

Hayvan Deneylerinde Örneklem Büyüklüğünün Kaynak Eşitlik Yöntemi ile Belirlenmesi ve Güç Analizi

Determination of Sample Size in Animal Experiments with Resource Equation Method and Power Analysis

Ömer AKBULUT¹

¹ Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyosüreç Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Giresun, Türkiye

Özet

Klinik öncesi araştırmalarda hayvan deneyleri sıklıkla kullanılmaktadır. Hayvan deneylerinin projelendirilmesinde örneklem büyüklüğünün belirlenmesi için kullanılan güncel yöntemlerden biri "kaynak eşitlik yöntemi"dir. Bu çalışmada farklı araştırma tasarımları için alan yazındaki kaynak eşitlik yöntemi eşitlikleri derlendi. Ayrıca eşitlikler bu çalışmada tek grup tasarımları ve faktöriyel tasarımlar için genişletildi. Kaynak eşitlik yöntemine göre örneklem büyüklükleri ve bu örneklemelerin istatistiksel gücü belirlendi. Güç analizlerinin hesaplanmasında G*Power 3.1 yazılımı kullanıldı. Örneklem büyüklükleri tek grup tasarımında 11 ile 21 arasında, ikiden fazla bağımsız grupta ise 15 ile 25 arasında bulundu. Tekrarlı ölçümlerde örneklem büyüklükleri bağımsız gruplara göre daha küçük olup, faktöriyel tasarımlarda her bir alt grupta iki veya üç denek yeterli olduğu tespit edildi. Yöntem sürekli değişkenler için kullanılabilir. Bu yöntem ile belirlenen örneklem büyüklükleri tüm tasarımlarda, hayvan deneyleri için uygun büyüklüktedir. Ancak istatistiksel güç değerleri %80 güç düzeyine göre genellikle düşüktür.

Anahtar kelimeler: Hayvan deneyleri, İstatistiksel güç, Kaynak eşitlik yöntemi, Örneklem büyüklüğü

Abstract

Animal experiments are frequently used in preclinical research. One of the current methods used to determine the sample size in the design of animal experiments is the "resource equation method". In this study, resource equation method formulas in the literature were compiled for different research designs. In addition, the formulas are extended for single group designs and factorial designs in this study. Sample sizes and statistical power of these samples were determined according to the source equation method. G*Power 3.1 software was used to calculate the power analyses. Sample sizes were found to be between 11 and 21 in the single group design and between 15 and 25 in more than two independent groups. In repeated measurements, the sample sizes were smaller than in the independent groups, and it was found that two or three subjects were sufficient in each subgroup in factorial designs. The method can be used for continuous variables. The sample sizes determined by this method are suitable for animal experiments in all designs. However, statistical power values are generally low compared to 80% power level.

Keywords: Animal experiments, Resource equation method, Sample size, Statistical power

Yazışma Adresi: Ömer AKBULUT, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Güre Yerleşkesi, Ahmet Taner Kışlalı Cad. İİBF Binası B/Blok Kat 4. 28200 Giresun Türkiye

Telefon: +905374182843 **e-mail:** omer.akbulut@giresun.edu.tr

ORCID No (Sırasıyla): 0000-0002-8860-3513

Geliş tarihi: 31.05.2022

Kabul tarihi: 20.10.2022

DOI: 10.17517/ksutfd.1123704

GİRİŞ

Sağlık alanında sıklıkla deneysel ve yarı deneysel araştırma teknikleri kullanılmaktadır. Klinik öncesi deneysel veya yarı deneysel araştırmalarda eğer materyal olarak deney hayvanı özelliğindeki canlılar kullanılıyor ise bu çalışmalar hayvan deneyleri, kullanılan hayvanlara da deney hayvanı adı verilir (1,2).

Deney hayvanı “serbest yaşayan ve/veya çoğalan larva biçimleri dâhil, standart bir üretim merkezinde bilimsel amaçlar için üretilmiş herhangi bir omurgalı canlı” olarak tanımlanmaktadır. Sağlık bilimlerinde tıp, eczacılık ve veterinerlik araştırmalarında deney hayvanı olarak yaygın olarak fare, sıçan, kobay, tavşan, köpek, kedi, bildircin ve çiftlik hayvanları ile insan dışındaki primatlar kullanılmaktadır (1,2).

Hayvan deneyleri yürüten araştırmacılara yönetmeliklerle önemli sorumluluklar getirilmiştir (3,4). Bu sorumlulukların en önemlisi “3R” kavramı ile adlandırılmaktadır. 3R kavramı bilim yazına Russell ve Burch tarafından kazandırılmıştır (5). 3R İngilizce “Replacement, Reduction ve Refinement” kelimelerinin kısa yazılımıdır (5,6). Bu kelimelerin Türkçe anlamları sırasıyla, “Yerine koyma”, “Azaltma” ve “İyileştirme veya Refah” şeklindedir (7). “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik, 2014” metninde 3R kavramı; “Mümkün olan her durumda, canlı hayvan yerine bilimsel açıdan geçerli başka alternatif bir yöntem ya da deneme stratejisinin uygulanması, proje hedeflerinden ödün vermeden kullanılacak hayvan sayısının olabildiğince azaltılması, hayvanlara acı, eziyet, ıstırap çektirecek ve kalıcı hasar yapacak prosedürlerin iyileştirilerek hayvan refahının artırılması” olarak tanımlanmıştır (4).

Bu kavramlar içinde “azaltma” örneklem büyüklüğü ile doğrudan ilgilidir. Azaltma ilkesi; araştırmanın amaçları doğrultusunda doğru, güvenilir ve yayımlanabilir bulguları ortaya koyabilecek yeterli hayvan sayısının belirlenmesidir. Bu ilke örneklem büyüklüğünün de tanımıdır. Araştırmanın planlanması sürecinde araştırmacıların önemli sorularından biri, çalışma için gerekli ve yeterli (en az) denek sayısını belirlemektir (8,9). Çünkü gereğinden fazla örneklem büyüklüğü veri analizinde testin gücüne (power) önemli bir katkı sağlanamakta (10), emek, zaman ve bütçenin boşa harcanmasına neden olmaktadır (9). Ayrıca deney hayvanlarının “yaşama hakkı” olduğu gerçeği de dikkate alınmalıdır. Bu nedenlerle hayvan deneyleri araştırmanın amacına uygun ve mümkün olan en küçük örneklemle yürütülmesi bir gerekliliktir.

Hayvan deneyleri ile ilgili çalışan bazı araştırmacılar (10,11) hayvan sayısını azaltmak için bazı önerilerde

bulunmuşlardır. Bu öneriler; i) örneklem büyüklüğünü rasyonel tekniklerle (pilot çalışma, güç analizi vb.) belirleme, ii) deneysel tasarımı doğru ve dikkatli yapma, iii) deneyde her hayvanın kullanımını en üst düzeye çıkarma, iv) hayvan kaybını en aza indirme ve v) en az hayvan sayısından maksimum bilgi üretebilecek doğru istatistiksel analiz yöntemini seçme olarak özetlenmiştir.

Minimum hayvan sayısından doğru ve güvenilir bulgulara ulaşmak için araştırmacıların deney hayvanlarının seçiminde ve girişim sürecinde dikkate alması gereken bir dizi önlemler vardır. Bu kapsamda deneyde kullanılacak hayvanlar aynı ırk veya genotipte, aynı cinsiyette hatta aynı ana yaşı, doğum sırası, doğum adedi (tekiz-çoğuz) gibi özellikler bakımından da benzer olmaları gerekir. Denekler yaş, ağırlık, büyüklük bakımından da homojen olmalıdır. Eğer bir örnekliliği bozan eşlenik (concomitant) değişkenler varsa bunlar belirlenmeli ve veri analizinde dikkate alınmalıdır (12). Denek grupları uygulanan girişim dışında diğer çevresel faktörler (bakım besleme, barındırma, ışıklandırma vb.) aynı şartlarda tutulmalıdır. Deney öncesi ve sonrası değişkenlerin ölçümünde çok dikkatli olunmalı, gerekli doğruluk ve duyarlılıkta ölçüm yapılmalı aynı dönem ölçümlerinde zaman farklılığı en aza indirilmelidir. Tüm bu ve benzeri hususlardaki doğruluk ve dikkat denekler arası varyasyonu (hata varyasyonu) azaltacaktır. Buda daha az sayıda deney hayvanı kullanımını sağladığı gibi girişimden kaynaklanan farklılığın (gruplar arası varyasyon) daha doğru ve gerçekçi belirlenmesine imkân verecektir.

Yukarıda ifade edilen ilkeler doğrultusunda araştırmaların örneklem büyüklüğünün belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler temel özellikleri bakımından; i) Geleneksel veya önsezi yaklaşımı (tradition or common sense), ii) İstatistiksel güç analizi yöntemi (power analysis) ve iii) “Kaynak eşitlik yöntemi (KEY)” (resource equation method) şeklinde sınıflandırılmaktadır (13-15).

Geleneksel yöntem; Genellikle daha önceki araştırmaları model olarak örneklem büyüklüğünü belirleme yaklaşımıdır. Yöntemin istatistiksel dayanağı yoktur. Bazı durumlarda ise araştırmacı kendi öngörüsüne göre örneklem büyüklüğünü belirlemektedir (8,14).

Güç analizi yöntemi, örneklem büyüklüğünü belirlemede çok yaygın kullanılan bir yaklaşımdır (9,14). Ancak bu yöntem incelenen değişkenin tipi, varyansı, öngörülen istatistiksel hata düzeyleri (α ve β), deney tasarımı, etki büyüklüğü gibi birçok ön bilgiyi gerektirir (13,14,16,17,18). Ayrıca bu yöntemle sunulan örneklem büyüklükleri (8,11,17) hayvan deneyleri için oldukça yüksektir.

KEY ise güç analizinin gerekli gördüğü ön bilgilere gerek duymaz. Bu nedenle KEY güç analizi yöntemi kadar sağlam değildir (11,13,17). Ancak uygulanması kolaydır ve hesaplanan örneklem büyüklüğü deney hayvanları için uygundur. Eğer araştırmacı istatistiksel test ve testin gücünden çok bulgularındaki değerleri yorumlamayı yeterli görüyorsa bu yöntemi rahatlıkla kullanabilir (13).

Bu yöntem veri analizinde ANOVA tekniğini öngören araştırma tasarımları için geliştirilmiştir (9,19). KEY, ANOVA veri analiz tekniğinin hata serbestlik derecesini (HSD) esas almaktadır. Festing (19) Mead'a (20) atfen denemelerde hata serbestlik derecesinin 10 ile 20 arasında olması durumunda tasarımın yeterli düzeyde güvenilir sonuç üreteceğini öngörmüştür. KEY tekniği kısa yazılımla $10 \leq HSD \leq 20$ eşitliği ile ifade edilmektedir (19, 21). Yani veri analizinde HSD'ni 10 ve daha fazla olmasını sağlayan toplam örneklem büyüklüğünün gerekli, 20 ve daha küçük olmasını sağlayan örneklem büyüklüğünün yeterli olduğu varsayılmıştır. Ayrıca eşitlikteki 10 ve 20 rakamlarının kesin sınırlar olmayıp bir miktar esnetilebileceği ifade edilmiştir (22). Başlangıçta "Tam şansa bağlı tasarım" ve "Tam blok tasarımı" için geliştirilen yöntem daha sonra "Tekrarlı ölçüm tasarımlarına" uygulanmıştır (9).

KEY konusunda Türkçe alan yazında sınırlı çalışma mevcuttur. Bu kapsamda ilk çalışmalar Ankaralı ve Ankaralı (15) ile Doğan ve Doğan (11) tarafından yapılmıştır.

Bu çalışmada KEY ile temel araştırma tasarımları için alan yazında mevcut örneklem büyüklüğünün hesaplanması eşitlikleri derlenmiş, eşitlikler tek ve eşlenik grup tasarımları ile iki faktörlü faktöriyel tasarımlar için genişletilmiştir. Ayrıca farklı araştırma tasarımları için KEY yaklaşımı ile minimum ve maksimum örneklem büyüklükleri hesaplanarak etki büyüklüğü düzeyine göre bu örneklem büyüklükleri için beklenen güç (expected power) değerleri tahmin edilmiştir. Böylece alan yazında mevcut KEY ile örneklem büyüklüğü hesaplama teknikleri ve hesaplanan örneklem büyüklüklerinin güç değerlerinin birlikte değerlendirilmesine imkân sağlayacak bilgilerin derlenmesi hedeflenmiştir.

Key Eşitlikleri ve İstatistiksel Güç Hesaplama

Tek grup ve eşlenik iki grup araştırma tasarımı için örneklem büyüklüğünü hesaplamada kullanılacak KEY eşitlikleri bu çalışmada geliştirilmiştir. Bağımsız iki grup tasarımında grup başına ve toplam örneklem büyüklüklerini hesaplama formülleri Arifin ve Zahiruddin (9) ile Doğan ve Doğan (11) tarafından detaylı olarak tanımlanmıştır. İki deneme başına bağımsız grup tasarımları ve tam blok tasarımları için eşitlikler alan ya-

zında (5,9,11) kapsamlı olarak açıklanmıştır. Tekrarlı ölçüm tasarımları için KEY eşitlikleri Arifin ve Zahiruddin (9) tarafından tanımlanmıştır. İki faktörlü faktöriyel tasarım için KEY'nin genel yaklaşımı esas alınarak formül bu çalışmada geliştirilmiştir.

Ele alınan bu farklı araştırma tasarımları için minimum ve maksimum örneklem büyüklüklerini hesaplamak için eşitlikleri **Tablo 1**'de özetlenmiştir. Eşitliklerde herhangi bir bağımsız grup için denek sayısı "n" tasarım için toplam denek sayısı "N" ile ifade edilmekte, ayrıca her bir alt grupta denek sayısının eşit olması varsayılmaktadır. Her bir tasarım için minimum örneklem büyüklüğü için $HSD \geq 10$, maksimum örneklem büyüklüğü için $HSD \leq 20$ kuralı esas alınmaktadır.

Bu çalışmada hesaplanan örneklem büyüklükleri için küçük, orta ve büyük etki büyüklüğüne göre beklenen güç (power) değerleri belirlenmiştir. Bağımsız gruplarda tekrarlı ölçüm tasarımları ve iki faktörlü faktöriyel tasarımlarında sadece büyük etki için örneklem büyüklüğü ve güç tahminleri yapılmıştır.

Örneklem büyüklüğünü ve etki büyüklüğünü belirlemede ve keza istatistiksel güç analizinde G*Power 3.1 (23,24) yazılımı yaygın olarak kullanılmaktadır. Hesaplanan minimum ve maksimum örneklem büyüklükleri için güç analizleri G*Power 3.1 yazılımı ile yapılmıştır. Güç değerlerinin hesaplanmasında gerekli olduğu durumlarda $\alpha=0,05$ ve iki yanlı test ölçütleri esas alınmıştır. Etki büyüklüğü değeri olarak Cohen'in önerdiği standart etki büyüklüğü değerleri kullanılmıştır (25).

FARKLI TASARIMLAR İÇİN ÖRNEKLEM BÜYÜKLÜKLERİ VE GÜÇ

Tek ve İki Grup İçin Örneklem Büyüklüğü ve Güç

Tek grup, eşlenik ve bağımsız iki grup için hesaplanan örneklem büyüklükleri ve güç değerleri **Tablo 2**'de sunulmuştur. Tek ve eşlenik gruplarda minimum ve maksimum örneklem büyüklükleri 11 ve 21, olarak hesaplanmıştır. Bu örneklem büyüklükleri için güç değerleri büyük etki (0,80) için 0,668 ile 0,936 arasındadır. Bağımsız iki grup için minimum örneklem sayısı 12, maksimum örneklem sayısı 22'dir. Beklenen güç değerleri ise oldukça düşük olup 0,061 ile 0,431 arasındadır (**Tablo 2**).

Bağımsız Grup Tasarımında Örneklem Büyüklüğü ve Güç

İki deneme başına bağımsız grup tasarımı, "tam şansa bağlı deneme planı" veya "tek yönlü sınıflama" olarak adlandırılır. Sürekli ve normal dağılımlı değişkenler için tasarımın veri analiz yöntemi "tek yönlü ANOVA"dır.

Tablo 1. Örneklem büyüklüğünü hesaplamada kullanılan Kay eşitlikleri

Deney tasarımı	Eşitlik Kaynağı	Minimum n	Maksimum n	Toplam	Eşitlik No
Tek grup tasarımı	(x)	$n=(10/1+1)$	$n=(20/1+1)$	$N = n$	1
Bağımlı (eşlenik) iki grup tasarımı	(x)	$n_f=(10/1+1)$	$n_f=(20/1+1)$	$N = n_f$	2
Bağımsız iki grup tasarımı	(9, 11)	$n=(10/2+1)$	$n=(20/2+1)$	$N=2n$	3
Tam şansa bağlı tasarım	(5, 9, 11)	$n=(10/k+1)↑$	$n=(20/k+1)↓$	$N=kn$	4
Tam blok tasarımı	(5, 11)	$b=(10/k-1)+1↑$	$b=(20/k-1)+1↓$	$N=kb$	5
Tek grupta tekrarlı ölçüm tasarımı	(9)	$n=(10/(r-1)+1)↑$	$n=(20/(r-1)+1)↓$	$N=n$	6
Birden fazla bağımsız grupta tekrarlı ölçüm tasarımı	(9)	$n=(10/(kr)+1)↑$	$n=(20/(kr)+1)↓$	$N= kn$	7
İki faktörlü faktöriyel tasarım	(x)	$n=(10/(A_s B_s)+1)↑$	$n=(20/(A_s B_s)+1)↓$	$N= A_s B_s n$	8

(x): Bu çalışmayı ifade etmektedir.

Eşitliklerde k: Grup sayısı, b: Blok sayısı, r: Tekrar sayısı, n: Bir gruptaki denek sayısı, N: Tasarım için gerekli toplam denek sayısı (örneklem büyüklüğü), A_s : A faktörü seviye sayısı B_s : B faktörü seviye sayısı, HSD: Hata serbestlik derecesidir.

↑: Yukarı tam sayıya yuvarlama, ↓: Aşağı tam sayıya yuvarlama yapılacağını göstermektedir.

Tablo 2. Tek ve iki grup tasarımları için örneklem büyüklükleri ve güç değerleri^(x)

Deney Tasarımı	Örneklem aralığı	Örneklem Büyüklüğü		Standart Etki büyüklüğü (d)		
		n	N	0.20	0.50	0.80
				Güç Değerleri		
Tek Grup Tasarımı	Minimum	11	11	0.092	0.323	0.668
	Maksimum	21	21	0.141	0.587	0.936
Bağımlı (Eşlenik) İki Grup Tasarımı	Minimum	11	11	0.092	0.323	0.668
	Maksimum	21	21	0.141	0.587	0.936
Bağımsız İki Grup Tasarımı	Minimum	6	12	0.061	0.123	0.241
	Maksimum	11	22	0.073	0.201	0.431

^(x) İki yanlı test ve $\alpha=0,05$; (d): Cohen'in "d" değeri

Tasarım için gerekli örneklem büyüklüğü N, her grupta eşit sayıda denek (n) bulundurulduğunda $N=kn$ eşitliği ile hesaplanır. Bu eşitliklerdeki "k" grup sayısını ifade etmektedir. ANOVA tekniği ile $HSD=N-k$ veya $HSD=k(n-1)$ eşitlikleri ile hesaplanır. Bu tasarımda KEY'ne göre her bir gruptaki minimum denek sayısı $n=10/k+1$ değerinin yukarı tam sayıya ve maksimum denek sayısı $n=20/k+1$ değerinin aşağı tam sayıya yuvarlanması ile belirlenir. Buradan minimum ve maksimum toplam örneklem büyüklüğü $N=kn$ eşitliği ile hesaplanır (Tablo 1, Eşitlik 4). Örneğin 4 bağımsız grup ile yürütülmesi planlanan deneysel bir çalışma için minimum $n=10/4+1=3,5$ ve yukarı tam sayıya yuvarlandığında 4 değeri elde edilir. Aynı şekilde bir grupta mak-

simum örneklem büyüklüğü $n=20/4+1=6$ elde edilir. Bu sayının ondalık değerli bir sayı olması durumunda aşağı tam sayıya yuvarlanır. Buradan gerekli minimum ve maksimum örneklem büyüklüğü N sırasıyla 16 ($4*4=16$) ve 24 ($4*6=24$) olarak bulunur.

Tam şansa bağlı tasarımda bağımsız gruplar için örneklem büyüklükleri ve bu örneklem büyüklükleri için güç değerleri hesaplanarak Tablo 3'te sunulmuştur. Tablo 3 incelendiğinde bağımsız grup sayısı arttıkça grup başına denek sayısı azalmakta toplam denek sayısı ise 15 ile 24 arasında değişmektedir. Bu örneklem büyüklüklerine göre güç değerleri ise büyük etki için 0,142 ile 0,353 arasında oldukça düşüktür.

Tablo 3. Tam şansa bağlı tasarımda örneklem büyüklüğü ve güç değerleri^(*) ^(**)

	Grup sayısı	Örneklem Sınırları	Örneklem Büyüklüğü		Etki Büyüklüğü (Cohen'in f değeri)		
			n	N	0.10	0.25	0.40
					Güç Değerleri		
Tam Şansa Bağlı Tasarım	3	Minimum	5	15	0.059	0.110	0.214
		Maksimum	8	24	0.066	0.160	0.353
	4	Minimum	4	16	0.057	0.097	0.183
		Maksimum	6	24	0.062	0.133	0.289
	5	Minimum	3	15	0.055	0.082	0.142
		Maksimum	5	25	0.060	0.121	0.259
	6	Minimum	3	18	0.055	0.086	0.152
		Maksimum	4	24	0.058	0.106	0.215

(*) : ($\alpha=0,05$) (**) : Doğan ve Doğan (2020).

Tam Blok Tasarımında Örneklem Büyüklüğü

Tam blok tasarımı (completely block design) veya “iki yönlü sınıflama” deneysel araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tasarımın veri analiz yöntemi yine sürekli ve normal dağılımlı değişkenler için “iki yönlü ANOVA” olarak bilinir.

Tam şansa bağlı tasarımda her gruptaki tekrar sayısı bu tasarımda blok sayısına karşılık gelir. Bu tasarımda etkenin her seviyesi her blokta en az bir kez denir. Dolayısıyla her blokta etkenin grup sayısı kadar denek bulundurulur. Materyaldeki varyasyon bloklar vasıtasıyla giderilebildiği için daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Ancak örneklem büyüklüğü blok sayısı ile sınırlıdır. Tasarım için gerekli denek sayısı “k” bağımsız grupları, “b” blokları göstermek üzere $N=kb$ kadardır.

Bu tasarım için $HSD=N-(k+b)+1$ veya $HSD=(k-1)*(b-1)$ eşitlikleri ile hesaplanır. Kaynak eşitlik modeli uygulandığında $(k-1)*(b-1) \geq 10$ ve $(k-1)*(b-1) \leq 20$ olan eşitliklerinin bu tasarıma uygulanmasında bazı zorluklar ortaya çıkar. Bu nedenle kaynak eşitlik modeli tüm $k*b$ kombinasyonlarına uygulanamaz.

Tam blok tasarımında blok sayısı $b=(10/k-1)+1$ değeri yukarı, $b=(20/k-1)+1$ değeri aşağı tam sayıya yuvarlama yapılarak hesaplanır (Tablo 1, Eşitlik 5). Bu tasarımda KEY'ne göre grup blok kombinasyonları ve bu kombinasyonlar için gerekli örneklem büyüklükleri Tablo 4'teki gibidir.

Ancak materyalde oluşturulabilecek blok sayısı hesaplanan blok sayısı kadar olmayabilir. Örneğin haftanın günlerinin blok alındığı bir çalışmada blok sayısı en fazla 7, mevsimlerin blok alındığı çalışmada en fazla 4 olabilir. Bu durumlarda blok sayısının $10 \leq HSD \leq 20$ şartını sağlaması için her blokta birden fazla denek bulundurma ve ölçüm yapma yoluna gidilir.

Örneğin üç yöntemin dört farklı ana yaşına (blok) sahip denekler kullanılarak yöntemler arasındaki farklılık araştırılmış olsun. Bu çalışmanın toplam denek sayısı 12, $(3*4=12)$ ve $HSD=(k-1)*(b-1)=6$ olacaktır. Bu durumda her blokta bağımsız gruplar için birden fazla denek bulundurulması yoluna gidilir. Bu yeni tasarımda $HSD=k*b(r-1)$ eşitliği ile hesaplanır. Yukarıdaki örneğin bağımsız her bir grubu için aynı blok içinde ikişer denek ($r=2$) bulundurulduğunda $HSD=3*4*1=12$. Böylece KEY için $HSD \geq 10$ şartı sağlanmış olur.

Tablo 4. Tam blok tasarımında grup ve blok kombinasyonları ile örneklem büyüklükleri

Bağımsız Grup Sayısı	Blok sayısı		Örneklem Büyüklüğü	
	Minimum	Maksimum	Minimum	Maksimum
3	6	11	18	33
4	5	7	20	28
5	4	6	20	30
6	3	5	18	30

Tek Grupta Tekrarlı Ölçüm Tasarımında Örneklem Büyüklüğü

Tek grupta tekrarlı ölçüm tasarımı (one group repeated measurements) eşlenik grup tasarımında eşlenik grupların ikiden fazla olmasıdır. Bu tasarımın uygulandığı çalışmalarda, örneğin deneklere (örneklem) girişim öncesi, girişimden 6, 12, 24 saat veya gün sonra yapılan ölçümler kullanılarak zamana göre değişim olup olmadığı araştırılır.

Bu tasarımda aynı hayvanlar üzerinde ölçümler yapıldığı için gerekli denek sayısı $N=n$ eşitliği mevcuttur. Bu tasarım için minimum örneklem büyüklüğü $n=(10/(r-1)+1)$ değerinin yukarı tam sayıya, maksimum örneklem büyüklüğü $n=(20/(r-1)+1)$ değerinin aşağı tam sayıya yuvarlanması ile hesaplanır (Tablo 1, Eşitlik 6). Örneğin beş tekrarlı tek grup tasarımında minimum $n=10/4+1=4$ ve maksimum $n=20/4+1=6$ 'dır. Yani beş tekrar ölçümlü, tek grup tasarımında dört ile altı arasında deney hayvanı yeterli olmaktadır. Tek grupta r adet tekrarlı ölçüm tasarımları için örneklem büyüklükleri ve bu örneklemelerin güç düzeyleri Tablo 5'te sunulmuştur.

Birden Fazla Bağımsız Grupta Tekrarlı Ölçüm Tasarımında Örneklem Büyüklüğü

Birden fazla bağımsız grupta tekrarlı ölçüm tasarımı, tam şansa bağlı tasarım ile tekrarlı ölçüm tasarımının bileşimidir. Bu tasarımın en küçük boyutlu uygulaması iki bağımsız grubun iki tekrar ölçümle yapılmış olması durumudur. Her bir bağımsız grupta eşit veya farklı sayıda deney hayvanı bulundurulabilir.

Bu tasarım için KEY'ne göre her bir grup için minimum örneklem büyüklüğü $n=(10/(kr)+1)$ değerinin yukarı tam sayıya, maksimum örneklem büyüklüğü ise $n=(20/(kr)+1)$ değerinin aşağı tam sayıya yuvarlanması ile hesaplanır. Toplam örneklem büyüklüğü ise $N=nk$

eşitliği ile hesaplanır (Tablo 1, Eşitlik 7). Örneğin dört bağımsız grupta beş tekrar ölçüm yapılan bir denemede grup başına minimum denek sayısı $10/(4*5)+1=1.5$ ve yukarı tam sayıya yuvarlandığında $n=2$ 'dir. Grup başına maksimum denek sayısı ise $20/(4*5)+1=2$ 'dir. Bu örnek için gerekli minimum ve maksimum örneklem büyüklüğü eşit olmak üzere $N=2*4=8$ 'dir. Bağımsız gruplarda r adet tekrarlı ölçüm tasarımları için örneklem büyüklükleri ve bu örneklemelerin güç düzeyleri Tablo 6'da sunulmuştur.

Faktöriyel Tasarımlar için Örneklem Büyüklüğü

Faktöriyel tasarımlar en az iki seviyesi (alt grubu) olan iki ve daha fazla etken ile yapılan düzenlemelerdir. Bu tasarımların en küçük boyutlu iki faktörlü ve ikişer seviyeli ($2*2$ boyutlu) tasarımıdır. İki faktörlü tasarımlar için A_s , A faktörü seviye sayısını, B_s , B faktörü seviye sayısını, n ise her bir alt grupta eşit sayıda olan denek sayısını göstermek üzere, gerekli toplam denek sayısı $N= A_s*B_s*n$ kadardır.

Bu tasarımda $HSD=A_s*B_s*(n-1)$ eşitliği ile hesaplanır. KEY faktöriyel tasarımlara uygulandığında (Tablo 1, Eşitlik 8) toplam alt grup sayısı 10 ($A_s*B_s=10$) ve daha fazla olan faktöriyel tasarımlarda her bir alt grup (herhangi bir grubun herhangi bir seviyesi) için minimum iki, maksimum üç denek yeterli olmaktadır. Örneğin $5*2$ boyutlu faktöriyel tasarımda bir alt grup için gerekli denek sayısı n , minimum $n=10/10+1=2$ ve maksimum $n=20/10+1=3$ olarak hesaplanır. Daha büyük $5*3$ boyutlu bir faktöriyel tasarım için alt grup sayısı $5*3=15$ 'dir. Bu tasarım için yine KEY'ine göre, herhangi bir alt grup için minimum denek sayısı $n=10/15+1= 1,67$ değeri yukarı tam sayıya yuvarlandığında $n=2$, maksimum denek sayısı $20/15+1=2,33$ değeri yine yukarı tam sayıya yuvarlandığında $n=3$ olarak hesaplanır.

Tablo 5. Tek grupta tekrarlı ölçüm tasarımda örneklem büyüklüğü ve güç değerleri^(a)

Tekrarlı Ölçüm Sayısı		Örneklem Büyüklüğü (N=n)	Etki Büyüklüğü (Cohen'in η^2 değeri)		
			0.02	0.06	0.14
			Güç Değerleri		
3	Minimum	6	0.094	0.198	0.445
	Maksimum	11	0.147	0.381	0.781
4	Minimum	5	0.088	0.182	0.420
	Maksimum	7	0.111	0.266	0.613
5	Minimum	4	0.077	0.156	0.357
	Maksimum	6	0.099	0.248	0.589
6	Minimum	3	0.071	0.123	0.263
	Maksimum	5	0.096	0.220	0.533

^(a): $\alpha=0.05$

Tablo 6. Birden fazla bağımsız grupta tekrarlı ölçümler için örneklem büyüklüğü ve güç değerleri^(a)

Grup Sayısı	Tekrar sayısı	Örneklem Sınırları	Örneklem Büyüklüğü		Güç Değerleri (EB: $\eta^2=0.14$; $f=0.40$)	
			n	N		
2	2	Minimum	4	8	0.483	
		Maksimum	6	12	0.712	
	3	Minimum	3	6	0.417	
		Maksimum	4	8	0.677	
	4	Minimum	3	6	0.494	
		Maksimum	3	6	0.494	
	5	Minimum	2	4	0.305	
		Maksimum	3	6	0.562	
3	2	Minimum	3	9	0.528	
		Maksimum	4	12	0.702	
	3	Minimum	3	9	0.642	
		Maksimum	3	9	0.642	
	4	Minimum	2	6	0.450	
		Maksimum	2	6	0.450	
	5	Minimum	2	6	0.519	
		Maksimum	2	6	0.519	
	4	2	Minimum	3	12	0.688
			Maksimum	3	12	0.688
3		Minimum	2	8	0.530	
		Maksimum	2	8	0.530	
4		Minimum	2	8	0.625	
		Maksimum	2	8	0.625	
5		Minimum	2	8	0.703	
		Maksimum	2	8	0.703	

^(a): ($\alpha=0,05$)

İki faktörlü (AxB) ve faktörler arasındaki etkileşimin (interaksiyon) dikkate alındığı farklı boyutlu tasarımlar için KEY'ne göre gerekli minimum denek sayısı Tablo 7'de verilmiştir. Ayrıca bu tasarımlarda kullanılan Cohen'in standart etki büyüklüğü $f=0,40$ ile $0,05$ Tip I hata düzeyi esas alınarak bu örneklem büyüklükleri için istatistiksel güç değerleri de **Tablo 7**'de sunulmuştur. **Tablo 7** incelendiğinde faktöriyel tasarımlar için KEY'ne göre alt grup sayısı ($a \times b$) =10 ve daha fazla tasarımlar için alt grup başına minimum 2 denek yeterli olduğu görülmektedir. Ancak bu tasarımların istatistiksel güç değerleri genelde 0,156 ile 0,359 arasında oldukça düşük şekillenmektedir.

GENEL DEĞERLENDİRME VE SONUÇ

KEY ile hesaplanan örneklem büyüklükleri sürekli ve normal dağılımlı değişkenler için uygundur. Bu örneklem büyüklükleri kesikli değişkenler için kullanılmamalıdır.

Hayvan deneylerinde farklı tasarımlar için gerekli örneklem büyüklüğü, KEY kullanılarak belirlenebilir. ANOVA tekniğinde HSD'nin 10 ile 20 arasında yer alması güvenilir sonuçlar vermektedir. Bu nedenle KEY, tasarımların veri analizinde kullanılan modeller için HSD'nin 10 ile 20 arasında ($10 \leq HSD \leq 20$) olmasını esas alır.

Bu çalışmada KEY eşitlikleri tek grup ve eşlenik iki grup tasarımları için genişletilmiştir. Yine bu çalışmada KEY eşitlikleri iki faktörlü faktöriyel düzenlemeye uyarlanmıştır. KEY'ni ele alan çalışmalar genellikle yöntemin eşitliklerini geliştirerek, eşitlikleri rakamlı örnekler ile açıklamışlardır (5,9,11,13,19,21). Bu konuda en kapsamlı çalışmalardan biri Arifin ve Zahiruddin (9) tarafından yapılmıştır. Doğan ve Doğan (11) KEY eşitliklerinin uygulama kurallarını sunarak, bağımsız gruplar için örneklem minimum ve maksimum örneklem büyüklükleri ile bu örneklemelerin istatistiksel gücünü hesaplamıştır. Konu bütünlüğünü bozmamak

Tablo 7. İki faktörlü faktöriyel tasarımlar için ags, toplam minimum örneklem büyüklüğü ve güç değerleri^(*)

		A Faktörü Boyutları											
		2			3			4			5		
		AGS	n	N	AGS	n	N	AGS	n	N	AGS	n	N
B Faktörü Boyutları	2	4	4	16 (0.225)	6	3	18 (0.201)	8	3	24 (0.237)	10	2	20 (0.156)
	3	6	3	18 (0.201)	9	3	27 (0.272)	12	2	24 (0.192)	15	2	30 (0.204)
	4	8	3	24 (0.301)	12	2	24 (0.192)	16	2	32 (0.244)	20	2	40 (0.206)
	5	10	2	20 (0.156)	15	2	30 (0.225)	20	2	40 (0.293)	25	2	50 (0.359)

AGS: Alt grup sayısı; n: Alt grup örneklem hacmi; N: Toplam örneklem hacmi; (...): Parantez içi değerler güç değerlerini göstermektedir; ^(*):(EB: f=0,40; α=0.05)

için Doğan ve Doğan (11) tarafından tam şansa bağlı tasarımlar için örneklem büyüklükleri ve güç değerleri bu çalışmada tekrar verilmiştir. Böylece bu çalışmada yaygın kullanılan tüm tasarımlar için minimum ve maksimum örneklem büyüklükleri hesaplanmış ve tablolar halinde sunulmuştur. Ayrıca hesaplanan örneklem büyüklükleri için Cohen'in standart etki büyüklüğü değerlerine göre güç değerleri hesaplanmıştır. Tek grup tasarımında 11 ile 21 arasında örneklem gerek ve yeterli olmaktadır. Tasarımın boyutu arttıkça örneklem büyüklüğü bir miktar artmaktadır. Şansa bağlı tasarımda bu sayı 15 ile 25, tam blok tasarımında 18 ile 33 arasında değişim göstermektedir. Denek sayısının tam blok tasarımında, şansa bağlı tasarıma göre daha fazla olmasının nedeni, bu tasarımda HSD ayrıca blok sayısının bir eksiği kadar (b-1) azaldığı için $10 \leq HSD \leq 20$ KEY eşitliğinin sağlanması daha fazla denekle sağlanabilmektedir. Ancak tam blok tasarımlarında materyaldeki varyasyon bloklar vasıtasıyla giderilebilmesi nedeniyle daha yüksek tekrarlanabilir (reproducibility) bulgular elde edilebilmektedir (26).

Tekrarlı ölçüm tasarımlarında ölçüm sayısı arttıkça örneklem büyüklüğü önemli ölçüde azalmaktadır (Tablo 5). Örneğin üç tekrarlı ölçümde maksimum örneklem büyüklüğü 11 iken bu sayı altı tekrarlı ölçüm yapıldığında 5 deneye düşmektedir. İki ve daha fazla bağımsız grupta tekrarlı ölçümlerde tekrar sayısı arttıkça örneklem büyüklüğü azalmakta ancak bağımsız grup sayısı arttıkça örneklem büyüklüğü artmaktadır. Faktöriyel düzenlemelerin her bir alt grubu için iki veya üç denek yeterli olmaktadır.

Standart etki büyüklükleri kullanılarak KEY ile hesaplanan örneklem büyüklüklerinin istatistiksel güç

düzeyleri genellikle düşüktür. Ancak hayvan deneyleri ile yapılan çalışmalarda araştırmacı, ortam kontrolü, bir örnek materyal, hassas ölçüm gibi uygulamalarla hata varyansını düşürmek suretiyle gözlenen etki büyüklüğünü yükseltebilir. Diğer bir yaklaşım ise araştırmacı etki büyüklüğünü standart değerlere göre daha yüksek olarak hipotezini test edebilir. Doğan ve Doğan (11) yaptığı çalışmada bağımsız grup tasarımlarında %80 gücü verebilecek etki büyüklüklerini sunarak bu duruma dikkat çekmişlerdir. Yani KEY ile belirlenen örneklem büyüklükleri ile %80 güç düzeyine ulaşmak için daha yüksek etki büyüklükleri test edilebilir.

Kaya Bahçecitapar ve ark. (27) tarafından yapılan bir çalışmada tam faktöriyel (full factorial) tasarımlarda örneklem büyüklüğü ve güç tahmini yapılmıştır. Araştırmacılar, üç faktörlü tasarımlar için, 2 birimden büyük ortalama farkları ve 2 birim ve daha küçük standart sapma durumunda herhangi bir alt grupta 2 ile 4 arasındaki denekle %80 üzerinde istatistiksel güce ulaşabileceğini hesaplamışlardır. Bu çalışmada KEY yöntemi ile elde edilen alt gruplardaki denek sayısı benzer şekilde 2 ile 4 arasında hesaplanmıştır. Ancak %80 güce ulaşmak için etki büyüklüğünün 0.40 değerinden daha büyük olmasını sağlayacak daha büyük ortalama farkların öngörülmesi gerekmektedir. Bu bağlamda yapılacak sonraki çalışmalarda KEY ile hesaplanan örneklem büyüklükleri için %80 beklenen gücü verebilecek etki büyüklükleri hesaplanabilir.

Bu bilgilere göre, beklenen güç değerleri düşük olmakla birlikte, sürekli değişkenler için örneklem büyüklüğünü belirlemede KEY hayvan deneylerinde kullanılabilir. Bununla birlikte deney hayvanları ile yürütülen araştırmalarda homojen materyal kullanılarak,

deneş şartlarının tüm bireylerde ve (varsa) gruplarda aynı olmasını sağlayarak ve ölçümleri titiz ve dikkatli yaparak, hata varyansının en aza indirilmesi sağlanabilir. Hata varyansının azaltılması ile kabul edilebilir güç ve olası klinik anlamlı etki belirlenebilir.

Çıkar Çatışması ve Finansman Beyanı: Bu çalışmada çıkar çatışması yoktur ve herhangi bir finansman desteği alınmamıştır.

Bilimsel Sorumluluk Beyanı: Yazar, çalışmanın fikir, tasarım, veri toplama, analiz, yorumlama, yazma, ana metin içeriğinin hazırlanması ve bilimsel olarak gözden geçirilmesi ve son şeklinin verilmesi dahil tüm süreçlerden ve makalenin bilimsel içeriğinden sorumlu olduğunu beyan eder.

İnsan ve Hayvan Hakları Beyannamesi: Bu çalışmada gerçekleştirilen tüm süreçler, kurumsal ve/veya ulusal araştırma komitesinin etik standartlarına ve 1964 Helsinki Deklarasyonu ve sonraki değişiklikleri veya karşılaştırılabilir etik standartlarına uygundur.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, derleme çalışması olduğu, hiçbir insan ve hayvan katılımcı değerlendirilmediği için Etik kurul onayı gerektirmemektedir.

KAYNAKLAR

- Ergün Y, Hayvan deneylerinde etik. Arşiv 2010;(19):220-235.
- Kaya M, Çevik A. Hayvan deneylerinde planlanma ve model seçimi (Planning in animal experiments and choosing model). Deneşel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi 2011;1(2):36-39.
- Anonim. Deneşel ve diğer bilimsel amaçlar için kullanılan hayvanların refah ve korunmasına dair yönetmelik. (Resmî Gazete Tarihi: 13.12.2011) Resmî Gazete Sayısı: 28141;2011.
- Anonim. Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik. (Resmî Gazete Tarihi: 15.02.2014) Resmî Gazete Sayısı: 28914, 2011.
- Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. ILAR J 2002;43(4):244-258.
- Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen & Co. Ltd. 1959; [Reissued: 1992, Universities Federation for Animal Welfare, Herts, England].
- Tüfek H, Özkan Ö. 4R rule in laboratory animal science. Comm J Biol. 2018;2(1):55-60.
- Bek Y, Güneren E, Hökelek M. Etkili örnek büyüklüğünün belirlenmesi ve uygun istatistik yönteminin seçimi. Türk Plast Rekonstr Est Cer Dergisi 2002;10(2): 98-105.
- Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. (Brief communication). Malays J Med Sci. 2017;24(5):101-105.
- 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):445-453.
- Doğan İ, Doğan N. Deneş hayvanı kullanılan çalışmalarda örneklem büyüklüğünün kaynak eşitlik yöntemi ile tahmini. Türkiye Klinikleri Biyoistatistik Dergisi 2020;12(2):211-217.
- Yıldız N, Bircan H. Araştırma ve Deneş Metotları, Atatürk Üniversitesi Yayın No 697, Ders kitapları serisi No:57. 2012.
- Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? J Pharmacol Pharmacother 2013;4:303-306.
- Festing MFW. On determining sample size in experiments involving laboratory animals. Laboratory Animals 2018;52(4):341-350.
- Ankaralı H, Ankaralı S. Hayvan deneylerinde verimliliği artıracak deneş tasarımları ve denek sayısı. Anadolu Klinięi Tıp Bilimleri Dergisi 2019;24(3):248-259.
- 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):47-48.
- Kalaycıoğlu A, Akhanlı SE. Sağlık araştırmalarında güç analizinin önemi ve temel prensipleri: Tıbbi çalışmalar üzerinde uygulamalı örnekler. Teknik Not. Turkish J Public Health 2020;18(1):103-112.
- Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample size determination. ILAR Journal 2002;43(4): 207-213.
- Festing MFW. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. Laboratory Animals 1994;28:212-221.
- Mead R. The Design of Experiments. Cambridge, New York: Cambridge University Press 1988.
- Festing MFW. Design and statistical methods in studies using animal models of development. ILAR J 2006;47(1):5-14.
- 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):157-163.
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3.1 A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behavior Research Methods 2007;(39):175-191.
- G*Power Manual pdf. <https://www.psychologie.hhu.de/Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultaet/Psychologie/> 2017 (Erişim tarihi: 01 Şubat 2021).
- Cohen J. Statistica Power Analysis for The Behavioral Science. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates 1988.
- Festing MFW. Randomized block experimental designs can increase the power and reproducibility of laboratory animal experiments. ILAR J 2014;55(3): 472-476.
- Kaya Bahçecitapar M, Karadaę Ö, Aktaş S. Estimation of sample size and power for general full factorial designs. Journal of Statisticians: Statistics and Actuarial Sciences 2016; 2(9):79-86.