

## Kontrole

- Nužan dio eksperimentalnog dizajna u biologiji i prirodnim znanostima
- **Kontrola je referenca sa kojom se rezultat eksperimentalne manipulacije može se usporediti.**



Dodatak vitamina u hrani laboratorijskih štakora dovodi do dugovječnosti.

Idealna kontrola?

Idealna kontrola bi bio isti štakor netretiran

Težimo idealizaciji kontrole

Potrebna je kontrolna grupa koja je u svakom smislu **identična** tretiranoj (eksperimentalnoj) grupi osim po eksperimentalnom tretmanu



## Što znači – identična u svakom smislu?

- Pitanje koje treba definirati u skladu s hipotezom
- U navedenom slučaju – ista linija životinja, isto porijeklo, isti uvjeti kultivacije i sl.
- Kontrolna grupa nam omogućuje praćenje utjecaja dodatka vitamina u hrani



## KONTROLA

- Svaki skup replika koji prolazi isti tretman (identična u svakom smislu) kao i eksperimentalan set, osim izlaganja faktoru od interesa
- U balansiranom dizajnu veličine tretiranog uzorka i svih kontrolnih uzoraka trebaju biti identične

## Priistranost eksperimentatora obzirom na kontrolnu skupinu

Istraživač treba biti indiferentan u određivanju subjekta i kontrole.

Nasumično dodjeljivanje (uzorkovanje) s istim dodatnim pretpostupcima

### Tipovi pokusa s obzirom na kontrolnu skupinu

- **slijepi** (procjenjivač ne zna je li uzorak iz tretirane ili netretirane skupine)
- **dvostruko slijepi** (procjenjivač ni uzorak ne znaju u kojoj su skupini, dodatno se pokus ojačava placebo = potpuno identičan pravom tretmanu, osim parametra koji se istražuje)

## Eksperimentalni dizajn obzirom na kontrolu

### • Tipovi kontrolnih skupina

1. **Negativna** (netretirana)
2. **Pozitivna kontrola** (npr. manipulacija poznatim tretmanom za koji znamo ishod)
3. **Povijesna**



H: Novi tretman u liječenju bolesti daje bolje rezultate od trenutno primjenjivanog.

- 1) Usporedba novog tretmana i netretiranog – ne odgovara na pitanje nego pokazuje odnos tretiranog i netretiranog (jednostavan dizajn, jednofaktorijalni s dvije razine)
- 2) Uvođenje samo pozitivne kontrole (**Što bi se dogodilo da imamo samo pozitivnu kontrolu i tretman? Koji nam podaci mogu promaknuti?**) (jednostavan dizajn, jednofaktorijalni s dvije razine)
- 3) Uvođenje dviju kontrola – **pozitivne i negativne**
- 4) Primjena “**povijesne**” kontrole tj. Postojećih znanja o primjenjivanoj metodi (kada koristiti)?

## Efektivnost kontrole

- Istraživanje “srčanog elektrostimulatora” na dugovječnost štakora.  
Kontrolna skupina?

### Etičnost kontrola

- Bolje ne eksperimentirati uopće nego izbaciti kontrole (ili koristiti loše i zastarjele statistike kao kontrole (povijesne kontrole)
- Primjena nebalansiranog dizajna



## Razmislite o izjavi

- “uspio sam završiti sve eksperimente; jedino što mi još preostaje jest provedba mjerenja na kontrolnoj skupini”

Uzorci u kontrolnoj skupini smiju se razlikovati od uzoraka u eksperimentalnoj skupini samo u varijabli koje su od interesa za eksperiment . Na ovaj način dodaje se nova varijabla: vrijeme.

Sada se razlika između kontrolne i tretirane grupe više ne može pripisati tretmanu jer može biti da su se uvjeti promijenili tijekom vremena. Vrlo teško bi bilo uvjeriti “skeptika” da su uvjeti , oprema, postupak ili znanstvenik nisu promijenili u vremenu od pokusnih subjekata i kontrole . **Ovaj problem je vrlo sličan problemima povijesnih kontrola.**



## Razmislite o izjavi

- “uspio sam završiti sve eksperimente; no rezultati daju sumnju pa bih trebao napraviti još neke kontrolne provedbe”

Uzorci u kontrolnoj skupini smiju se razlikovati od uzoraka u eksperimentalnoj skupini samo u varijabli koje su od interesa za eksperiment . Na ovaj način dodaje se nova varijabla: vrijeme.

Vrlo teško bi bilo uvjeriti “skeptika” da su uvjeti , oprema, postupak ili znanstvenik nisu promijenili u vremenu od prve provedbe do njene nadopune.



Kako kontroliramo reagense i metodu reakcije PCR?

Koje kontrole koristite, i zašto?

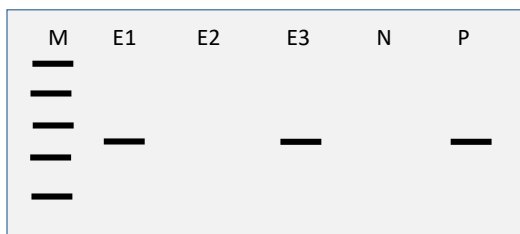
Čemu sve služi pozitivna kontrola?



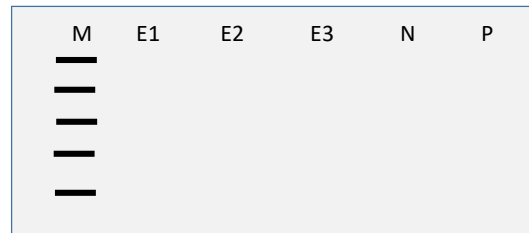
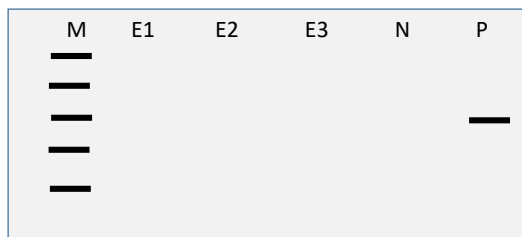
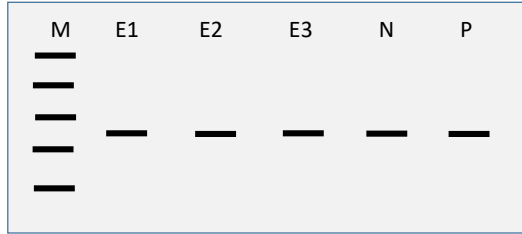
Kako kontroliramo reagense i metodu reakcije PCR?

Koje kontrole koristite, i zašto?

Čemu sve služi pozitivna kontrola?



Negativnom kontrolom doznajete da nemate kontaminaciju, ili da primeri ne umnazaju nespecificno, što doznajete pozitivnom kontrolom



### KONTROLE METODE

## Dodatna kontrola metode, drugim metodolozkim pristupima s istim ciljem

- Osim pažljivim odabirom pozitivnih kontrola, KONTROLA METODE podrazumijeva **upotrebu druge metode s ciljem postizanja istog rezultata**
- Smanjuju rizik ali ne eliminiraju opasnost dobivanja krivog rezultata zbog nepoznatih efekata
- Najbolje je uvijek koristiti drugu (treću) alternativu i kemikalije i metode



Koji su efekti kofeina na krvni tlak ? – osnovno pitanje



Potpitanja: Da li kava s kofeinom djeluje na krvni tlak i da li je za to odgovoran kofein?

**Definirajte kontrole**



Da li kava s kofeinom djeluje na krvni tlak i da li je za to odgovoran kofein?

REZULTAT

kava bez kofeina neg. kontrola	10
kava s kofeinom	30

kofein

kava bez kofeina	10
kava s kofeinom	30
vode s kofeinom	10

kofein i jos nesto iz  
kave...???

kava bez kofeina	10
kava s kofeinom	30
vode s kofeinom	10
voda	5

kofein, voda + nesto  
drugo iz kave

VAŽNOST NEGATIVNE KONTROLE





## REZULTAT

Povećanje tlaka (%)	tretman
0	bez
5	4 šalice vode na dan
10	4 šalice kave bez kofeina na dan
10	4 šalice vode s kofeinom (ista količina) na dan
30	4 šalice kave s kofeinom (ista količina) na dan

Čemu služi grupa bez tretmana?

pokazuje na psihološki učinak mjerenja nije bitan (jer je bio dovoljno velik uzorak)

**VAŽNOST NEGATIVNIH KONTROLE**

**ŠTO NEDOSTAJE?**

kofein, voda + nešto drugo iz kave



## Da li kava s kofeinom djeluje na krvni tlak i da li je za to odgovoran kofein?

Drugi setovi rezultata

Exp 1

Tretman	porasta KT (%)
voda	10
Voda s kofeinom	10

Neočekivani rezultat - sumnja

Exp 2

Tretman	porasta KT (%)
voda	10
Voda s kofeinom	10
Lijek za porast KT	30

Dokaz da mjerenje radi – pozitivna kontrola, ali da je količina kofeina nedostatna

Exp 3

tretman	porasta KT (%)
voda	10
Voda s kofeinom (ekvivalent 1 šalice kave)	10
Voda s kofeinom (ekvivalent 2 šalice kave)	12
Voda s kofeinom (ekvivalent 3 šalice kave)	15
Voda s kofeinom (ekvivalent 4 šalice kave)	20
Lijek za porast KT	30



### VAŽNOST POZITIVNE KONTROLE

Povećanje tlaka (%)	tretman
0	bez
0	4 šalice vode na dan (3)
0	4 šalice kave bez kofeina na dan (1)
0	4 šalice vode s kofeinom (ista količina) na dan (2)
0	4 šalice kave s kofeinom (ista količina) na dan (1)

0	Lijek za porast KT
---	--------------------

na temelju pozitivne kontrole - jasno da nešto nije dobro u izvedbi eksperimenta

Inače bi zaključak bio da kofein ne djeluje na tlak



Zanima nas signalni put koji potiče NGF\*, preko vezanja na kinazni receptora TrkA što dovodi do fosforilacije proteina Akt

**Treba definirati koji uvjet moraju zadovoljiti stanice za istraživanje (moraju imati receptor za NGF)**

**Treba definirati eksperiment u kojem bude mjerljiva promjena fosforilacije**

*\*NGF je mali protein koji određene stanice potiče da postaju "neuron-like" i kasnije neuroni. TrkA je receptor kinaza, NGF se veže na receptor i potiče fosforilaciju kinazne domene unutar stanice– prijenos fosfata na Akt*

Negativna kontrola u eksperimentima u kulturi tkiva (stanica)

P: da li NGF\* (nerve growth factor) uzrokuje fosforilaciju proteina Akt ?

### KOJE SU KONTROLE POTREBNE ?

- EXP:
1. stanice tretirane NGF-om (NGF se otapa u puferu X)
  2. netretirane stanice – **NEGATIVNA kontrola 1**
  3. ????

\*NGF se otapa u puferu – tretman puferom **NEGATIVNA kontrola 2**



## Pozitivne kontrole u ovom eksperimentu

P1 Kontrola koja ukazuje da li je signal NGF uopće prenesen u stanice (treba pratiti promjenu receptora – Trk protein)

➤ *Na temelju toga saznati koliko **NGFa** je potrebno za fosforilaciju (aktivaciju) receptora TrkA*

P2 Kontrola da se događa aktivacija Akt upotrebom nečeg za što se zna da aktivira Akt (to je IGF1)

➤ *Kontrola koja pokazuje da je fosforilaciju proteina Akt moguće mjeriti*



Uzorak 1-3	Ništa – neg. Kontrola	}	Neg. kont
Uzorak 4-6	Pufer (isti za oba faktora rasta)		
Uzorak 7-9	NGF, razina dostatna da aktivira TrkA, u puferu		
Uzorak 10-12	IGF, razina dostatna da stimulira IGF receptor, u puferu – <b>pozitivna kont</b>		

Dodatan parametar za mjerenje

## Ishod 1 (kompletan eksperiment, 1. set rezultata):

Plate	Treatment	Akt activation	TrkA activation	IGF-1R activation
1	Nothing	(-)	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)	(-)
4	Buffer	1%	2%	0%
5	Buffer	3%	3%	2%
6	Buffer	2%	0%	1%
7	IGF-1	220%	3%	500%
8	IGF-1	380%	8%	625%
9	IGF-1	340%	4%	400%
10	NGF	410	745%	4%
11	NGF	290	333%	4%
12	NGF	320	530%	5%

### Zaključak 1

Pozitivna kont – radi; IGF aktivira Akt fosforilacija je mjerljiva

Dodano je dovoljno NGF da aktivira TrkA

NGF aktivira Akt jednako uspješno kao i IGF

## Ishod 2 (kompletan experiment, 2. set rezultata):

Plate	Treatment	Akt activation	TrkA activation	IGF-1R activation
1	Nothing	(-)	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)	(-)
4	Buffer	1%	2%	0%
5	Buffer	3%	3%	2%
6	Buffer	2%	0%	1%
7	IGF-1	220%	3%	500%
8	IGF-1	380%	8%	625%
9	IGF-1	340%	4%	400%
10	NGF	3%	745%	4%
11	NGF	7%	333%	4%
12	NGF	4%	530%	5%

### Zaključak2

NGF aktivira receptor ali ne Akt !!!; uspješnost mjerenja aktivacije Akt pokazana je s IGF-1 (poz. kont.)



## bez IGF pozitivne kontrole, 2. set rezultata

Plate	Treatment	Akt activation	TrkA activation
1	Nothing	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)
4	Buffer	1%	2%
5	Buffer	3%	3%
6	Buffer	2%	0%
7	NGF	3%	745%
8	NGF	7%	333%
9	NGF	4%	530%

Sumnja: ili nema aktivacije ili antitijela za detekciju fosforiliranog Akt ne rade



## bez TrkA pozitivne kontrole, 2. set rezultata

Plate	Treatment	Akt activation	IGF-1R activation
1	Nothing	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)
4	Buffer	1%	0%
5	Buffer	3%	2%
6	Buffer	2%	1%
7	IGF-1	220%	500%
8	IGF-1	380%	625%
9	IGF-1	340%	400%
10	NGF	3%	4%
11	NGF	7%	4%
12	NGF	4%	5%

Sumnja: ili stvarno nema aktivacije ili je nedostatna količina NGFa




## Ishod 3 (kompletan experiment, treći set rezultata)

Plate	Treatment	Akt activation	TrkA activation	IGF-1R activation
1	Nothing	(-)	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)	(-)
4	Buffer	1%	2%	0%
5	Buffer	3%	3%	2%
6	Buffer	2%	0%	1%
7	IGF-1	220%	3%	500%
8	IGF-1	380%	8%	625%
9	IGF-1	340%	4%	400%
10	NGF	50%	745%	4%
11	NGF	40%	333%	4%
12	NGF	32%	530%	5%

Akt je znatno slabije aktiviran NGF-om nego IGFom, iako je aktivacija receptora visoka



## bez IGF-R pozitivne kont., treći set rezultata

Plate	Treatment	Akt activation	TrkA activation
1	Nothing	(-)	(-)
2	Nothing	(-)	(-)
3	Nothing	(-)	(-)
4	Buffer	1%	2%
5	Buffer	3%	3%
6	Buffer	2%	0%
7			
8			
9			
10	NGF	50%	745%
11	NGF	40%	333%
12	NGF	32%	530%

NGF aktivira Akt, nema šanse da uočimo značajniji učinak drugog faktora rasta  
Ne zna se da li je ovakva razina aktivacije fiziološki važna



## Kontrole kao dio eksperimentalnog dizajna

- Obavezno definirati u ovisnosti sa svim mogućim ishodima
- Utemeljeno na postojećem znanju (dugotrajno i temeljito praćenje dostupne relevantne literature)



## Apsolutna mjerenja

- Ukoliko je moguće pokušajte također izvršiti mjerenja koja su apsolutna; izraziti ih u vrijednostima koje su univerzalno prihvaćene kao standardi.

npr. Sadržaj RA u kalusu raslom na mediju s dodatkom tvari X u odnosu na komercijalnu RA (standard) za HPLC visoke čistoće.



## Standardi

- Univerzalno prihvaćene vrijednosti upotrebljive su i za druge istraživače (moguća je šira komparacija rezultata)

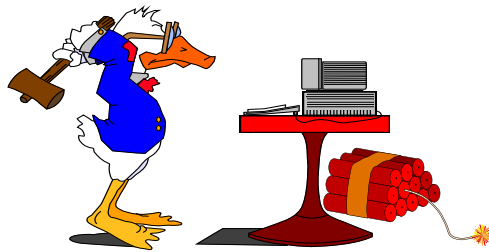




## Eksperimenti u kojima ne trebaju kontrole

- Koji od tri kultivara vinove loze najbolje rastu na pjeskovitom tlu
- Kako frekvencija prihranjivanja utječe na rast rajčice (uspoređujemo npr. dnevnu, tjednu i dvotjednu prihranu)

## Izvedba eksperimenta



Osigurati potrebne aparature, kemikalije,  
eksperimentalni materijal

## Istraživačke metode

- Identične u bezbroj različitih aplikacija
- Primjenjujemo ih bez kritike
- Po utemeljenim protokolima....
- I bez analize same metode i njene validacije za specifičnu primjenu

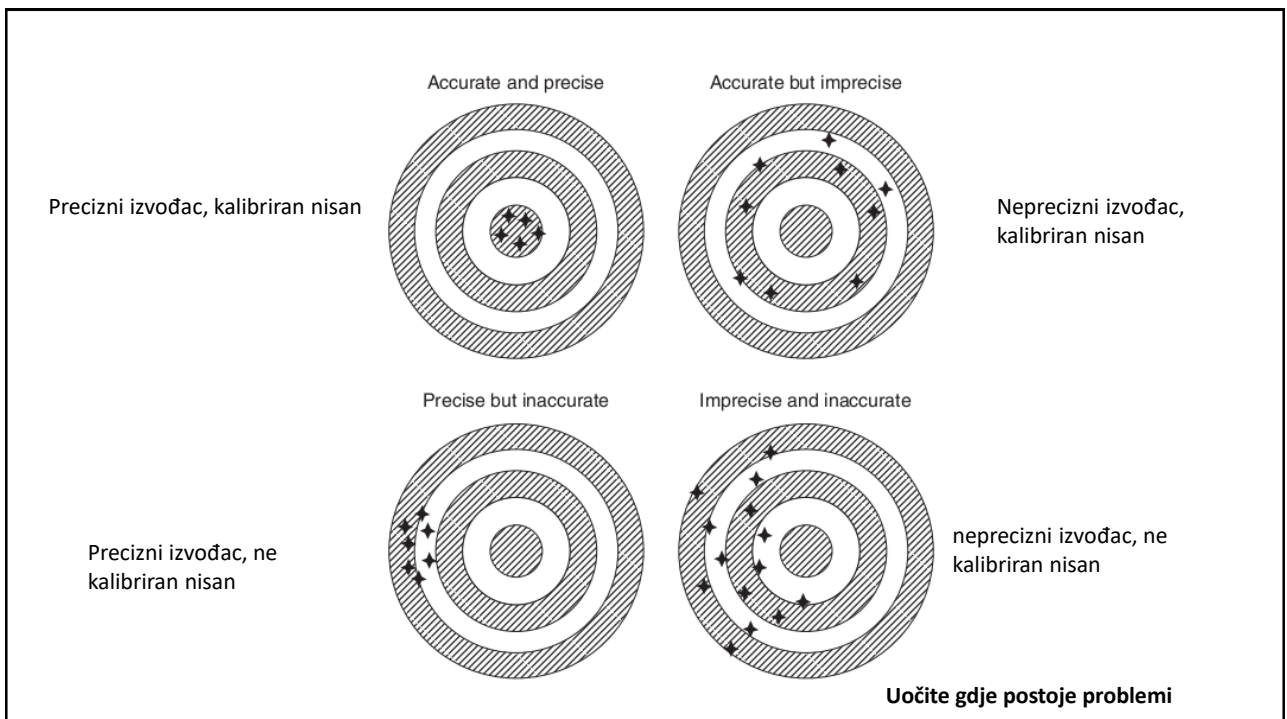
### **Proučiti princip rada uređaja i protokol /metodu**

Treba odvojiti dovoljno vremena da se prouče svojstva i funkcija kemikalija i enzima koji će biti upotrebljeni, te uređaja koji se koristi

Osim što smanjuje mogućnost pogreške, takvo znanje daje slobodu izmjene i poboljšanje osnovnog protokola (inovaciju).

## Kontrola mjerenja/uređaja (netočnost i nepreciznost)

- Uključuje provjeru uređaja i podešavanje mjerne skale ako je potrebno
- Ne oduzima puno vremena
- Problem **netočnih** mjerenja (krivo kalibriran uređaj)
- Problem **nepreciznih** mjerenja (neprecizan uređaj ili provedba)
- Posvetiti vrijeme procjeni točnosti mjerenja



## Ponavljanje mjerenja/nekalibriran uređaj

- Dobivanje istih rezultata višestrukim ponavljanjem govori u prilog preciznosti pri mjerenju ali ne i točnosti rezultata (ako je uređaj nekalibriran)

**• Vaša su mjerenja ponovljiva ali ponovljivo kriva!**

## Varijabilnost unutar promatrača

Promatračev pomak

Zamislite da imate 1000 fotografija muškaraca od 25 godina te brojevima od 1 do 5 morate procijeniti dlakavost na licu. To radite oko 3 sata.

**TIJEKOM TOG VREMENA NESVJESNO MOŽEMO PROMIJENITI UVJETE KATEGORIZIRANJA**

## Rješenje problema

1. način: Detaljan opis kategorija npr. ako brkovi prelaze 80% dužine gornje usne smatraju se punima i samo takvi brkovi su kategorija 2.

### **Definiranje graničnih slučajeva**

- Sve manje od toga je kategorija 1

2. način: Definiranje graničnih slučajeva fotografijama

NA TAJ SE NAČIN SMANJUJE tzv. VARIJABILNOST UNUTAR PROMATRAČA

Istu kategorizaciju morate napraviti za još 1000 fotografija nakon mjesec dana

- Prije analize treba provesti **STUDIJU PONOVLJIVOST** što znači na određen broj fotografija iz prve analize treba ponovo procijeniti i nova procjena mora biti u skladu s onom prvom

## Dnevnici i protokoli

- Dobro bilježenje rada čini glavni ključ za učinkovitost.



## Laboratorijski dnevnik

(što je poželjno)

- Treba biti trajno i čvrsto povezan
- Bilježnica formata A4
- **Stranice - numerirane**
- Podaci se unose **neposredno** u bilježnicu u vrijeme kad su promatrani
- Memoriranje NIJE DOZVOLJENO!!!



## Laboratorijski dnevnik/2

- Podaci se unose **kemijskom olovkom (?)**
- To je posebno važno ukoliko se dnevnik koristi kao dokaz u slučaju patentiranja



## Koje podatke unosimo u Dnevnik istraživanja?

1. datum početka pokusa
2. sažeti naslov pokusa
3. kratak opis svrhe (cilja) pokusa, tj. hipoteze koja se provjerava
4. opis pokusnih skupina
5. opis pokusnog postupka
6. zapažanja tijekom pokusa
7. rezultati pokusa
8. kratak zaključak o pokusu



## Laboratorijski dnevnik/3

- Svaki “ulazak” treba **biti datiran**
- Podaci ne smiju biti natrpani na stranicama;
- **Unošenje podataka i referenci treba biti takvo da se i godinama kasnije može vidjeti koji je instrument (ili kemikalija) korišten i pod kojim uvjetima.**





## Laboratorijski dnevnik/4

- Katkad je potreban i opis instrumenta
- Ukoliko je **izvršena neka preinaka u postupku odmah treba biti opisana**
- Treba zabilježiti izvor npr. kalibrirane krivulje, korekcije i sl. s datumom kada je to urađeno.
- Treba zabilježiti gdje su pohranjeni uzorci



## Laboratorijski dnevnik/5

- Određeni navodi o cilju svakog eksperimenta i **sažetak zaključaka** koji su dobiveni čini dnevnik mnogo korisnijim
- Skice, crteži, dijagrami vrlo su važni
- Važno je zabilježiti što je istinski viđeno, uključujući i pojave koje u datom vremenu nisu bile savim razumljive
- Loši, neobečavajući pokusi kao i neuspješni trebaju se detaljno zabilježiti



## Laboratorijski dnevnik/6

- Potrebno je sistematizirati slike I ilustracije, kada postoje
- Kemikalije: važno je zapisati izvor (firmu), stupanj čistoće
- Obilježavanje bočica, kemikalija, aparatura, epica i dr.
- Lociranje laboratorija, frižidera, polica, kutija kamo su spremljeni

