

Планирование экспериментов

Марина Варфоломеева

Зачем все это нужно?

Зачем все это нужно?

| The plural of anecdote is not data.

Frank Kotsonis, Roger Brinner,
or, most likely, some anonymous author

Этапы исследования

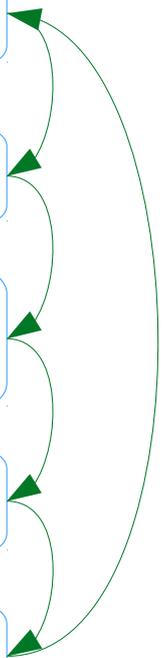
Наблюдение

Гипотеза / Вопрос

Эксперимент
(Наблюдение / манипуляция)

Анализ, интерпретация

Вывод



Этапы исследования

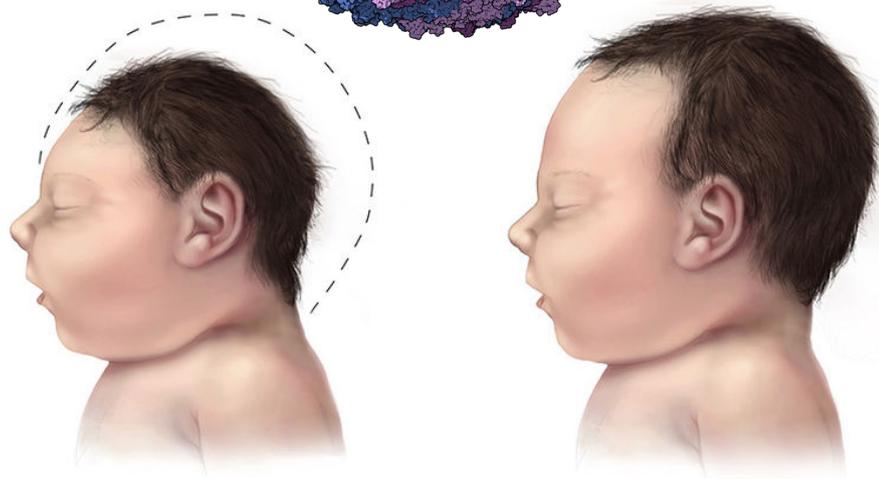
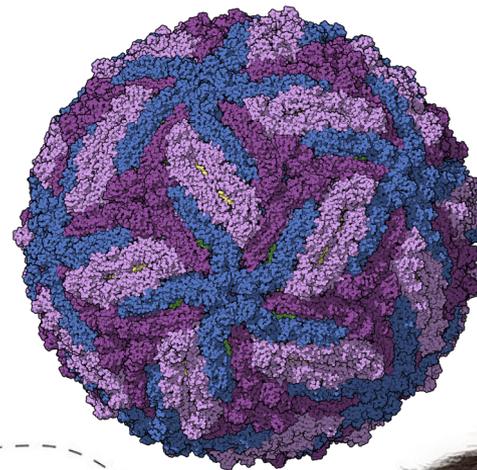
Наблюдение

Гипотеза / Вопрос

Эксперимент
(Наблюдение / манипуляция)

Анализ, интерпретация

Вывод



<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Zika-chain-colored.png&oldid=217728416>

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Microcephaly-comparison-500px.jpg&oldid=236500797>

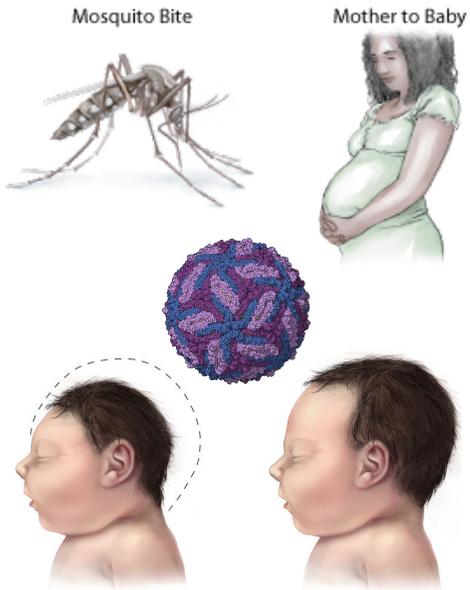
Типы экспериментов

“Коррелятивные”
 (“Измерительные”)

“Манипулятивные”
 (“Контролируемые”)

Типы экспериментов

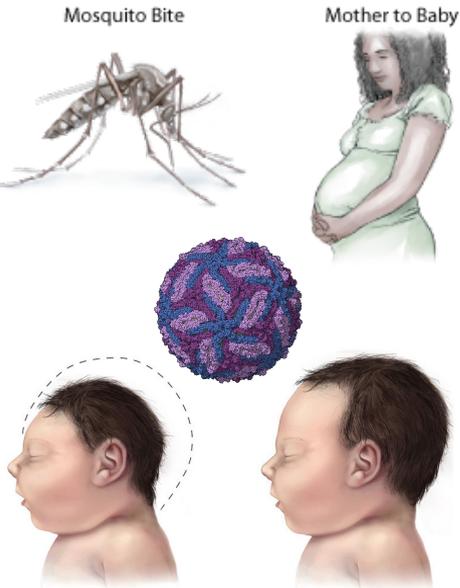
“Коррелятивные”
 (“Измерительные”)



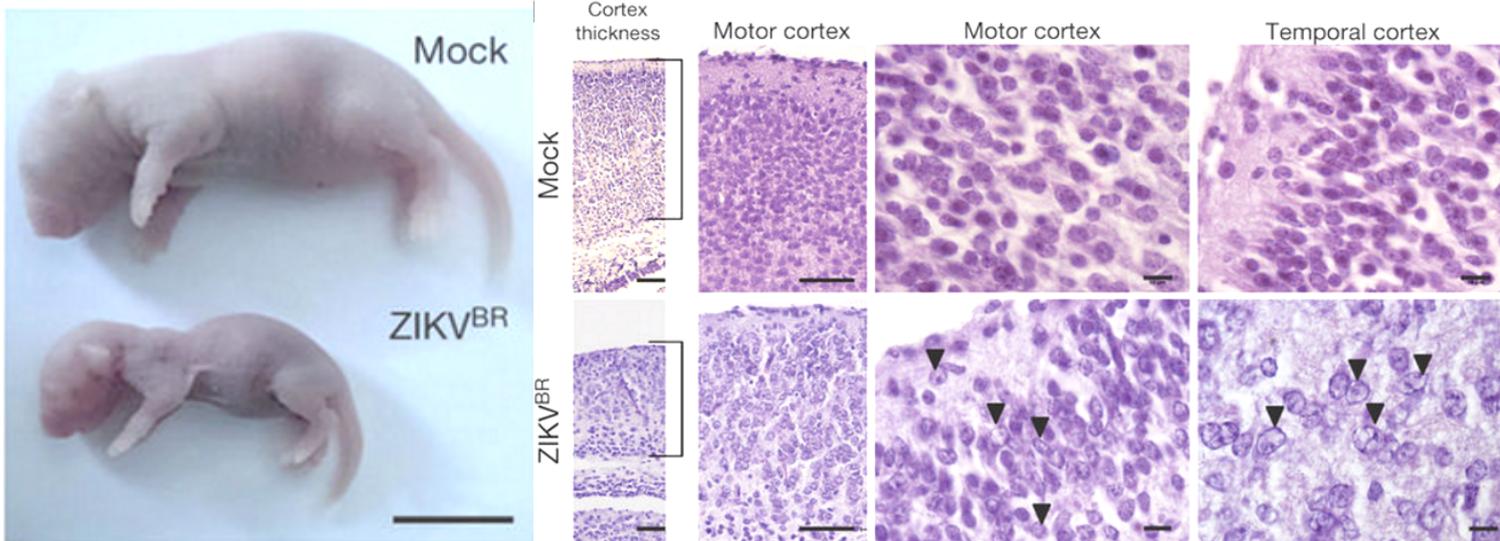
“Манипулятивные”
 (“Контролируемые”)

Типы экспериментов

“Коррелятивные”
 (“Измерительные”)



“Манипулятивные”
 (“Контролируемые”)

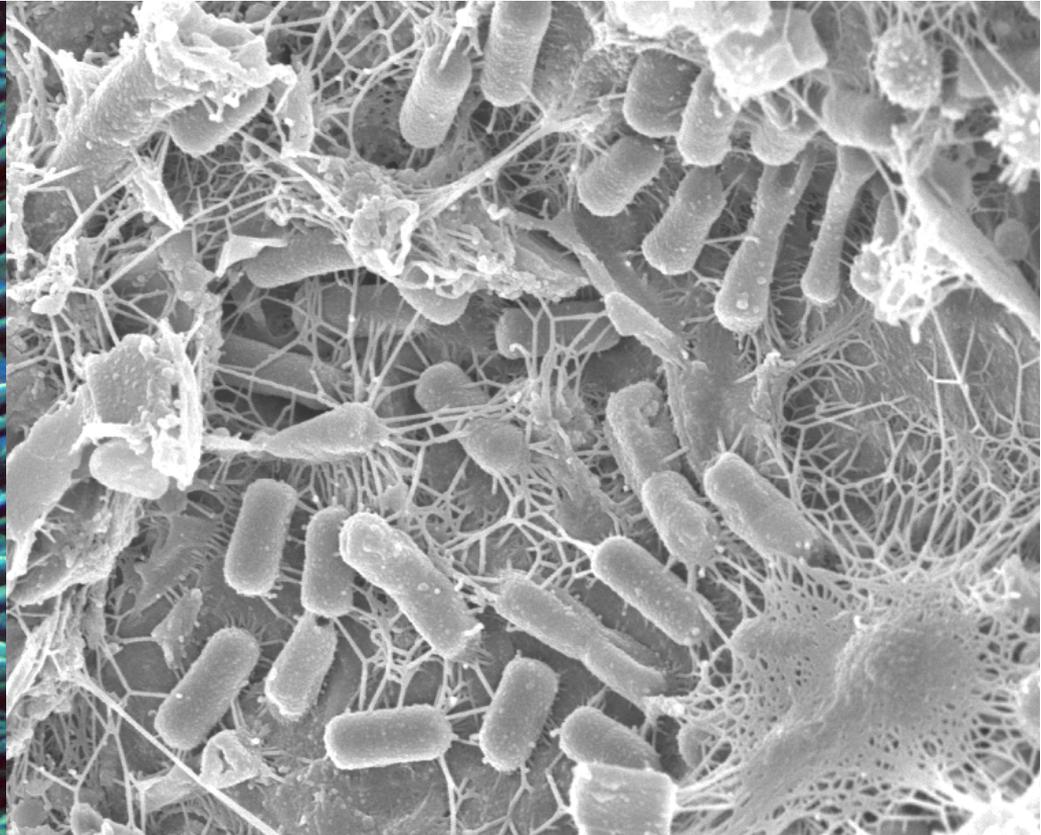


Cugola et al. 2016 Fig 1 a, d

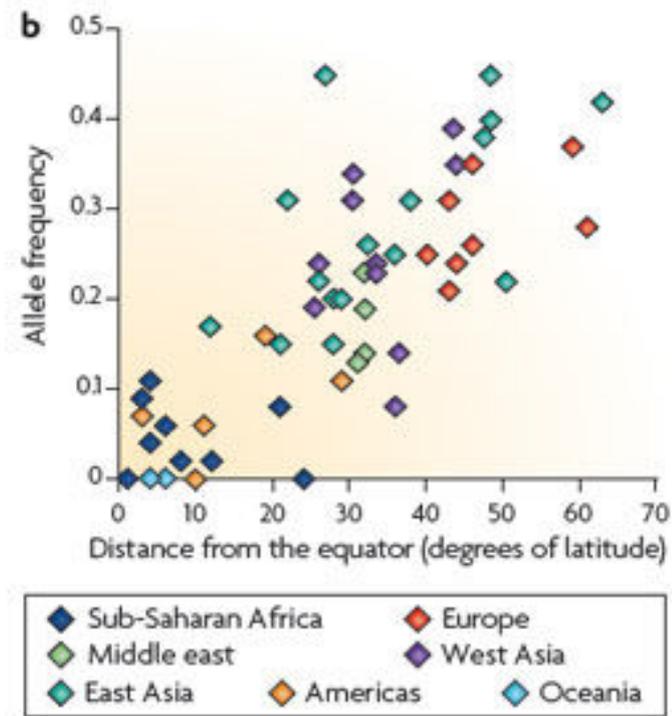
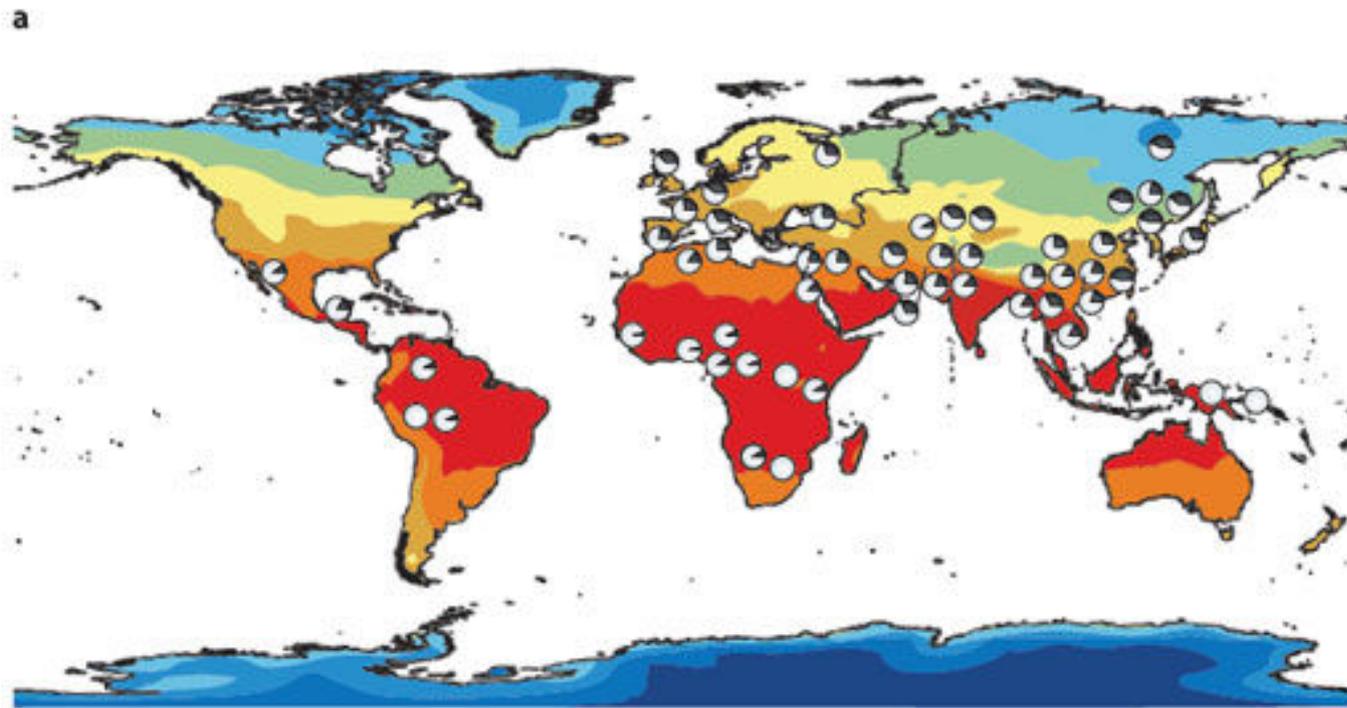
<http://health.mo.gov/living/healthcondiseases/communicable/zika/transmission.php>
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Zika-chain-colored.png&oldid=217728416>
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Microcephaly-comparison-500px.jpg&oldid=236500797>

Межиндивидуальная изменчивость, повторности

Нас окружает изменчивость



Нас окружает изменчивость



Nature Reviews | **Genetics**

SNP rs12946049 in the human RPTOR gene: a — allele frequencies, map colour represents the maximum winter temperature; b — allele frequency vs. distance from the equator

Novembre, Di Rienzo 2009 Fig. 5

Два типа изменчивости (для исследователя)

- Изменчивость, интересная исследователю
- Случайная изменчивость

Повторности — это способ учесть естественную изменчивость

- Надежность статистических оценок
- Проверка воспроизводимости результатов
- Надежность экстраполяций
- Страховка от случайной ошибки и форсмажорных обстоятельств

Что, если бы не было повторностей?



Какие изменения экспрессии генов будут в печени крыс на богатой жирами диете по сравнению с крысами на нормальной диете?
(пример из Glass 2007, p103)

Базовые вещи: определения, валидация системы

Определения

- «Богатая жирами» диета —
- «Нормальная» диета —
- Изменение экспрессии —
- Крысы —

Валидация системы

-
-
-

Базовые вещи:

Определения

- «Богатая жирами» диета — 70% Ж : 15% Б : 15% У
- «Нормальная» диета — 30% Ж : 40% Б : 30% У
- Изменение экспрессии — больше чем в 5 раз
- Крысы — линия крыс, у которой богатая жирами диета способна вызывать ожирение

Валидация системы

- Крысы хорошо переносят оба варианта диеты
- Из печени получается выделить РНК
- Получается оценивать изменения экспрессии при помощи микроэррей-анализа

Наивный эксперимент

- Измерение экспрессии через 12 часов после перехода на жирную диету
- Жирная диета — 1 крыса, нормальная диета — 1 крыса

В чем недостатки? Почему?

Наивный эксперимент

- Измерение экспрессии через 12 часов после перехода на жирную диету
- Жирная диета — 1 крыса, нормальная диета — 1 крыса
- Невозможно оценить изменчивость в системе
- Неизвестно, будут ли воспроизводиться результаты



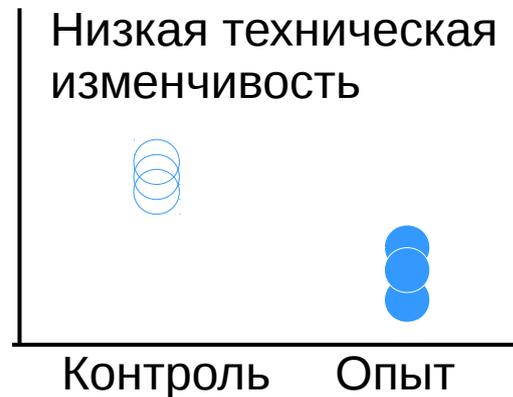
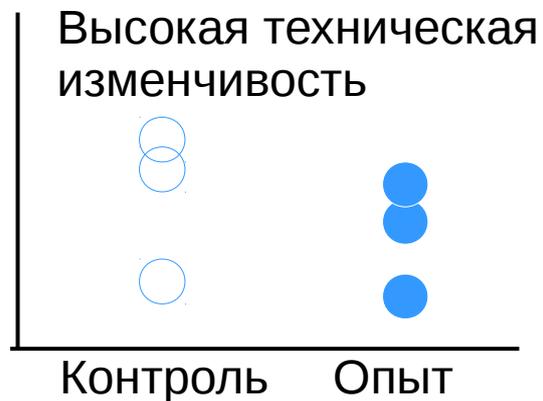
Немного менее наивный эксперимент

- Измерение экспрессии через 12 часов после перехода на жирную диету
- Жирная диета — 1 крыса (3 пробы), нормальная диета — 1 крыса (3 пробы)

Стало ли лучше? Почему?

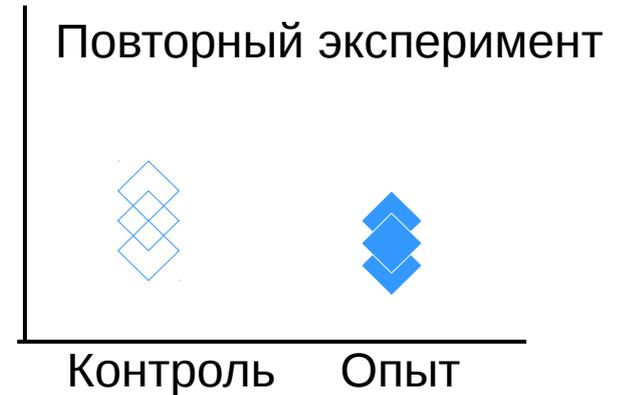
Немного менее наивный эксперимент

- Измерение экспрессии через 12 часов после перехода на жирную диету
- Жирная диета — 1 крыса (3 пробы), нормальная диета — 1 крыса (3 пробы)
- Стало можно оценить техническую изменчивость



Немного менее наивный эксперимент

- Измерение экспрессии через 12 часов после перехода на жирную диету
- Жирная диета — 1 крыса (3 пробы), нормальная диета — 1 крыса (3 пробы)
- Стало можно оценить техническую изменчивость.
- Но по-прежнему нельзя понять, будут ли воспроизводиться результаты



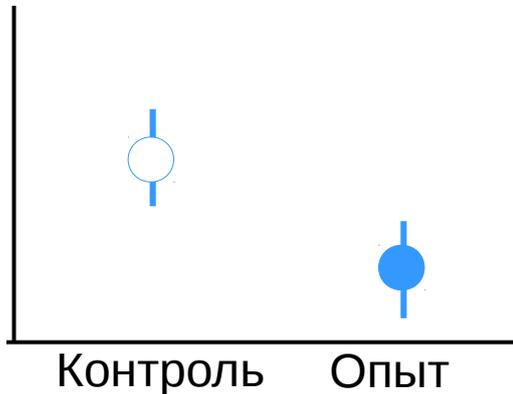
Улучшенный эксперимент

- Измерение экспрессии через 12 часов после перехода на жирную диету
- Жирная диета — 20 крыс, нормальная диета — 20 крыс
(Можно и по 3 пробы с крысы — либо усреднить, либо использовать метод анализа, подходящий для данных с повторными измерениями)

Стало ли лучше? Почему?

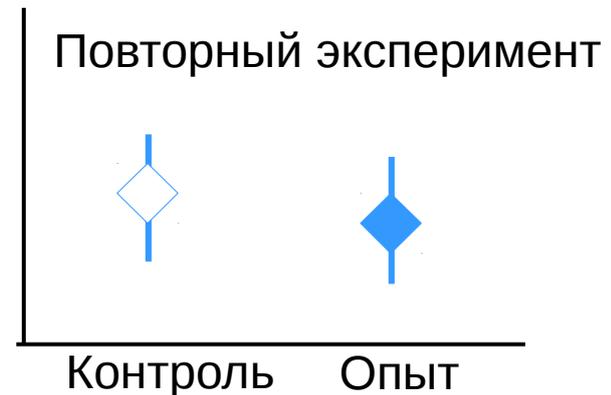
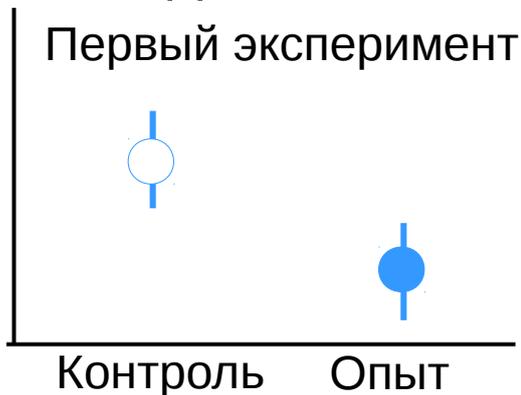
Улучшенный эксперимент

- Измерение экспрессии через 12 часов после перехода на жирную диету
- Жирная диета — 20 крыс, нормальная диета — 20 крыс
(Можно и по 3 пробы с крысы — либо усреднить, либо использовать метод анализа, подходящий для данных с повторными измерениями)
- Можно оценить техническую и межиндивидуальную изменчивость



Улучшенный эксперимент

- Измерение экспрессии через 12 часов после перехода на жирную диету
- Жирная диета — 20 крыс, нормальная диета — 20 крыс
(Можно и по 3 пробы с крысы — либо усреднить, либо использовать метод анализа, подходящий для данных с повторными измерениями)
- Можно оценить техническую и межиндивидуальную изменчивость
- На самом деле, мы по-прежнему не знаем, будут ли повторяться результаты... Для каких-то генов — нет



Генеральная совокупность и выборка

Из-за изменчивости приходится работать с выборками из генеральной совокупности



Генеральная совокупность – это множество объектов, на которые мы бы хотели экстраполировать выводы



Выборка – это часть генеральной совокупности, которую мы непосредственно изучаем

Из-за изменчивости приходится работать с выборками из генеральной совокупности



Генеральная совокупность – это множество объектов, на которые мы бы хотели экстраполировать выводы

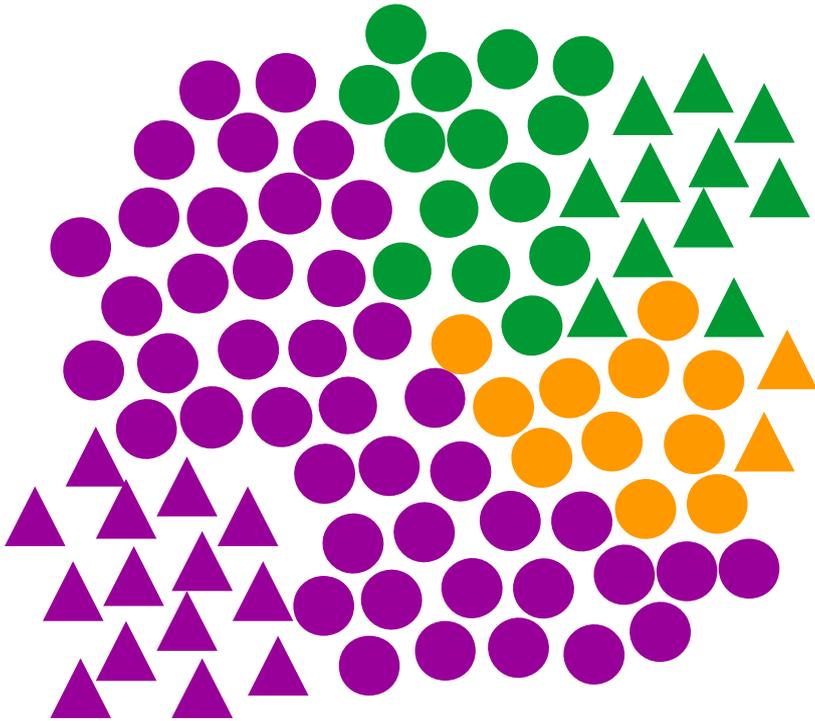


Выборка – это часть генеральной совокупности, которую мы непосредственно изучаем

Разные выборки отличаются друг от друга

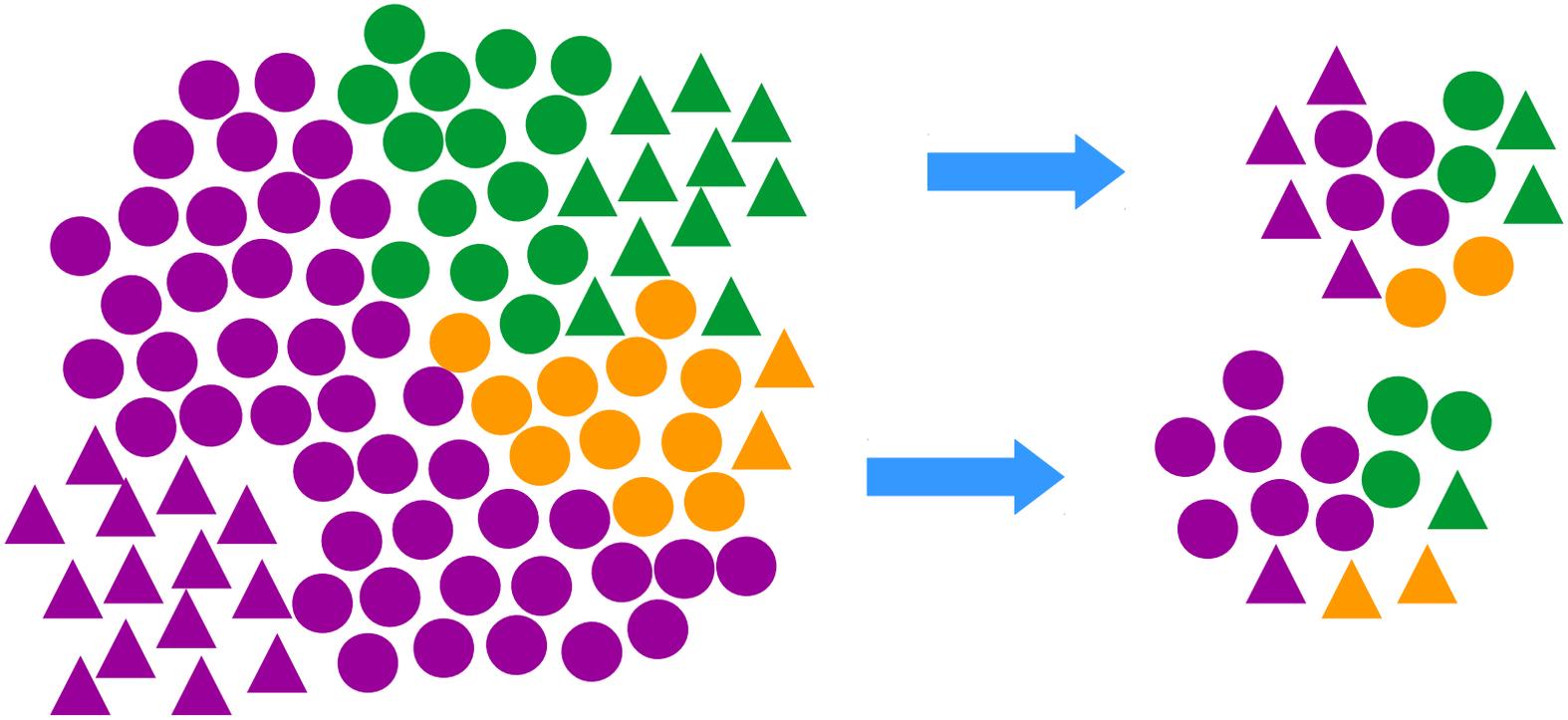
Репрезентативность

Как взять репрезентативную выборку из этой генеральной совокупности?



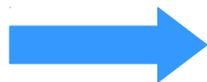
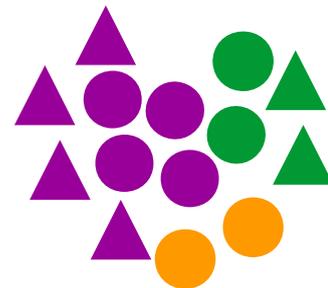
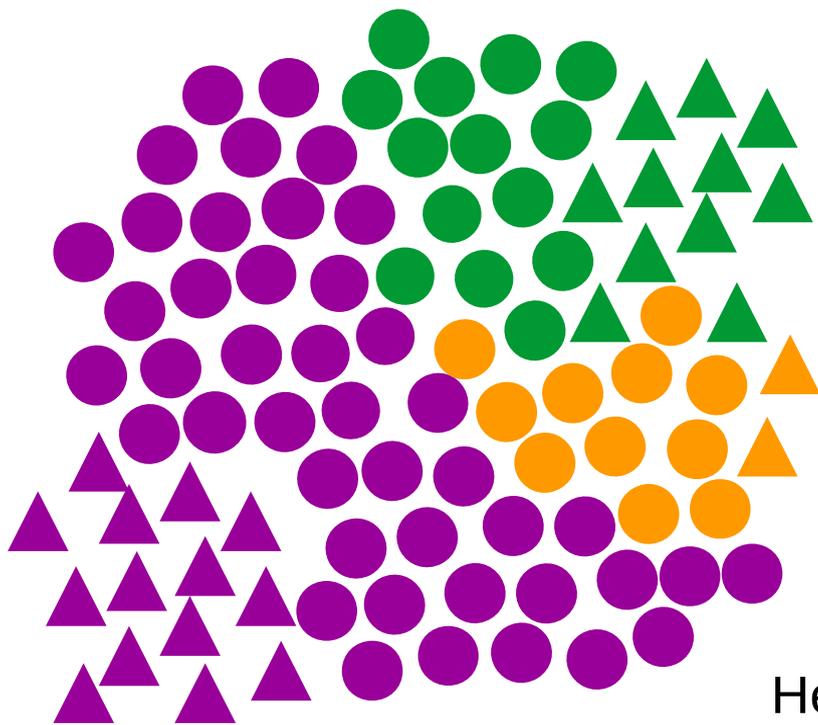
Репрезентативность

Какая из этих двух выборок более репрезентативна?



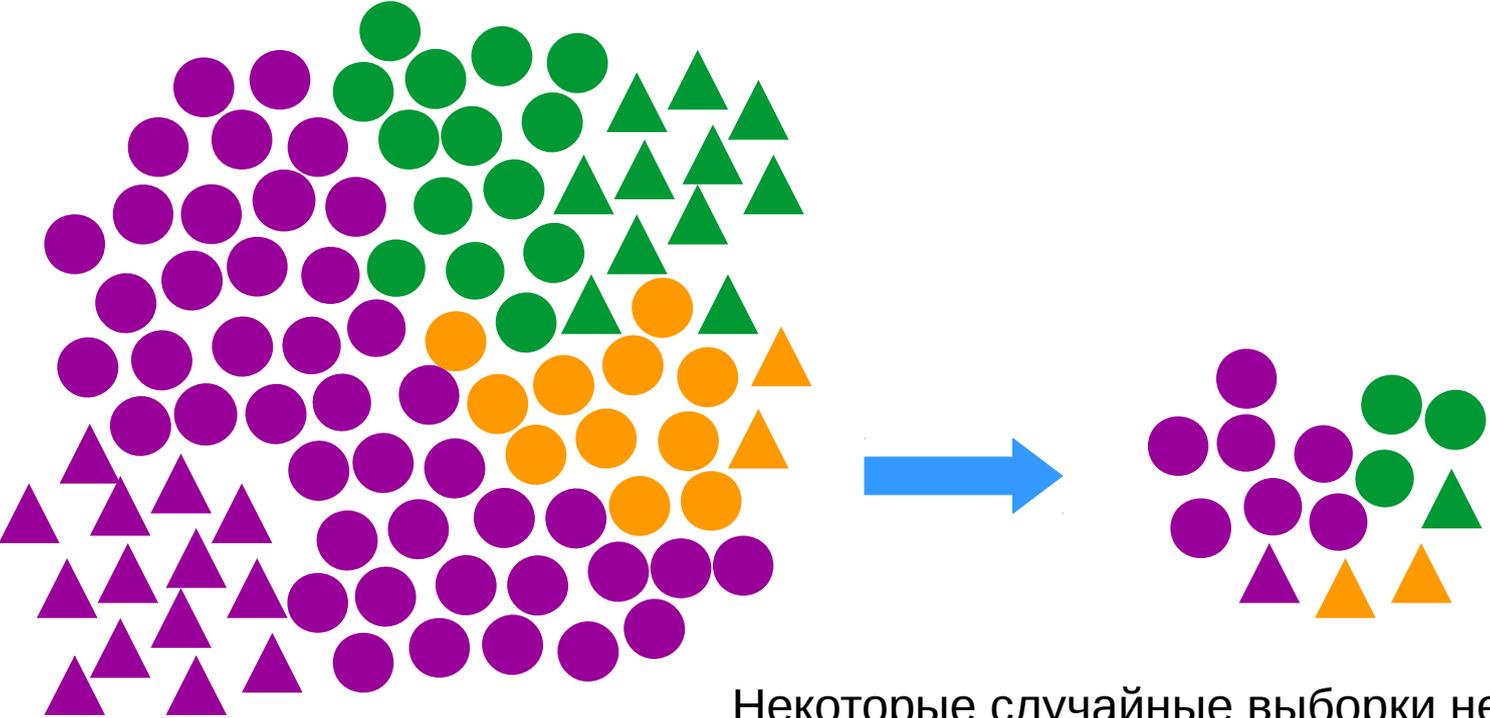
Репрезентативность

Репрезентативная выборка близка по потенциально важным характеристикам к генеральной совокупности
«Несмещенные» (unbiased) результаты
ВОЗМОЖНЫ



Нерепрезентативная выборка отличается от генеральной совокупности
Риск «смещенных» (biased) результатов

Случайность и репрезентативность — не синонимы!



Некоторые случайные выборки не репрезентативны
Решать, репрезентативна ли выборка нужно заранее
(лучше еще не глядя на данные)

Какой нужен объем выборки?

- Чем больше повторностей, тем надежнее статистические оценки, но одновременно с этим растут издержки
- При помощи анализа мощности (power analysis) можно рассчитать число повторностей, необходимое для обнаружения значимого эффекта заданной величины

Повторности и псевдоповторности

Повторности должны быть независимы



Повторности должны быть независимы



Независимые повторности
никак не связаны друг с другом,
никак не помогут нам предсказать
результаты друг для друга

Псевдоповторности —
это зависимые
повторности

Влияние размера выводка и заботы о потомстве на иммунокомпетентность у птенцов деревенской ласточки (Saino et al. 1997)



Katsura Miyamoto <https://flic.kr/p/nCnVEa>



Kev Chapman <https://flic.kr/p/8a3Y1g>

Влияние размера выводка и заботы о потомстве на иммунокомпетентность у птенцов деревенской ласточки (Saino et al. 1997)



Где здесь повторности и псевдоповторности?

Katsura Miyamoto <https://flic.kr/p/nCnVEa>



Kev Chapman <https://flic.kr/p/8a3Y1g>

Самые распространенные источники псевдоповторностей

Общееместище или общая среда



Псевдорепликация в пространстве или во времени



Псевдорепликация воздействий



Родственные связи



Что делать с псевдоповторностями?

Pseudoreplication thus refers not to a problem in experimental design (or sampling) per se but rather to **a particular combination of experimental design (or sampling) and statistical analysis** which is inappropriate for testing the hypothesis of interest.

Hurlbert, S.H. 1984.
Pseudoreplication and the design
of ecological field experiments.
Ecol.Monogr. 54: 187-211.

Рандомизация

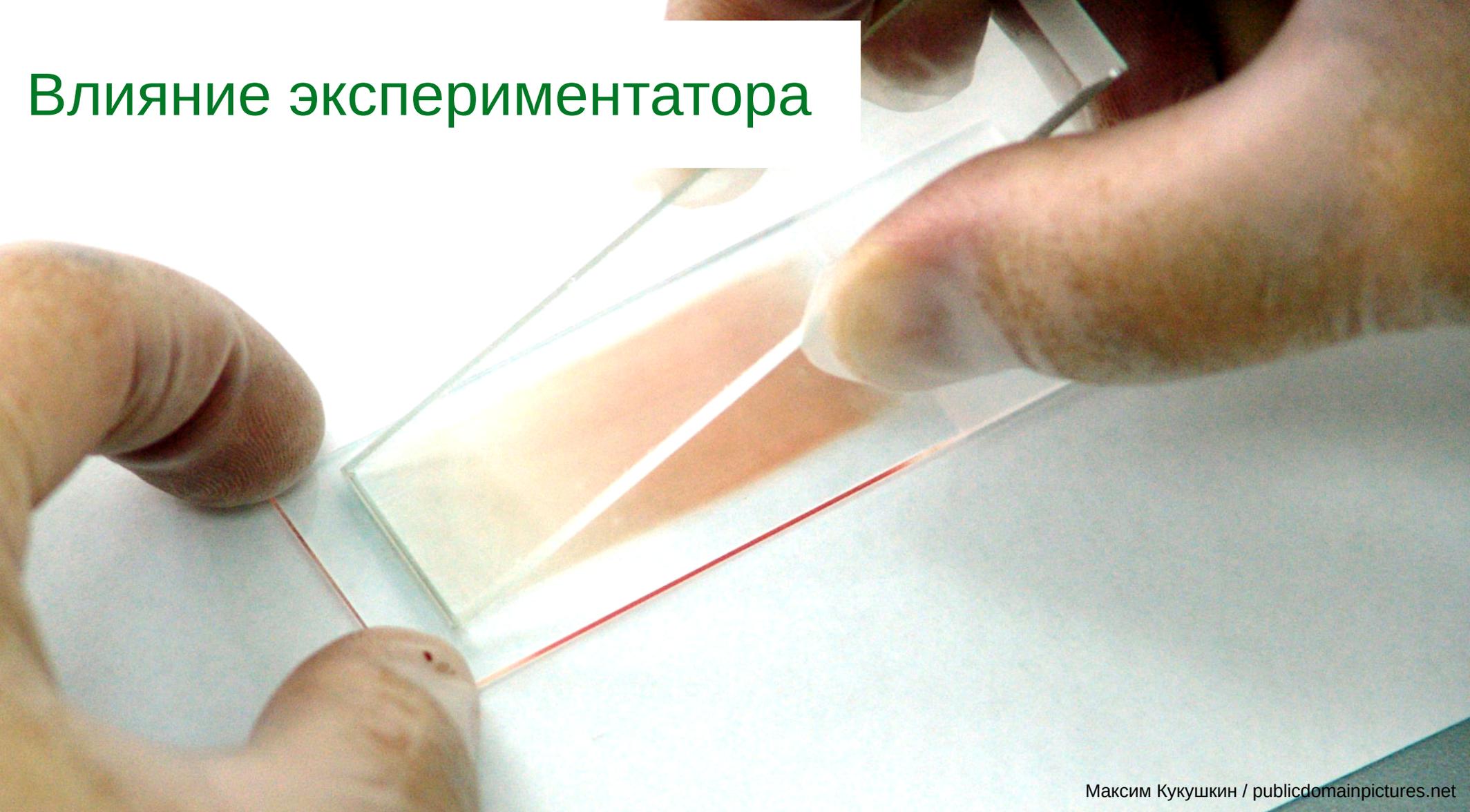
Рандомизация помогает создать взаимно-сопоставимые экспериментальные единицы

- Независимость экспериментальных единиц
- Устранение влияния экспериментатора
- Удаление влияния скрытых факторов



Почему нужна рандомизация?

Влияние экспериментатора



Как бороться с влиянием экспериментатора

- Слепые процедуры
- Двойные слепые процедуры



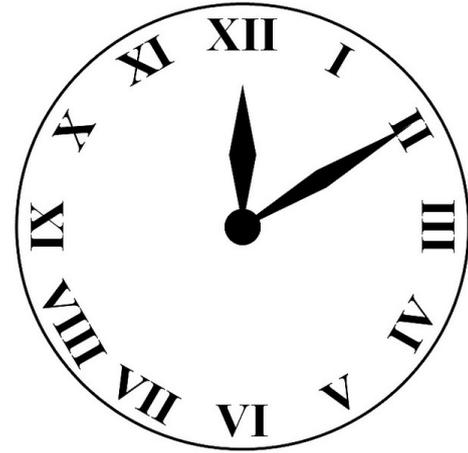
Погрешности выбора (selection bias) самоотбор (self-selection)



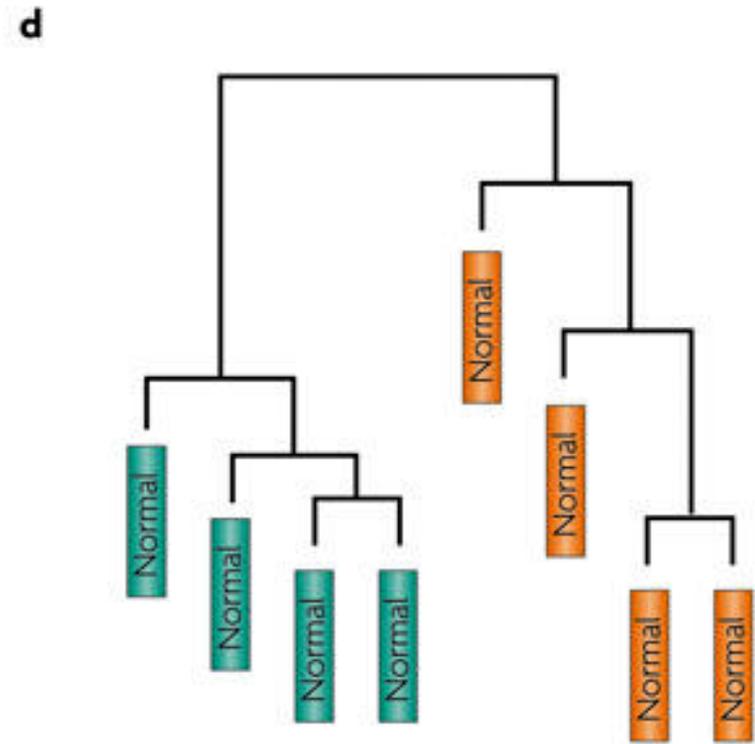
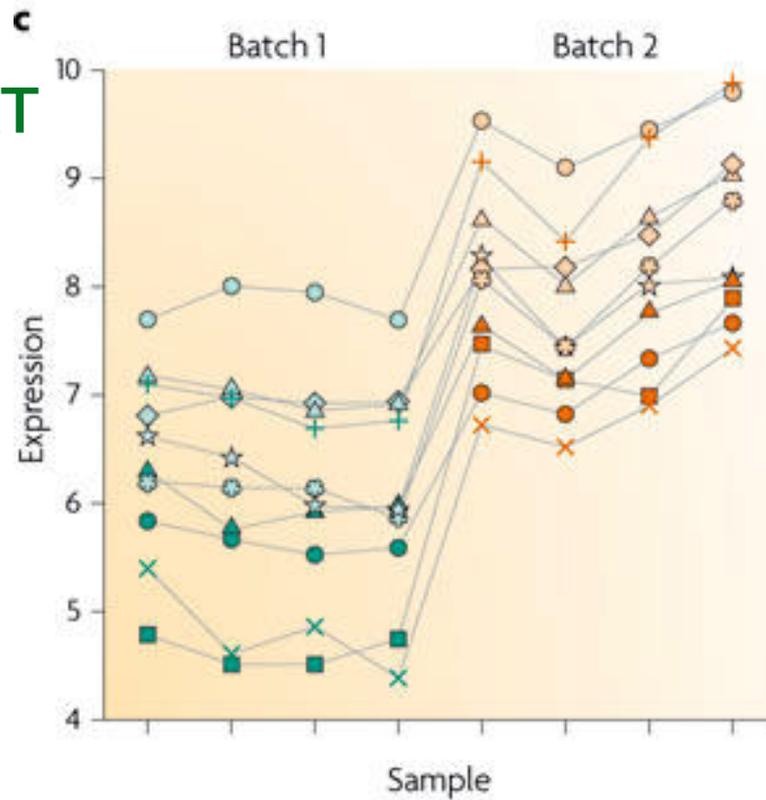
Как бороться с погрешностями выбора

- Рандомизация
- Стратификация
- Слепые процедуры

Неслучайное расположение в пространстве и / или во времени (batch effect)



Батч-эффект

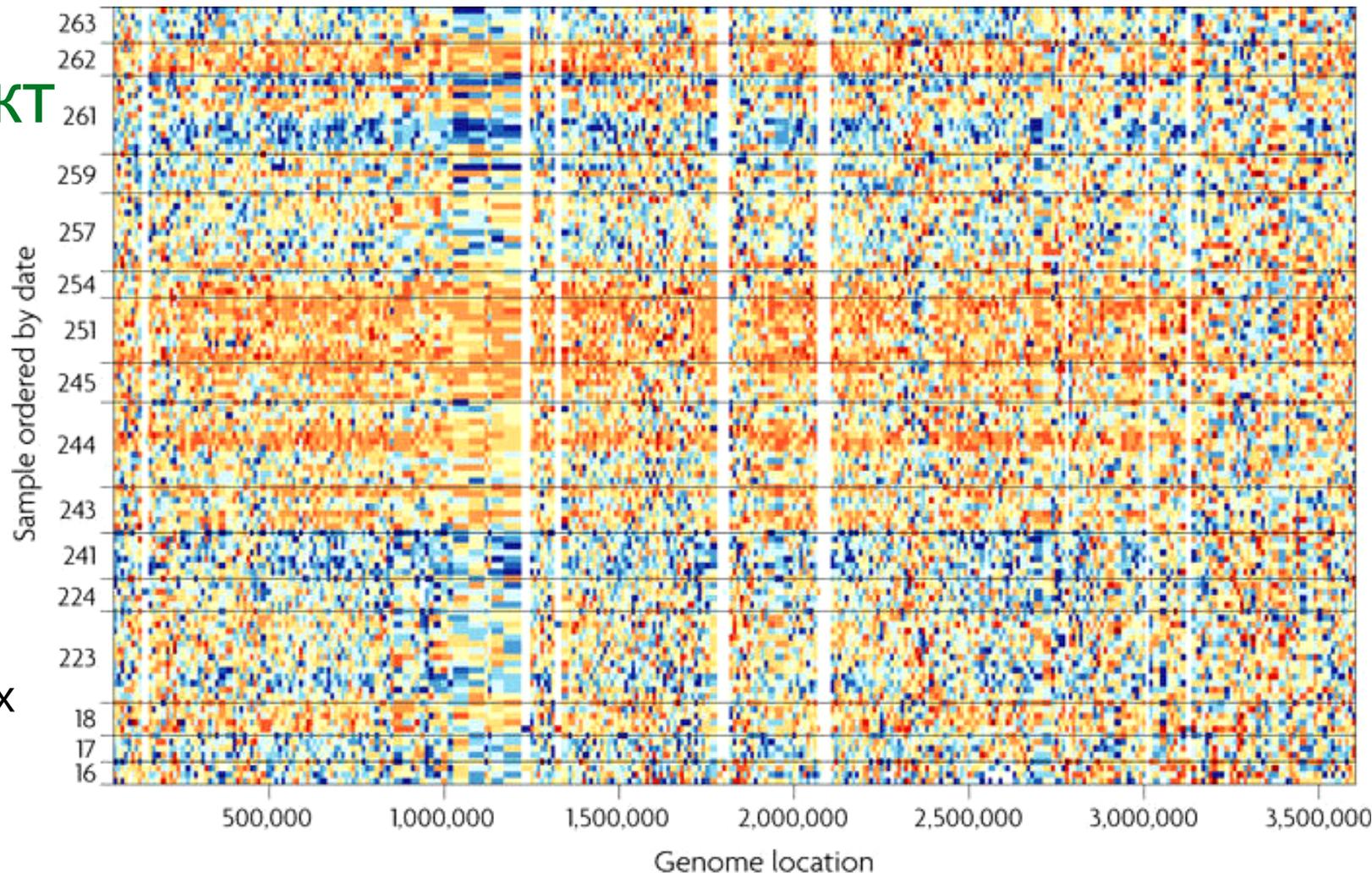


Nature Reviews | Genetics

Данные об экспрессии генов в мочевом пузыре у здоровых пациентов (из исследования рака мочевого пузыря Dyrskjot et al. 2004). Не смотря на нормализацию данных, все еще заметен батч-эффект. Цвет — дата анализа

Leek et al. 2010 Fig.1 c, d

Батч-эффект



Батч-эффект
на примере данных
из проекта
«1000 геномов».

Пробы отсортированы по дате анализа,
разные даты отделены горизонтальными линиями.

Leek et al. 2010 Fig.2

Nature Reviews | Genetics

Как решить проблему батч-эффекта

- Рандомизация (разные тритменты должны быть равномерно распределены по датам)
- Статистическое моделирование и коррекция батч-эффекта
- Анализ суррогатных переменных (SVA)

Действие скрытых факторов (Confounding)



Действие скрытых факторов (Confounding)



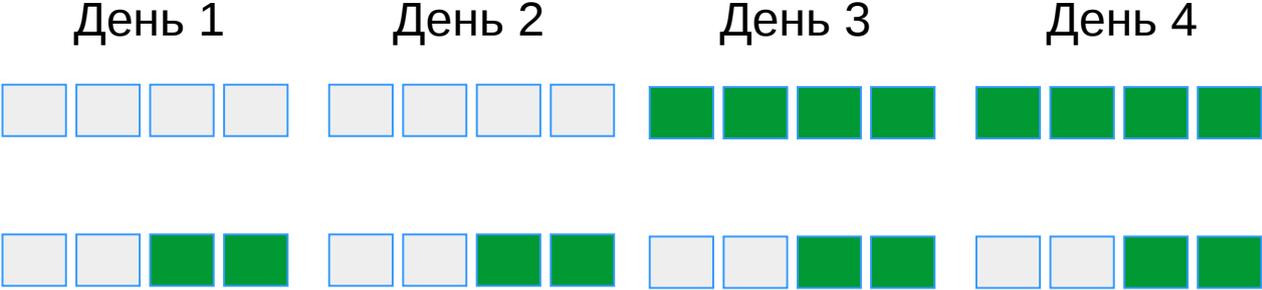
Как решить проблему скрытых факторов?

- Рандомизация
- Подробная запись всех процедурных переменных для последующего анализа суррогатных переменных (SVA)

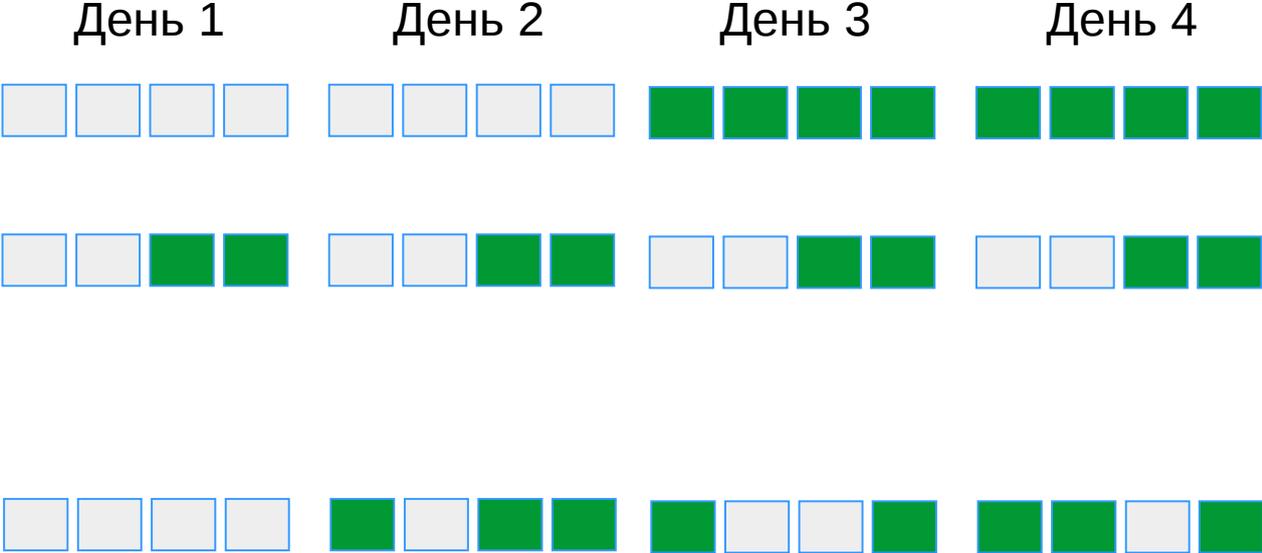
Варианты размещения повторностей



Варианты размещения повторностей



Варианты размещения повторностей



Варианты размещения повторностей



Варианты размещения повторностей

Неудачные варианты:

Погрешность при сравнении опыта и контроля



Систематическая погрешность внутри каждого дня



Лучше, но с ограничениями:

Полностью случайный экспериментальный план



Хороший вариант:

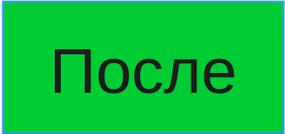
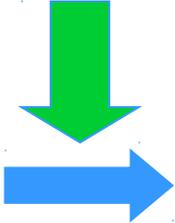
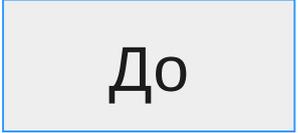
План со случайными блоками



Контроль

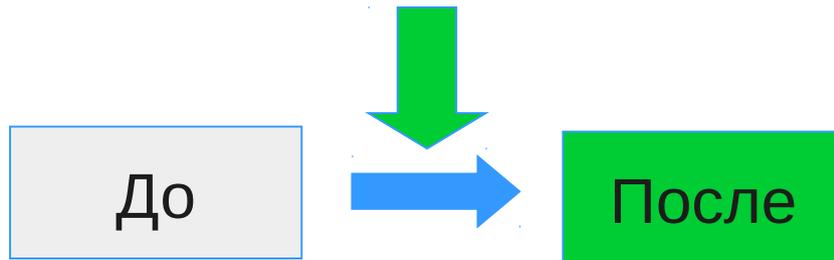
Зачем нужен контроль?

Опыт



Зачем нужен контроль?

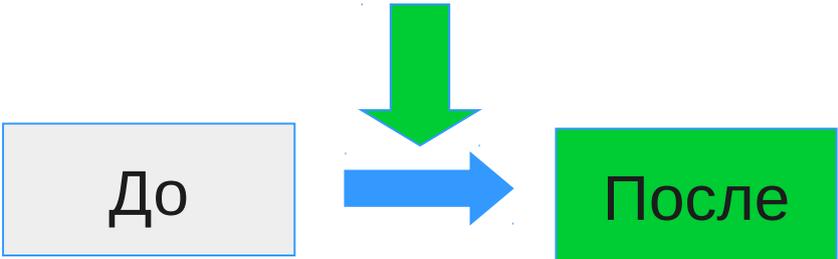
Опыт



Почему изменился объект?

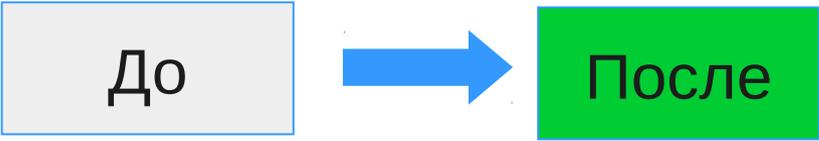
Зачем нужен контроль?

Опыт

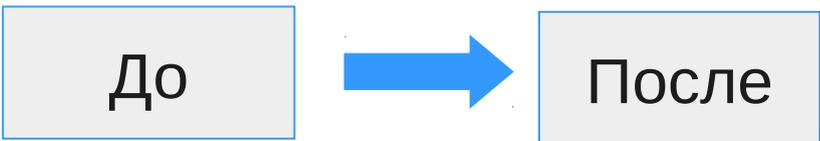


Почему изменился объект?

Контроль



Изменение не связано с воздействием



Изменение связано с воздействием

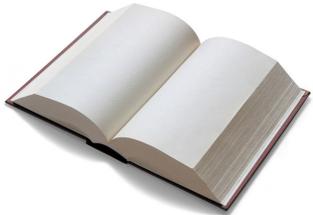
Типы контролей



Типы контролей



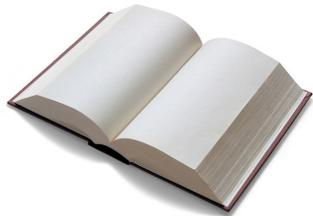
Исторический
(предыдущие
исследования)



Типы контролей



Исторический
(предыдущие
исследования)



Одновременный
(исследуем заново)

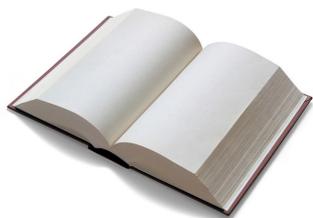
Отрицательный
(нет воздействия)



Типы контролей



Исторический
(предыдущие
исследования)



Одновременный
(исследуем заново)

Положительный
(есть воздействие)



Отрицательный
(нет воздействия)



Что еще можно (и нужно) контролировать?

- Процедурный контроль (разные элементы исследуемого воздействия)
- Валидация экспериментальной системы:
 - Приборы
 - Реактивы

Бывает ли так, что контроль не нужен?

Бывает ли так, что контроль не нужен?

В некоторых случаях контроль не нужен:

- Какой из типов опухоли лучше всего поддается конкретному типу терапии?
- Как изменяется набор белков личинки-паразита при разной температуре среды?

Take-home messages

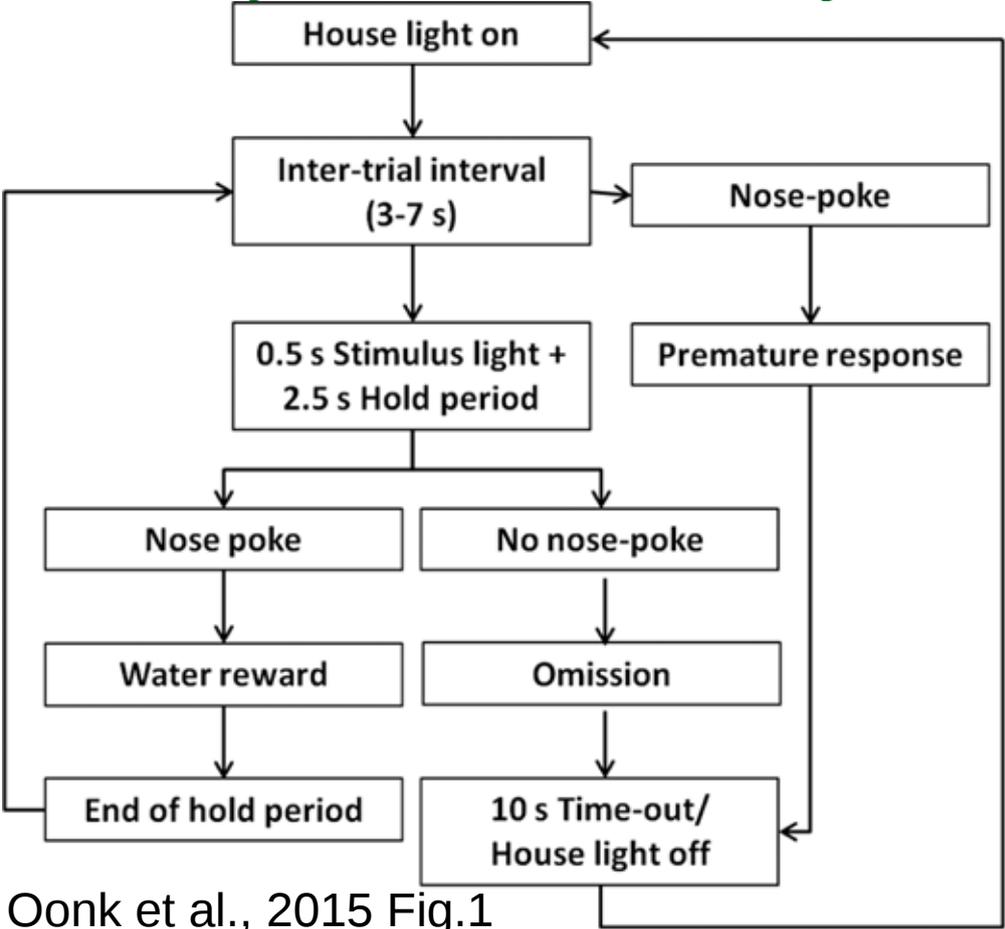
Take-home messages

- Своевременное планирование нужно для минимизации затрат времени, сил и денег, и для получения качественных данных для анализа. (Иначе, garbage in --- garbage out)
- Достаточное количество повторностей, продуманный контроль и рандомизация — вот на чем держится хороший эксперимент

Задачи

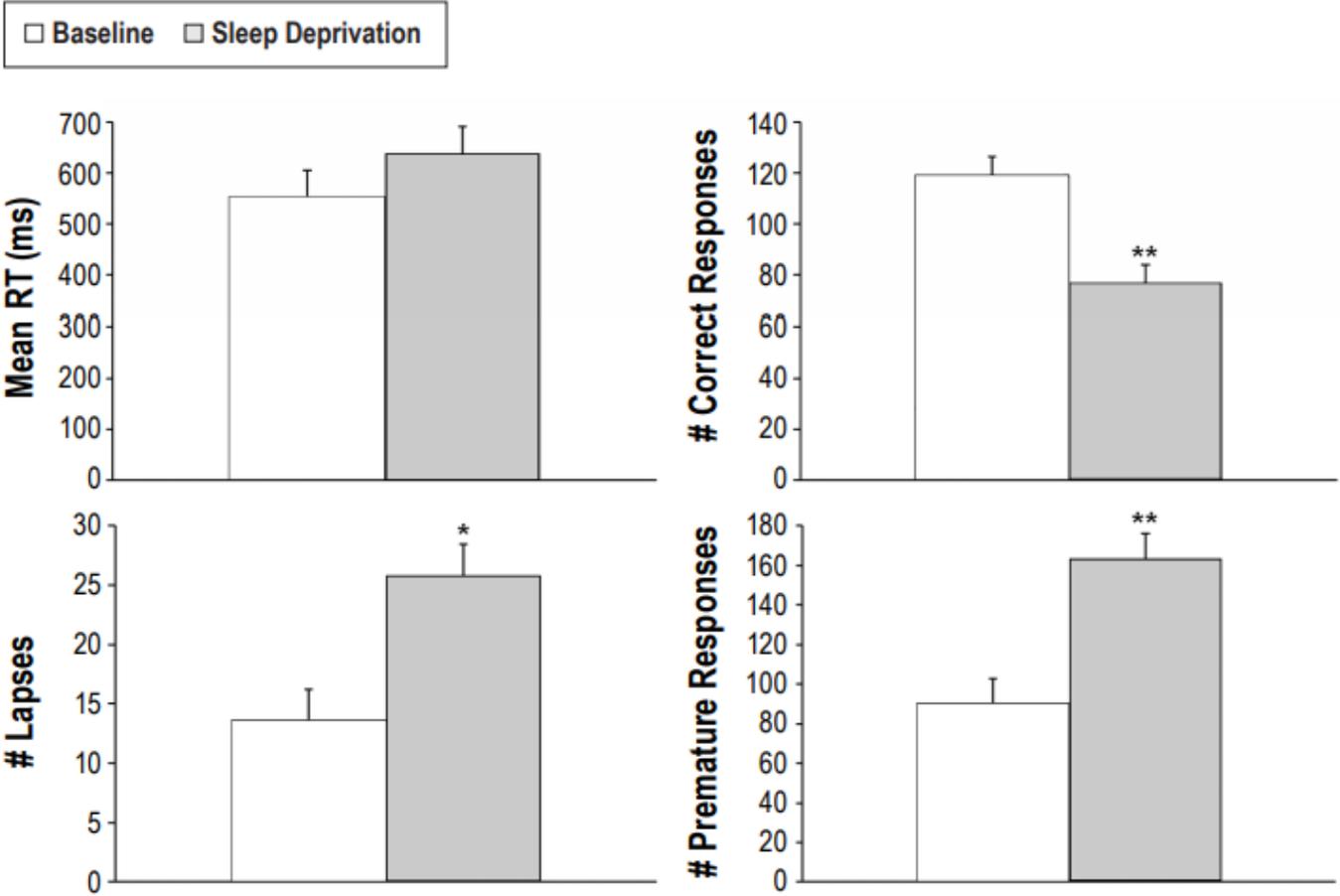
Каким образом депривация сна влияет на реакцию крыс на визуальный стимул?

Схема теста:



Oonk et al., 2015 Fig.1

Каким образом депривация сна влияет на реакцию крыс на визуальный стимул?



Каким образом употребление кофеина
влияет на артериальное давление людей
в зависимости от того пьют ли они кофе обычно?



Каким образом употребление кофеина влияет на артериальное давление людей в зависимости от того пьют ли они кофе обычно?

Выборка
136 человек
Возраст 20-22 года
Без гипертензии

Опрос: сколько чашек кофе в неделю?

Редко пьют кофе
 ≤ 2 чашек

Обычно пьют кофе
 ≥ 3 чашек

Рандомизация

Рандомизация



Кофе

● С кофеином

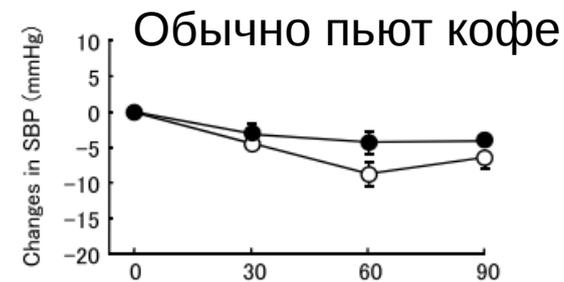
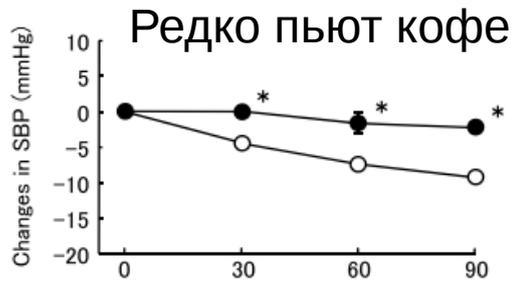
○ Без кофеина (плацебо)

Двойное слепое, плацебо-контролируемое

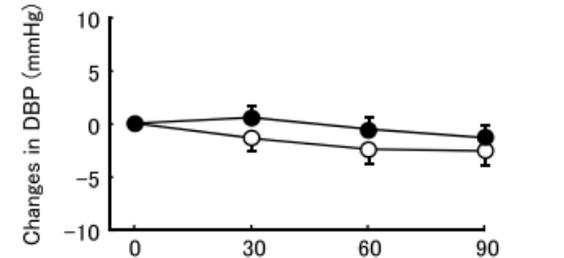
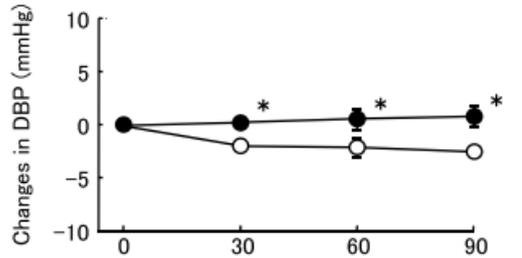
Hara et al. 2014

Каким образом употребление кофеина влияет на артериальное давление людей в зависимости от того пьют ли они кофе обычно?

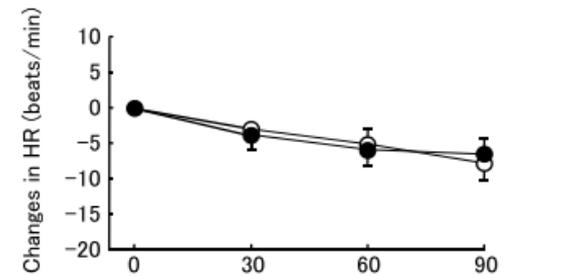
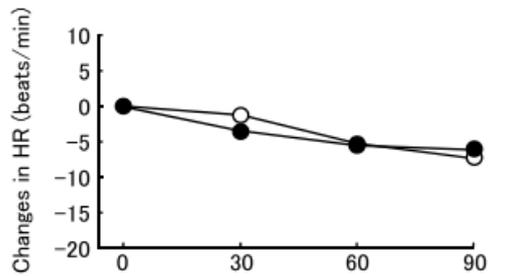
Изменение систолического давления



Изменение диастолического давления

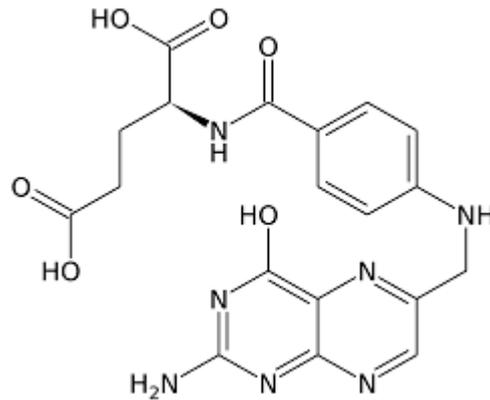


Изменение пульса



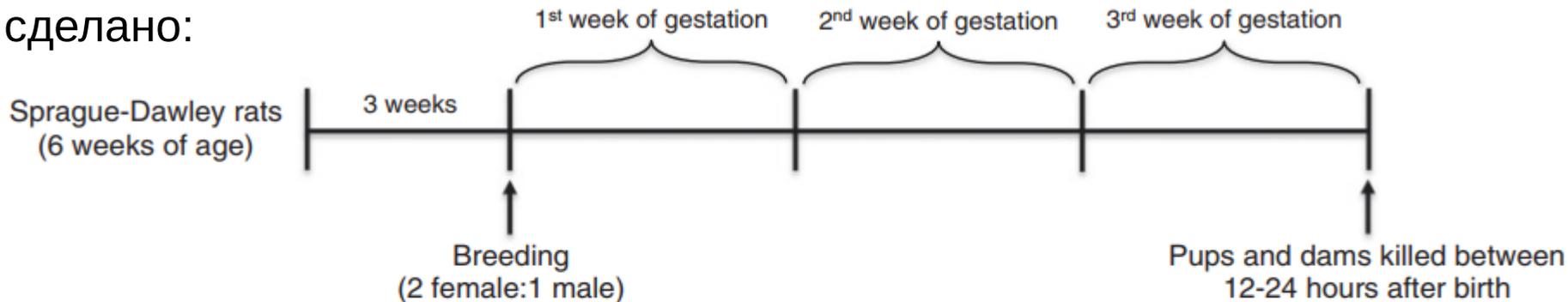
Кофе
● С кофеином
○ Без кофеина (плацебо)

Как добавка фолиевой кислоты на разных сроках гестации влияет на метилирование ДНК и экспрессию генов в разных органах крысят?



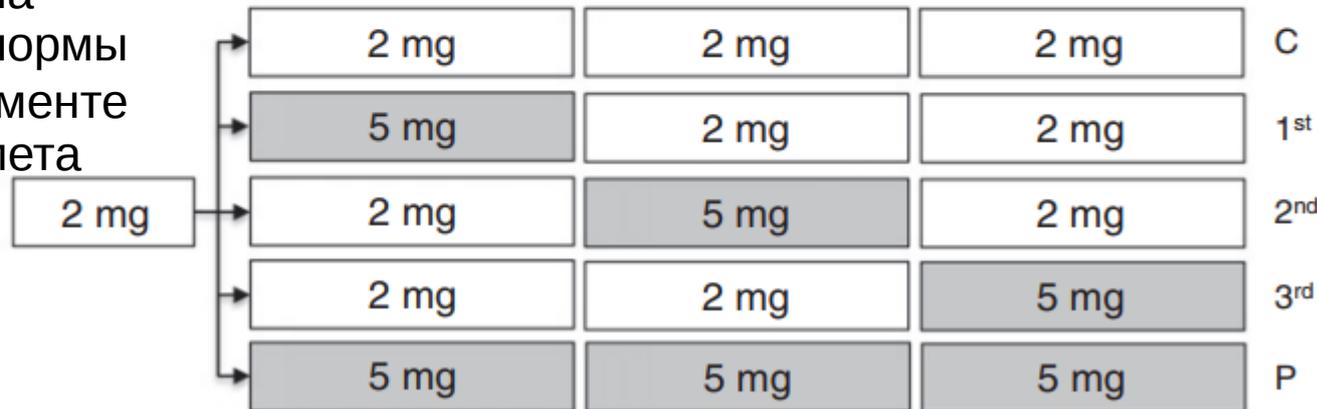
Как добавка фолиевой кислоты на разных сроках гестации влияет на метилирование ДНК и экспрессию генов в разных органах крысят?

Что было сделано:

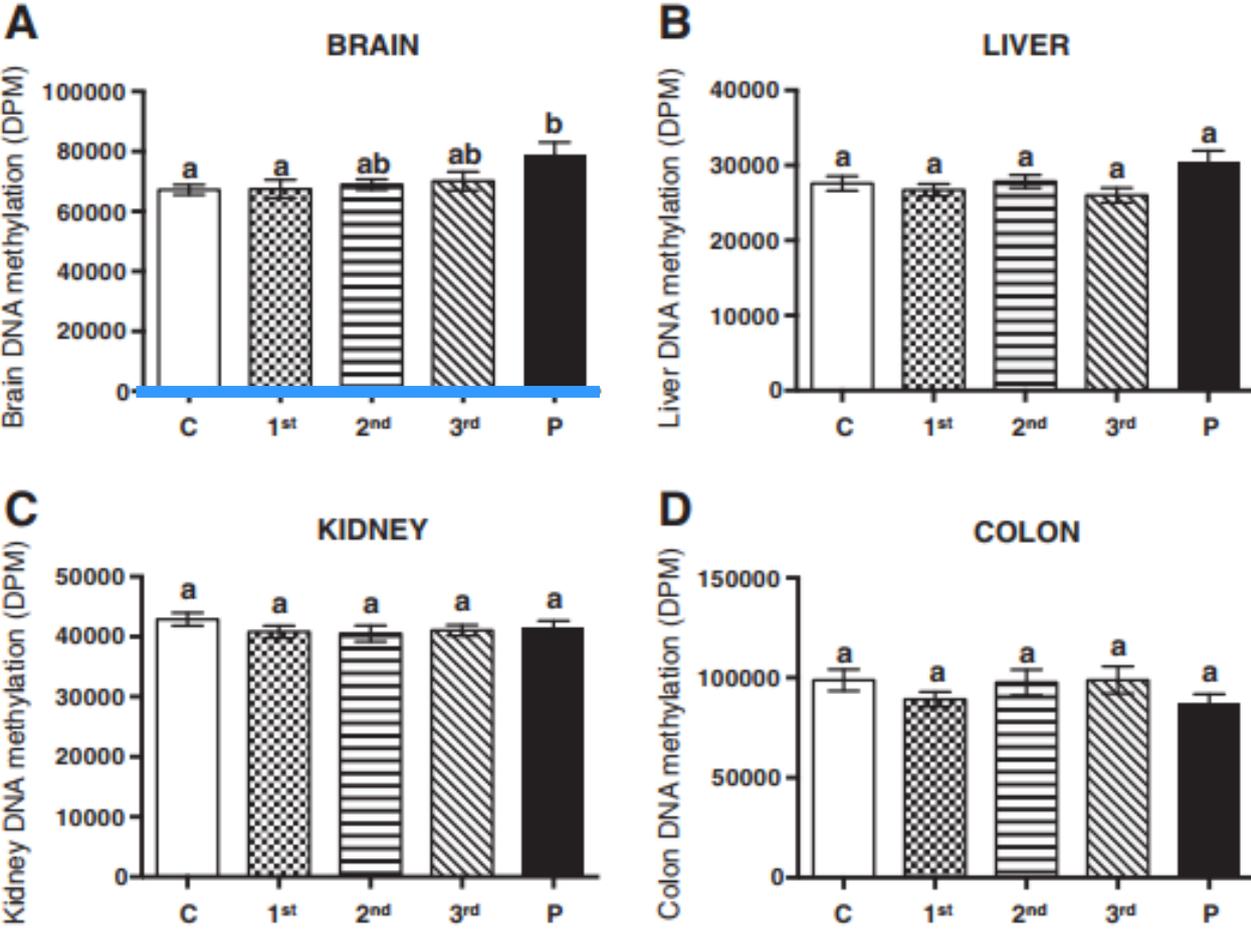


Diet Randomization (folic acid/kg diet)

2 мг/кг — это дневная норма
5 мг/кг — это 2.5 дневных нормы
По 50 самок в каждом тритменте
По одному мышонку из помета
в анализ



Как добавка фолиевой кислоты на разных сроках гестации влияет на метилирование ДНК и экспрессию генов в разных органах крысят?



Общий уровень метилирования