, blok ve hata serbestlik derecelerine bağlı olarak hesaplanmaktadır. Biyolojik önemi ortaya çıkarmak için yapılan biyomedikal çalışmalarda örneklem büyüklüğüne karar verilirken, genellikle hata serbestlik derecesinin $10 \leq \text{Hata Serbestlik Derecesi} \leq 20$ arasında değer alması tavsiye edilmektedir. Buna göre hata serbestlik derecesinin üst sınırdan küçük olması durumunda çalışmaya eklenecek her bir denek, çalışmadan daha fazla bilgi elde edilmesini sağlayacak, ancak hata serbestlik derecesinin üst sınırdan daha büyük olması durumunda çalışmaya denek eklenmesi çalışmadan elde edilecek sonucu çok fazla etkilemeyecektir.¹⁰ Etki büyüklüğünü belirlemenin zor olabileceği ve/veya standart sapmanın tahmin edilemeyeceği temel araştırmalarda bu yöntemin kullanılma olasılığı yüksektir. Bireyler arası varyasyon hakkında makul bir tahmin elde etme ihtiyacına dayanan yöntem, birçok faktörün dikkate alındığı faktöriyel veya blok tasarımları gibi kompleks tasarımlarda kolayca kullanılabilir.¹¹

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Yöntem, birçok laboratuvar deneyinde olduğu gibi, laboratuvar hayvanlarının kullanıldığı çalışmalarda da örneklem büyüklüğünü tahmin etmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Örneklem büyüklüğünü tahmin etmede

bu yöntemin kullanılması diğer yöntemleri kullanmak kadar doğru olmayabilir, ancak örneklem büyüklüğünün belirlenmesinde kullanılan diğer yöntemlerde dikkate alınan parametrelere (etki büyüklüğü, standart sapma vb.) ait değerlerin tahmin edilememesi veya tahmin edilmesinin çok zor olduğu durumlarda uygun örneklem büyüklüğünün ne olması gerektiğine dair bir ipucu verir.¹² Yönteme göre tamamen randomize bir tasarımın söz konusu olduğu durumlarda örneklem büyüklüğü;

$$E = N - T \quad (1)$$

eşitliği kullanılarak, randomize blok tasarımı söz konusu olduğunda ise

$$E = N - T - B + 1 \quad (2)$$

eşitliği kullanılarak hesaplanmaktadır. Eşitlik 1 ve 2'de yer alan N toplam gözlem sayısını, T deneme/grup sayısını, B ise blok sayısını göstermektedir. Gerek Eşitlik 1'de gerekse Eşitlik 2'de yer alan E , örneklem büyüklüğünün optimum olup olmadığını temsil eden bir değerdir. $E < 10$ olması örneklem büyüklüğünün yeterince büyük olmadığı, $E > 20$ ise örneklem büyüklüğünün çok büyük olduğu anlamına gelir.^{2,3,13} Bu yöntem varyans analizine dayanmasına rağmen tüm hayvan deneyleri için geçerlidir. E değeri varyans analizinde yer alan hata serbestlik derecesinden başka bir şey değildir. E 'nin değeri 10-20 arasında olmalıdır. E 'nin 10'dan küçük olması durumunda, daha fazla hayvan eklemek, daha anlamlı sonuç alma şansını artıracaktır, ancak 20'den fazla ise, daha fazla hayvan eklemek anlamlı sonuç alma şansını artırmayacaktır. E 'yi 10-20 arasında tutan herhangi bir örneklem büyüklüğü yeterli kabul edilmelidir. Yöntemin uygulanması kolaydır, ancak güç analizi yöntemi kadar sağlam (robust) olarak kabul edilemez.^{14,15} Araştırmacılara kolaylık sağlaması açısından yukarıda verilen eşitlikler ve açıklamalardan yararlanarak aşağıdaki kurallar yazılabilir.

KURAL 1

Deney için planlanan grup sayısına 10 ekle. Elde edilen sayıyı, grup sayısına böl. Bu işlem sonucunda elde edilen sayı (sonuç tam sayı değilse elde edilen sayıyı kendisinden büyük ilk tamsayıya yuvarla) her bir grupta yer alacak MİN hayvan sayısıdır.

KURAL 2

Deney için planlanan grup sayısına 20 ekle. Elde edilen sayıyı, grup sayısına böl. Bu işlem sonucunda elde edilen sayı (sonuç tam sayı değilse elde edilen sayıyı kendisinden büyük ilk tamsayıya yuvarla) her bir grupta yer alacak MAX hayvan sayısıdır.

BULGULAR

Kurallar dikkate alındığında, bir araştırmada her bir grupta eşit sayıda hayvan kullanma koşulu ile kullanılması gerekli hayvan sayıları [Tablo 1](#)'de görülmektedir.

TABLO 1: Deney hayvanı sayıları.

Deneme/Grup sayısı	Her bir grup için		Toplam	
	Min	Maks	Min	Maks
2	6	11	12	22
3	5	8	15	24
4	4	6	16	24
5	3	5	15	25
6	3	5	18	30
7	3	4	21	28
8	3	4	24	32
9	3	4	27	36
≥ 10	2	3	-	-

Not: Hayvan sayısı tam sayı olmak zorunda olduğundan ondalıklı değerler kendisinden büyük ilk tam sayıya yuvarlanmıştır.

Araştırmacılara fikir vermesi amacıyla [Tablo 1](#)'de görülen minimum ve maksimum hayvan sayıları için G*Power 3.1.9.4 paket programı kullanılarak "güç analizi" yapılmıştır. Bu paket programda kullanılan ve Cohen (1992) tarafından ifade edilen farklı etki büyüklüğü değerleri için elde edilen güç değerleri [Tablo 2](#)'de görülmektedir.¹⁶ [Tablo 2](#)'deki güç değerleri için hipotezin iki yanlı ve birinci tür hata değerinin 0,05 olduğu varsayılmıştır.

TABLO 2: Güç analizi sonuçları.

Grup sayısı	Her bir gruptaki gözlem sayısı	Etki büyüklüğü	Güç
2	Minimum = 6	Küçük = 0,2	0,061
		Orta = 0,5	0,123
		Büyük = 0,8	0,241
		Çok büyük = 1,8	0,801
	Maksimum = 11	Küçük = 0,2	0,073
		Orta = 0,5	0,200
		Büyük = 0,8	0,431
		Çok büyük = 1,26	0,802
3	Minimum = 5	Küçük = 0,1	0,058
		Orta = 0,25	0,109
		Büyük = 0,4	0,213
		Çok büyük = 0,92	0,806
	Maksimum = 8	Küçük = 0,1	0,066
		Orta = 0,25	0,160
		Büyük = 0,4	0,352
		Çok büyük = 0,69	0,810
4	Minimum = 4	Küçük = 0,1	0,057
		Orta = 0,25	0,097
		Büyük = 0,4	0,182
		Çok büyük = 0,98	0,805
	Maksimum = 6	Küçük = 0,1	0,061
		Orta = 0,25	0,133
		Büyük = 0,4	0,289
		Çok büyük = 0,75	0,807
5	Minimum = 3	Küçük = 0,1	0,054
		Orta = 0,25	0,082
		Büyük = 0,4	0,142
		Çok büyük = 1,13	0,802
	Maksimum = 5	Küçük = 0,1	0,060
		Orta = 0,25	0,121
		Büyük = 0,4	0,258
		Çok büyük = 0,78	0,803
6	Minimum = 3	Küçük = 0,1	0,055
		Orta = 0,25	0,085
		Büyük = 0,4	0,151
		Çok büyük = 1,06	0,805
	Maksimum = 5	Küçük = 0,1	0,060
		Orta = 0,25	0,127
		Büyük = 0,4	0,281
		Çok büyük = 0,74	0,810

Not: Gücün belirlenmesinde, kurulacak hipotezlerin iki yanlı, birinci tür hata değerinin 0,05 olduğu varsayılmıştır.

Tablo 2'de de görüldüğü üzere hem grup sayısı hem de her bir gruptaki hayvan sayılarına göre gücün 0,80 ve üzeri bir değere sahip olması ancak etki büyüklüğünün “çok büyük” olduğu durumlarda söz konusudur.

Bu yöntem, uygun örneklem büyüklüğünün $10 < E < 20$ arasında olduğunu kabul eder. Kullanılan hayvan sayısının 10'dan az olması durumunda Tip II hata olasılığı (yanlış-negatif sonuç) büyük ölçüde artar. Kullanılan hayvan sayısının 20'den fazla olması durumunda ise hayvanların maliyeti ve kullanımı yalnızca mütevazı bir kazanç için artmış olacaktır. Yöntem ayrıca ikiden fazla grup olması durumunda grup başına düşecek denek sayısının azaltılabileceğini göstermektedir. Bu yöntem yararlı bir yöntemdir ancak hakemler, finansman kuruluşları ve etik inceleme komiteleri, yanlış olmasına rağmen örneklem büyüklüğünü belirlemede objektif bir yöntem olduğunu düşündükleri için güç analizinin kullanılmasını giderek daha fazla talep etmektedirler.¹⁷ Eşitlik 1 ve 2 dikkatli incelendiğinde, kaynak eşitlik yönteminin aslında standart sapmanın iyi bir tahminini elde etme gereksiniminden kaynaklandığı ifade edilebilir. Çok küçük bir deney oldukça zayıf bir tahmin değerinin elde edilmesine, çok büyük bir deney ise daha fazla deneme grubu ekleyerek daha iyi kullanılabilir kaynakların israfına sebep olur. $10 < E < 20$ olması önerilmesine rağmen bu sınırlar çok katı uygulanmamalı, deneysel birimlerin (hem etik hem de finansal olarak) maliyeti dikkate alınmalıdır.¹⁸ Bu makalenin amacı, özellikle hayvan çalışmaları için önerilen kaynak eşitlik yöntemini tanıtmaktır.

TARTIŞMA

Laboratuvar hayvanlarının kullanımı hem insan sağlığını korumak hem de insanları rahatsız eden birçok hastalığa karşı yeni tedaviler geliştirmek için gereklidir. Ancak hayvan deneyleri pahalıdır, zaman alıcıdır ve çok sayıda etik sorun ortaya çıkarmaktadır. Üstelik deney süresince hayvanların rahatsızlığı veya ölümü gibi pratikte karşılaşılabilecek nedenlerden dolayı sınırlı olup, deneylerde hayvan kullanımı için hem bilimsel hem de etik olarak haklı gerekçeler olması önemlidir.¹⁹ Örneklem büyüklüğü hesaplaması, hata olasılığını azaltmak, etik standartlara uymak, araştırmanın lojistiğini tanımlamak ve finansman kuruluşları tarafından değerlendirildiğinde başarı oranlarını iyileştirmek için projeye dâhil edilmesi gereken önemli bir unsurdur.²⁰ Örneklem büyüklüğünü belirlemek için mevcut yöntemlerin hiçbiri tamamen tatmin edici değildir. Özellikle kalitatif araştırma yapan araştırmacılar, örneklem büyüklüğünün epistemolojik, metodolojik ve pratik konularla ilgili bir dizi faktöre bağlı olduğunu ve “kaç tane” sorusuna doğrudan yanıt verilemeyeceğini savunmaktadırlar.²¹ Örneklem büyüklüğü ile ilgili olarak önerilen yöntemler arasında üzerinde en fazla durulanı “güç analizi”dir. Ancak bu yöntem karmaşıktır ve araştırmacı tarafından bilimsel açıdan ilgi çekebilecek asgari etki büyüklüğüne karar verilmesi gerektiğinden öznel bir unsur içermektedir. Seçilen deney materyalinin duyarlılığı gibi, dikkate alınmayan birkaç önemli değişkenden dolayı gerçekçi olmayan bir hassasiyete de sahiptir ve ilave bir anlayış seviyesi gerektiren özel bir yazılıma erişim gerektirir. İkinci yöntem, “geleneksel yaklaşım” olarak ifade edilmektedir. Bu yöntemde göre, araştırmacıların çoğu kendi çalışmalarında genellikle benzer işler yapan diğer araştırmacılar tarafından görünüşte başarılı bir şekilde kullanılan örneklem büyüklüklerini seçmektedir. Çeşitli deney türleri ve hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında bu, mantıklı bir yaklaşım gibi görünmektedir. Bu tür bir yaklaşım, çalışma materyaline aşina olan ve hâlihazırda önerilene benzer birkaç deney yapmış deneyimli bir araştırmacı için iyi olabilir, ancak yeni bir araştırma konusu başlatanlar için daha az tatmin edicidir. Örneklem büyüklüğünü belirlemede alternatif yöntemlerinden biri olan üçüncü yöntem ise “kaynak eşitlik” yöntemidir. Bu yöntem, “güç analizi”nin matematiksel gerekçelerine sahip olmamakla birlikte, muhtemelen çok küçük yanlış negatif sonuçlara veya gereksiz yere büyük miktarda kaynak kaybına neden olabilecek denemelerden kaçınmak için kullanışlı bir yaklaşımdır.¹⁷

SONUÇ

Genel olarak, kaynak eşitlik yönteminin, nispeten büyük deneme etkilerinin beklendiği karmaşık biyolojik deneyler için uygun olması muhtemeldir. Yöntem özellikle güç analizi tercih edilmesine rağmen kullanılmasının zor veya imkânsız olduğu ve özellikle sonuçların varyans analizi kullanılarak değerlendirileceği çeşitli deneme gruplarını içeren küçük ve karmaşık biyolojik deneylerin söz konusu olduğu çalışmalarda tercih edilmelidir.^{2,18} Uygun bir örneklem büyüklüğünün hesaplanması, yalnızca doğru sonuçların elde edilmesinde bir amaç olarak düşünülmemelidir. Örneklem büyüklüğü sorunu ile ilgilenmek, çalışmanın geçerliliğini test etmenin, araştırma sorularını teyit etmenin ve yapılacak araştırmayı ve olası sonuçlarını netleştirmenin iyi bir yoludur.²² Ayrıca örneklem büyüklüğü hesaplamaları, bilerek aşırı veya düşük güce sahip bir araştırmacının yapılması etik dışı olduğundan etik komitelere sunulması gereken veya bazı hakemli dergiler için çalışma protokolünün önemli bir parçasıdır.²³

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Bu çalışma hazırlanırken tüm yazarlar eşit katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

1. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J.* 2002;43(4):244-58. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
2. Festing MFW. Design and statistical methods in studies using animal models of development. *ILAR J.* 2006;47(1):5-14. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
3. Festing MFW. Principles: the need for better experimental design. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24(7):341-5. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
4. Shah H. How to calculate sample size in animal studies? *Natl J Physiol Pharm Pharmacol.* 2011;1:35-9.
5. Lazic SE. Four simple ways to increase power without increasing the sample size. *Lab Anim.* 2018;52(6):621-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
6. 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. [[PubMed](#)]
7. Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample size determination. *ILAR J.* 2002;43(4):207-13. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
8. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malays J Med Sci.* 2017;24(5):101-5. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
9. Charan J, Biswas T. How to calculate sample size for different study designs in medical research? *Indian J Psychol Med.* 2013;35(2):121-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
10. Cangür Ş, Ankaralı H, Ankaralı S. [Special experimental designs using laboratory animals and sample size: review]. *Türkiye Klinikleri J Biostat.* 2013;5(2):75-88.
11. Festing MF. Study design. In: Martic-Kehl MI, Schubiger PA, eds. *Animal Models for Human Cancer: Discovery and Development of Novel Therapeutics.* 1st ed. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.; 2016. p.27-40.
12. Singh AS, Masuku MB. Sampling techniques and determination of sample size in applied statistics research: an overview. *IJECM.* 2014;2(11):1-22.
13. Yan F, Robert M, Li Y. Statistical methods and common problems in medical or biomedical science research. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2017;9(5):157-63. [[PubMed](#)]
14. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4(4):303-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
15. Ilyas M, Adzim M, Simbak N, Atif A. Sample size calculation for animal studies using degree of freedom (E); an easy and statistically defined approach for metabolomics and genetic research. *Curr Trends Biomedical Eng & Biosci.* 2017;10(2):555785. [[Crossref](#)]
16. Cohen J. A power primer. *Psychol Bull.* 1992;112(1):155-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
17. Festing MFW. On determining sample size in experiments involving laboratory animals. *Lab Anim.* 2018;52(4):341-50. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
18. Festing MF. Experimental design and statistical analysis. In: Hau J, Schapiro SJ, eds. *Handbook of Animal Laboratory Animal Science. Essential Principles and Practices.* Vol. 1. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2011. p.369-400. [[Crossref](#)]
19. Festing MF. How to reduce the number of animals used in research by improving experimental design and statistics. *ANZCCART Fact Sheet T10.* 2011b;1-11.

20. Martínez-Mesa J, González-Chica DA, Bastos JL, Bonamigo RR, Duquia RP. Sample size: how many participants do I need in my research? *An Bras Dermatol.* 2014;89(4):609-15. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
21. Vasileiou K, Barnett J, Thorpe S, Young T. Characterising and justifying sample size sufficiency in interview-based studies: systematic analysis of qualitative health research over a 15-year period. *BMC Med Res Methodol.* 2018;18(1):148. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
22. Pye V, Taylor N, ClayWilliams R, Braithwaite J. When is enough, enough? Understanding and solving your sample size problems in health services research. *BMC Res Notes.* 2016;9(1):90. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
23. Pourhoseingholi MA, Vahedi M, Rahimzadeh M. Sample size calculation in medical studies. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2013;6(1):14-7. [[PubMed](#)]