

Sample Size Calculation for Animal Studies with Emphasis on the Ethical Principles of Reduction of Animal Use

Siavash Ahmadi-Noorbakhsh*¹

National Ethics Committee for Biomedical Research, Tehran, Iran.

(Received: 2018/06/22

Accept: 2018/07/21)

Abstract

Background: One of the most important questions at the first steps of designing a laboratory animal research is “How many animals do we need?”. In fact, the number of animals used, acts like a “double-edged sword”, directly affecting the scientific power and ethicalness of a research. Therefore, proper sample size calculation (SSC) is of outmost importance.

Methods: The aim of the present article is to teach methods of SSC. At first, a thorough understanding of basic parameters used for SSC will be developed for readers. Then, the philosophy of SSC will be discussed. Next, we will review the methods of calculating the number of Experimental Units for each type of studies and we will explore a range of available tools to perform the calculations. Methods of spreading the proper number of experimental units across the groups will be discussed and we will finally calculate the required number of animals based on the number of experimental units, group compositions, and the likelihood of animals exiting the study.

Results: Two main methods of SSC for animal research, i.e. Power Analysis and Resource Equation, are presented with the emphasis on the ethical principles of sample size reduction. Pros and cons of each method are discussed and a spreadsheet is provided for readers to perform routine calculations.

Conclusion: The number of animals used can considerably affect various aspects of a study, though, proper determination of it does not follow a strict rule. For an optimum determination, researchers should have a good understanding in statistics and laboratory animal science and be familiar with ethical principles and sound scientific judgement.

Keywords: Animal reduction; Sample size; Number of animals; Power analysis; Resource equation; Animal study

* Corresponding authors: Siavash Ahmadi-Noorbakhsh
E-mail: s.noorb@gmail.com

محاسبه تعداد حیوانات آزمایشگاهی مورد نیاز در پژوهش با تاکید بر اصول اخلاقی کاهش تعداد حیوانات مورد استفاده

سیاوش احمدی نوربخش*

کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی، معاونت تحقیقات و فن‌آوری وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۸/۱۹

چکیده:

سابقه و هدف: یکی از مهم‌ترین سوال‌هایی که به طور معمول در نخستین مراحل طراحی یک پروژه حیوانات آزمایشگاهی مطرح می‌شود، موضوع تعداد حیوانات مورد نیاز است. در حقیقت تعداد حیوانات استفاده شده مشابه یک شمشیر دو لبه اثر کرده و همزمان می‌تواند قدرت علمی یک پژوهش و میزان اخلاقی بودن آن را تعیین کند. بر این اساس، محاسبه صحیح تعداد حیوانات از اهمیت بسزایی برخوردار است.

روش‌ها: در مقاله حاضر روش‌های مختلف محاسبه تعداد حیوانات، مرور شده و آموزش داده می‌شود. در ابتدا درک صحیحی از پارامترهای آماری استفاده شده برای محاسبه تعداد حیوانات ایجاد می‌شود. سپس فلسفه «محاسبه تعداد حیوانات» تشریح شده و در ادامه روش‌ها و ابزارهای استفاده شده برای محاسبه تعداد «واحد آزمون» ارائه می‌شوند. آنگاه روش‌های مختلف تعیین تعداد واحدهای آزمون در گروه‌ها بررسی شده و در نهایت نحوه محاسبه تعداد حیوانات مورد نیاز، حسب تعداد واحدهای آزمون، ترکیب گروه‌ها و احتمال ریزش حیوانات از مطالعه، ارائه می‌شود.

یافته‌ها: دو روش اصلی محاسبه تعداد حیوانات (روش‌های آنالیز توان و برابری منابع) با توجه به اصول اخلاقی کاهش تعداد حیوانات در مطالعه‌ها، ارائه شدند. مزایا و معایب هر یک از روش‌ها مورد بحث قرار گرفته و یک فایل صفحه گسترده برای محاسبه تعداد حیوانات در اختیار خوانندگان قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: تعداد حیوانات استفاده شده می‌تواند ابعاد متعدد مطالعه‌های تجربی را به طور چشمگیری تحت تأثیر قرار دهد. با این حال، تعیین صحیح تعداد حیوانات در مطالعه‌ها از قوانین قطعی و غیر قابل تغییر پیروی نمی‌کند. برای حصول بهترین نتیجه لازم است پژوهشگران واجد اطلاعات مناسب در زمینه آمار، دانش حیوانات آزمایشگاهی، قوانین اخلاقی استفاده از حیوانات و قضاوت علمی صحیح باشند.

واژگان کلیدی: حیوانات آزمایشگاهی، تعداد حیوانات، ساینز نمونه، آمار، توان مطالعه، پراکنندگی، واحد آزمون

مقدمه:

بوده و به دلیل پراکنندگی داده‌ها ممکن است ارزیابی‌های آماری نیز نتواند وجود یا نبود آثار حقیقی تیمار را مشخص کند. بنابراین به دلیل عدم حصول یک نتیجه معتبر علمی، حیواناتی که در مطالعه استفاده شده بودند دچار درد و رنج بیهوده شده‌اند، انتشار نتایج این پژوهش‌ها موجب گمراهی دیگر پژوهشگران شده، و در پی آن نیز لازم است پژوهش با استفاده از گروه‌های جدیدی از حیوانات تکرار شود. در کنار موارد فوق، چنانچه تصبیح منابع زمانی، انرژی، نیروی انسانی و مالی نیز در

انتخاب صحیح تعداد حیوانات استفاده شده در پژوهش (تعداد نمونه)، یکی از سه رکن اساسی حفظ حقوق حیوانات آزمایشگاهی است. چنانچه تعداد حیوانات بیش از میزان لازم در نظر گرفته شود، حیوانات اضافه، بیهوده در مطالعه به کار گرفته شده و رنج بی‌دلیل را متحمل شده‌اند. از طرفی اگر تعداد حیوانات کمتر از حد لزوم در نظر گرفته شود، نتایج حاصله نمی‌تواند معیار مناسبی برای جمعیت مطالعه شده

نویسنده مسئول: سیاوش احمدی نوربخش

پست الکترونیکی: s.noorb@gmail.com

حیوانات قفس از این غذا استفاده کنند، در اینجا هر قفس از حیوانات که ممکن است حاوی به عنوان مثال پنج قطعه موش باشد، معادل یک «واحد آزمون» در نظر گرفته می‌شود.

۵) اگر به طور مثال پوست نواحی خاصی از یک حیوان موثراتی شده و به صورت تصادفی داروهای مختلفی روی قسمت‌های مختلف پوست حیوان مالیده شود، به طوری که اثر دارو در هیچ کدام از قسمت‌ها با قسمت دیگر تداخل نداشته باشد و در نهایت نیز اندازه‌گیری جداگانه روی هر کدام از این قسمت‌ها انجام شود، آنگاه هر قسمت جداگانه از پوست معادل یک «واحد آزمون» است و یک حیوان می‌تواند به تنهایی به عنوان چند واحد آزمون محاسبه شود.

«گروه‌بندی واحدهای آزمون مشابه حسب فاکتورهای مزاحم» (blocking factor): باید توجه داشت که اگر برخی ویژگی‌های غیراصلی حیوانات که مطلوب پژوهشگر نبوده و در حقیقت فاکتورهای مزاحم پژوهش هستند با یکدیگر تفاوت کند، به عنوان مثال برخی حیوانات در قفس‌های ردیف پایین که هوا سردتر است و گروهی در قفس‌های ردیف بالا که هوای گرم‌تری دارند نگهداری شوند، یا به طور ناخواسته یک گروه از حیوانات چاق و گروه دیگر لاغر باشند، در اینجا می‌توان شرایط مختلف نگهداری یا چاق و لاغر بودن را به عنوان «فاکتور گروه‌بندی» در نظر گرفته و نه «واحد آزمون» و در پی آن آثار این فاکتورها را با استفاده از روش‌های آماری حذف کرد. این امر یکی از راه‌های کاهش پراکندگی داده‌ها بوده و موجب کاهش تعداد حیوانات (ضمن حفظ توان کافی برای مطالعه) می‌شود.

تعداد حیوانات مورد نیاز یا تعداد نمونه (sample size): پس از محاسبه تعداد واحدهای آزمون مورد نیاز و در نظر گرفتن ارتباط بین تعداد واحدهای آزمون و تعداد حیوانات (ادامه مطلب را ببینید)، می‌توان تعداد نمونه را محاسبه کرد. در اصل تعداد حیوانات استفاده شده در یک پژوهش را می‌توان هر مقداری در نظر گرفت. اما باید توجه داشت که تعداد حیوانات استفاده شده، به طور مستقیم با سایر پارامترهای آماری مرتبط بوده و کیفیت نتایج مطالعه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. به عنوان مثال تعداد بسیار کم حیوانات موجب افت توان مطالعه شده و مطالعه موفق به یافت آثار ظریف تیمار نخواهد بود. تعداد بسیار زیاد حیوانات موجب اتلاف منابع شده و از نظر اخلاقی اقدامی مردود است.

اندازه اثر (effect size): عبارت است از کم‌ترین میزان اختلاف بین گروه‌های مورد آزمون که از نظر بالینی یا کاربردی واجد اهمیت و مقدار مفید بوده و پژوهشگر مایل است آن را کشف کند. اندازه اثر باید پیش از آغاز پژوهش تعیین شود. از این مقدار با عنوان «سیگنال» نیز تعبیر می‌شود؛ گویی اینکه پژوهشگر به دنبال یافت یک سیگنال رادیویی مطلوب در میان انبوهی از نویزها و فرکانس‌های مزاحم (یا همان انحراف معیار ادامه مطلب را ببینید) است. در داده‌های کیفی اندازه اثر عبارت از نسبت وقوع رویدادها بین دو گروه است. در داده‌های کمی، اندازه اثر عبارت از تفاوت میانگین بین دو گروه بوده که به صورت قدر مطلق محاسبه می‌شود و همواره عددی مثبت است و باید دارای یک مفهوم کاربردی باشد (به عنوان مثال ۱۰ میلی‌متر جیوه اختلاف فشار) و نمی‌تواند به شکل درصد بیان شود. به عنوان مثال، پژوهشگری ممکن است فرض را بر این بگذارد که داروی x که برای کاهش فشار خون رت‌ها آزمایش می‌شود، تنها در صورتی داروی مفیدی است که بتواند میانگین فشار خون گروه تیمار را ۲۰ میلی‌متر جیوه نسبت به گروه کنترل منفی کاهش دهد. در اینجا، «اندازه اثر» معادل ۲۰ خواهد بود.

اندازه اثر حسب تجربه پژوهشگر و با توجه به کم‌ترین میزان اثر که از نظر بالینی اهمیت داشته و وضعیت بیماران را تحت تأثیر قرار می‌دهد، تعیین می‌شود. توجه شود که در مورد این پارامتر نباید به نتایج قبلی مطالعه‌های پیش‌بالینی (مطالعه‌های حیوانات آزمایشگاهی و مطالعه‌های در سطح اولیه) مراجعه کرد، بلکه لازم است پژوهشگر حسب قضاوت حرفه‌ای خود یا مطالعه‌های بالینی به این نتیجه برسد که چه میزان اختلاف بین گروه‌ها از نظر وی مهم و مطلوب است و بر این اساس مقدار اندازه اثر را تعیین کند. چنانچه پژوهشگر معیار درستی از مقدار اندازه اثر نداشت، باید از سایر روش‌های محاسبه تعداد نمونه که نیازی به این پارامتر ندارند، استفاده کند. در حالت دیگر، در صورت دانستن سایر پارامترهای مورد نیاز،

نظر گرفته شود، اهمیت بسزای تعیین صحیح تعداد حیوانات در پژوهش‌ها مشخص می‌شود. محاسبه صحیح تعداد نمونه، نیازمند آشنایی پژوهشگر با مفاهیم دانش آمار بوده و در حقیقت باور بر این است که دانش وسیع در علم آمار زبستی، نقش بسیار عظیمی در حفظ رفاه حیوانات و رعایت اخلاق در کار با حیوانات آزمایشگاهی دارد و به عنوان مثال روش‌های متعددی برای کاهش تعداد حیوانات مورد نیاز با استفاده از تکنیک‌های آماری توصیف شده است (۱). در این مجال روش‌های تعیین تعداد نمونه در پژوهش‌های مبتنی بر آنالیز داده‌های پارامتری، به شکلی ساده بیان شده و امید بر این است که در پایان خوانندگان محترم به درک عمیقی از این موضوع دست یابند.

مفاهیم پایه:

پیش از بررسی انواع روش‌های محاسبه تعداد نمونه، لازم است پژوهشگران با برخی مفاهیم پایه در این زمینه آشنایی دقیقی پیدا کنند:

تقسیم‌بندی مطالعه‌ها:

مطالعه‌های انجام شده روی حیوانات را می‌توان به دو دسته کلی مطالعه‌های ایپیدمیولوژیک مشاهده‌ای و مطالعه‌های مداخله‌ای کنترل شده تقسیم‌بندی کرد. در مطالعه‌های مداخله‌ای، به طورعموم میانگین متغیرها برای هر گروه محاسبه شده و با هم مقایسه می‌شود. به طور معمول در شروع پژوهش یک فرض صفر (null hypothesis) در نظر گرفته می‌شود که بر مبنای آن پژوهشگر فرض می‌کند که بین گروه‌ها هیچ تفاوتی از نظر پاسخ به تیمار وجود ندارد و یک فرض جایگزین (alternative hypothesis) انتخاب می‌شود که به وجود تفاوت بین گروه‌ها دلالت دارد. سپس پژوهش مورد نظر انجام شده و حسب نتایج به دست آمده، فرض صفر/فرض جایگزین رد یا تایید می‌شوند. به طور معمول هدف پژوهشگر این است که نشان دهد استفاده از تیمار موجب بروز تفاوت «واقعی» در نتایج گروه‌ها شده است؛ به عنوان مثال در رت‌های مدل فشار خون، حقیقتاً داروی x - و نه تفاوت بین حیوانات یا شرایط نگهداری آن‌ها بوده که موجب کاهش فشار خون شده است.

«واحد آزمون» (experimental unit): عبارت است از یک ماهیت مستقل که می‌توان آن را به صورت تصادفی و مستقل از سایر واحدهای آزمون، تحت تیمار خاصی قرار داد. دو مورد از اشتباه‌های رایج پژوهشگران در طراحی پژوهش، تشخیص ندادن صحیح واحد آزمون یا عدم تمایز بین تعداد واحد آزمون و تعداد حیوانات مورد نیاز است که در هر دو مورد پژوهش دچار اشکال‌های اساسی خواهد شد. در حقیقت هر واحد آزمون، یک واحد تجزیه و تحلیل آماری محسوب می‌شود و همان‌طور که در مثال‌های ادامه مطلب دیده می‌شود، تعداد واحد آزمون فارغ از تعداد حیوانات استفاده شده است (۱، ۲):

۱) تعدادی خرگوش آزمایشگاهی ممکن است به صورت گروهی یا انفرادی نگهداری شوند. اما، هر یک از آنها جداگانه و به صورت تصادفی تحت تیمار خاصی (به عنوان مثال تزریق داروی x) قرار می‌گیرند. در اینجا هر خرگوش یک «واحد آزمون» است.

۲) چنانچه بررسی اثر چند تیمار (به طور مثال اثر چند داروی مختلف کاهش قند خون) بر یک حیوان در زمان‌های مختلف انجام شود و بین آزمایش هر دارو با داروی بعدی، دوره استراحتی وجود داشته باشد که تمامی آثار فیزیکی و روانی ناشی از داروی قبلی برطرف شود، در اینجا هر حیوان در هر بازه زمانی آزمون دارو، معادل یک «واحد آزمون» در نظر گرفته می‌شود. بنابراین در چنین شرایطی، یک حیوان می‌تواند معادل چند «واحد آزمون» محسوب شود؛ هر چند باید توجه داشت که در انجام چنین پژوهش‌هایی باید قوانین اخلاقی استفاده چندباره از یک حیوان در پژوهش مورد ملاحظه دقیق قرار گیرد.

۳) چنانچه در یک مطالعه ناقص الخلقه‌زایی، حیوانات مادر به گروه‌های مختلف تقسیم شده و مواد تراژون مختلف در هر گروه استفاده شود، اما در نهایت تمامی اندازه‌گیری‌ها روی جنین این حیوانات انجام شود، در اینجا هر حیوان مادر به عنوان یک «واحد آزمون» محسوب می‌شود و به طور مثال چنانچه یک مادر واجد سه فرزند باشد، سه فرزند معادل یک واحد آزمون تلقی می‌شوند.

۴) چنانچه تمام حیوانات یک قفس در شرایط مشابه نگهداری شوند و تیمار هر قفس به صورت تصادفی تعیین شده و در غذای حیوانات قفس ریخته شده و همه

$$SD = SEM \times \sqrt{n}$$

که در اینجا، n معادل تعداد نمونه‌ها است. در ضمن چنانچه به جای انحراف معیار، میزان بازه اطمینان (Confidence Interval: CI) ارائه شده بود، برای تبدیل آن به انحراف معیار، از فرمول زیر استفاده کنید (۲):

$$SD = \frac{\sqrt{n} \times (\text{upper limit} - \text{lower limit})}{3.92}$$

که در اینجا، upper limit-lower limit نشان‌دهنده تفاضل کران‌های بالا و پایین داده‌هاست.

در نهایت چنانچه یافتن مقدار موثقی برای انحراف معیار ممکن نبود، می‌توان یکی از سه رویکرد زیر را در پیش گرفت:

* بهتر است به جای در نظرگیری انحراف معیار و اندازه اثر هر یک به تنهایی، از مقدار «اندازه اثر استاندارد» استفاده شود (به توضیحات ذیل توجه کنید).

* می‌توان حسب بالاترین و پایین‌ترین میزان تخمینی انحراف معیار مطالعه‌های قبلی، تعداد حیوانات مورد نیاز را تعیین و بهترین و بدترین سناریوها را بررسی کرد و محدوده تعداد حیوانات مورد نیاز را حسب حداقل و حداکثر احتمالی انحراف معیار به دست آورد.

* می‌توان از آمار بایسین (Bayesian) برای تخمین مقادیر مورد نیاز استفاده کرده (۵، ۶) و سپس به محاسبه تعداد نمونه پرداخت (۷، ۸).

همان‌گونه که ذکر شد، بالا بودن مقدار انحراف معیار موجب افزایش «نویز» در مطالعه می‌شود. برای رفع معضل بزرگی انحراف معیار، اصولاً هدف پژوهشگر باید بر پایه کاهش میزان پراکندگی داده‌ها باشد. با این حال، برخی پژوهشگران این موضوع را نادیده گرفته و برای رفع این معضل به طور مستقیم به افزایش تعداد حیوانات روی می‌آورند که با وجود صحیح بودن این اقدام از منظر علمی، از نظر اخلاقی اقدامی نادرست است. در حقیقت بهترین نوع اقدام مسئولانه و اخلاقی در کاهش میزان انحراف معیار باید مبتنی بر کاهش پراکندگی داده‌ها باشد که به نوبه خود موجب کاهش تعداد حیوانات مورد نیاز نیز خواهد شد. روش‌های بی‌شماری برای کاهش میزان پراکندگی داده‌ها وجود دارد که محوریت تمامی آن‌ها بر پایه حفظ رفاه حیوانات مورد پژوهش و رعایت اصول اخلاقی در کار با حیوانات آزمایشگاهی است. در حقیقت ایجاد شرایط نامساعد، درد، یا رنج برای حیوانات موجب بروز تغییرهای بیوشیمیایی بسیار وسیع نظیر تغییرهایی در عیار ایپی نفرین، نوراپینفرین، کورتیزول، کورتیکواسترون، گلوکز، گلوکاگون، سدیم، اندروفین‌ها، انکفالین‌ها، رنین، آلدوسترون، وازوپرسین، لیپوپروپین و بیش از ۳۰ ماده بسیار مهم دیگر شده که به دلیل آثار فیزیولوژیک بسیار وسیع این مواد، حیوانات تحت آزمون به طور کامل از وضعیت طبیعی خود خارج شده و هرگز به صورت یک چارچوب بیولوژیک مرجع قابل استناد نخواهند بود (۹). آثار این امر در تخریب نتایج پژوهش‌ها به حدی شدید است که برخی از آن به عنوان «کارما» یا «بازگشت نتیجه عملکرد افراد به خودشان» یاد می‌کنند. از سوی دیگر، رعایت اخلاق در کار با حیوانات در مراحل مختلف پژوهش، می‌تواند تاثیر چشمگیری در کاهش میزان پراکندگی داده‌ها و انحراف معیار ایفا کرده و ضمن کاهش تعداد حیوانات مورد نیاز، کاهش هزینه‌های زمانی، انرژی، نیروی انسانی و مالی، موجب افزایش کیفیت نتایج حاصله شود. در این زمینه می‌توان به «راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در امور علمی» مصوب معاونت تحقیقات و فن‌آوری وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی یا سایر منابع مربوطه (۹، ۱۰) مراجعه کرد. در ادامه، برخی اقدام‌های قابل انجام در مراحل مختلف استفاده از حیوانات که می‌توانند موجب کاهش انحراف معیار داده‌های حاصله شوند، آورده شده است:

مرحله تولیدمثل و پرورش: برنامه‌ریزی جفت‌اندازی‌های بین حیوانات و مدیریت وضعیت ژنتیک حیوانات نتاج، یکسان‌سازی وضعیت ژنتیک حیوانات استفاده شده تا حد امکان؛ نگهداری حیوانات در شرایط مساعد گونه آن‌ها برای پرهیز از بروز اختلال‌های بیولوژیک در آن‌ها.

طراحی پژوهش: استفاده از ساختار صحیح پژوهش؛ طرح‌های آماری صحیح؛ تصادفی کردن گروه‌ها.

حمل‌ونقل حیوانات: رعایت شرایط صحیح حمل‌ونقل برای ایجاد کمترین آثار

پژوهشگر می‌تواند مقادیر مختلف فرضی برای تعداد حیوانات را انتخاب کرده و با محاسبه فرمول فوق، میزان اندازه اثر قابل تشخیص در صورت استفاده از تعداد خاص حیوانات را تعیین کند و مناسب‌ترین اندازه اثر که قادر به برآوردن انتظارهای پژوهشگر است را انتخاب کند. یکی از اشتباه‌های رایج در محاسبه تعداد نمونه، دست بالا گرفتن اندازه اثر است که موجب کاهش شدید و گاهی غیر قابل قبول در تعداد نمونه‌های مورد نیاز می‌شود (۳).

انحراف معیار (standard deviation): مقدار انحراف معیار، میزان پراکندگی داده‌های کمی را نشان می‌دهد و از آن به عنوان «نویز» (سیگنال مزاحم) یاد می‌شود. افزایش انحراف معیار یا افزایش پراکندگی داده‌ها موجب می‌شود که نتوان مقایسه آماری دقیقی بین گروه‌ها انجام داد و در نتیجه آثار ظریف تیمار ممکن است به راحتی نادیده گرفته شده و حتی یک پژوهش بسیار ارزشمند به اشتباه شکست‌خورده تلقی شود. در ضمن یکی از اشتباه‌های شایع پژوهشگران، در نظر گرفتن مقادیر بسیار اندک انحراف معیار در هنگام طراحی پژوهش بوده که موجب کاهش شدید و گاهی غیر قابل قبول - تعداد حیوانات مورد نیاز می‌شود (۳).

یکی از معضله‌های محاسبه تعداد حیوانات مورد نیاز به روش‌های دقیق آماری، به دست آوردن تخمین صحیحی از مقدار انحراف معیار است. در حقیقت مقدار دقیق انحراف معیار تنها زمانی قابل محاسبه است که مطالعه انجام شده و داده‌های حاصله مورد آزمون آماری قرار گرفته باشند. بنابراین پیش از انجام مطالعه و در مرحله محاسبه تعداد حیوانات مورد نیاز، اصولاً نمی‌توان مقدار دقیقی برای انحراف معیار در نظر گرفت؛ چرا که در اساس هنوز مطالعه‌ای انجام نشده است؛ بنابراین هر مقداری که برای این پارامتر در نظر گرفته شود، در بهترین حالت یک مقدار تخمینی است. برای تخمین این پارامتر پژوهشگران از روش‌های زیر ممکن است استفاده کنند:

(۱) استفاده از تجربه‌های پژوهش‌های قبلی پژوهشگر - که روی حیوانات مشابه، توسط ابزارهای مشابه، با روش‌های کار و توسط پرسنل مشابه انجام شده است. در صورتی که تیمار مورد نظر شما تا کنون تست نشده است، اما تجربه‌های قبلی شما روی حیوانات مشابه و با روش‌های مشابه و در آزمایشگاهی مشابه انجام شده باشد، با توجه به تفاوت‌های به احتمال زیاد بین انحراف معیار تیمارهای مختلف، بهتر است فقط از انحراف معیار گروه کنترل مطالعه‌های قبلی برای تخمین انحراف معیار مطالعه فعلی استفاده کنید (۲).

(۲) انجام یک مطالعه پایلوت؛ البته باید توجه داشت که مطالعه‌های پایلوت روی تعداد کمی از حیوانات انجام شده و ممکن است انحراف معیار محاسبه شده در این تعداد قابل اطمینان و تمهیم به مطالعه‌های بزرگ‌تر نباشد (۴)، به نحوی که پیشنهاد شده چنانچه تعداد کل حیوانات استفاده شده در مطالعه قبلی کمتر از ۱۰ بوده باشد، احتمال کمی وجود دارد که بتوان با استفاده از نتایج آن مطالعه به تخمین دقیقی از مقدار انحراف معیار اقدام کرد (۲).

(۳) مراجعه به مقاله‌های مشابه؛ در این موارد نیز بهتر است انحراف معیار گروه‌های کنترل در مقاله‌های مشابه قبلی استفاده شود، چرا که انحراف معیار گروه‌های تیمار ممکن است بسیار متفاوت با مطالعه شما باشد. در این رابطه پیشنهاد می‌شود که چندین مطالعه که متدولوژی و روش کار و ابزارهای استفاده شده بسیار شبیه به مطالعه شما را دارند، بررسی شده و یک میانگین تخمینی از انحراف معیار آن‌ها برآورد شود. با این حال، استفاده از داده‌های مطالعه‌های قبلی باید با احتیاط زیادی انجام شود، چرا که هر نوع تفاوت در سویه حیوانات استفاده شده، نوع غذا، شرایط محیط نگهداری و بسیاری متغیرهای دیگر ممکن است موجب بروز تفاوت شدید بین انحراف معیار مطالعه‌های قبلی و انحراف معیار مطالعه شما باشد. چنانچه نیاز به محاسبه انحراف معیار با استفاده از داده‌های مطالعه‌های قبلی باشد، می‌توان از فایل صفحه گسترده ارائه شده در منبع (۲) به آدرس <https://goo.gl/bSAuV2> (برای طرح unpaired) و <https://goo.gl/XpkVQR> (برای طرح paired) استفاده کرد.

همچنین توجه شود که در برخی مطالعه‌ها به جای انحراف معیار (SD)، مقدار خطای استاندارد میانگین (Standard Error of the Mean: SEM) ارائه شده است. در این موارد برای به دست آوردن انحراف معیار می‌توان از فرمول زیر استفاده کرد (۲):

احساس کرد که اگر مقدار p معادل یک درصد ($p=0.01$) باشد، می‌تواند شاهدهی قوی برای پشتیبانی از یک فرضیه بوده ولی به عنوان مثال p معادل ۲۰ درصد ($p=0.20$) شاهد ضعیفی است؛ اما هرگز p معادل ۵ درصد را به عنوان یک عدد ویژه عنوان نکرد (۱۱). متأسفانه استفاده نادرست از عدد p برای ارزیابی داده‌ها، امروزه در سطح وسیعی در جامعه علمی شیوع داشته و به اشتباه به عنوان یک عدد «جادویی» تعیین کننده موفقیت مطالعه‌ها تبدیل شده است. عمده دلیل این موضوع به آشنا نبودن صحیح بسیاری از پژوهشگران با فلسفه تدوین این عدد و همچنین آشنا نبودن با ارتباطات این عدد با سایر اجزای آماری پژوهش با می‌گردد که در این رابطه مراجعه به منابع تخصصی آمار توصیه می‌شود.

توان (power) و خطای نوع دو (type II error): بتا: توان یک مطالعه، میزان توانایی آن مطالعه در تشخیص اثر یک تیمار با فرض اینکه این اثر درحقیقت وجود داشته باشد است. از طرفی، خطای نوع دو عبارت از احتمال ناتوانی در تشخیص اثر یک تیمار با فرض اینکه این اثر درحقیقت وجود داشته باشد است. بنابراین نتیجه می‌گیریم که «توان» مطالعه معادل عکس مقدار خطای نوع دو یا به عبارتی معادل $1 - \beta$ خواهد بود. در این رابطه دانشمندی به نام کوهن پیشنهاد کرده است که میزان 0.2 (معادل احتمال 0.8 درصد) ناتوانی در تشخیص بروز یک اثر، در اغلب پژوهش‌ها میزانی قابل قبول است، بنابراین مقدار توان قابل قبول در بسیاری مطالعه‌ها معادل 0.8 (یعنی $0.2 - 1$) یا به عبارتی 0.8 درصد احتمال تشخیص یک اثر - در صورتی که درحقیقت وجود داشته باشد - خواهد بود. توان مطالعه‌ها به طور معمول حسب سوال پژوهش ممکن است بین 0.8 درصد تا 0.99 درصد تنظیم شود. اگر در مطالعه‌ای، نظیر تست ایمن بودن یک واکسن، عواقب ناتوانی در تشخیص یک اثر جدی و خطرناک باشد، بهتر است توان مطالعه را تا حد امکان بالا (به طور مثال 0.99 درصد) در نظر گرفت. اما در مطالعه‌های بنیادین که فقط مایل به یافتن آثار بزرگ هستیم، خطای مطالعه ممکن است واجد عواقب خطرناکی نبوده و توان 0.8 درصد یا کمتر برای مطالعه کافی باشد. در هر صورت توجه شود که افزایش مقدار توان مطالعه، تعداد حیوانات مورد نیاز را می‌تواند به شدت افزایش دهد و به دلیل افزایش حساسیت پژوهش، ممکن است هرگونه تفاوت ظریف بین گروه‌ها که شاید از نظر بالینی به طور کامل بی‌اهمیت باشد - نیز دارای تفاوت معنادار آماری تشخیص داده شود. از سوی دیگر کاهش بیش از حد تعداد حیوانات می‌تواند توان مطالعه را به شدت کاهش داده و ارزش آن را از بین ببرد (۱۲). چنین پژوهش‌های «بی‌فایده‌ای» از نظر اخلاقی موجب رنج بیهوده حیوانات و از نظر مادی باعث اتلاف منابع پژوهشگران می‌شوند. در ضمن ممکن است نتایج حاصل از یک مطالعه از نظر مقدار p -value دارای تفاوت معنادار آماری باشند، اما به دلیل پایین بودن توان، احتمال اینکه این تفاوت حقیقی باشد، بسیار پایین خواهد بود. یکی از راه‌های بسیار موثر برای افزایش حساسیت مطالعه‌ها و کاهش تعداد حیوانات، استفاده از طرح آماری فاکتوریل است که در منبع دیگر (۱۳) توصیف شده است.

باید توجه داشت که محاسبه توان مطالعه، موضوعی است که فقط می‌تواند پیش از انجام مطالعه انجام شود؛ چرا که توان مطالعه نشان‌دهنده احتمال توانایی مطالعه در شناسایی اثر تیمار در مطالعه‌ای است که مقرر است انجام شود و محاسبه آن پس از انجام مطالعه اقدام صحیحی نیست. در حقیقت زمانی که نتایج مطالعه مشخص شد، پژوهشگران تنها می‌توانند به محاسبه و گزارش بازه اطمینان 95% (Confidence interval) برای نشان دادن میزان عدم قطعیت اثر شناسایی شده، اقدام کنند (۱۴).

جهت اثر (direction of effect): جهت اثر تیمار ممکن است یک طرفه (one-tailed) یا دوطرفه (two-tailed) باشد. به عبارت دیگر، هنگامی که پژوهشگر قصد بررسی اثر یک تیمار را دارد، اثر مشاهده شده در نمونه‌ها ممکن است مطابق با همان چیزی باشد که پژوهشگر فرض کرده بود یا در جهت عکس آن باشد. به عنوان مثال، ممکن است پژوهشگری که روی اثر یک دارو بر کاهش قند خون تحقیق می‌کند، فرض کند که دارو ممکن است فقط موجب کاهش قند خون شود. در این حالت روش «یک‌طرفه» انتخاب خواهد شد. اگر فرض نخستین بر این باشد که دارو می‌تواند موجب کاهش یا افزایش قند خون شود، در این حالت، اثر دارو در

منفی در حیوانات؛ رعایت قرنطینه حیوانات تازه‌وارد به مجموعه؛ رعایت مدت سازگاری پیش از استفاده از حیوانات در پژوهش.

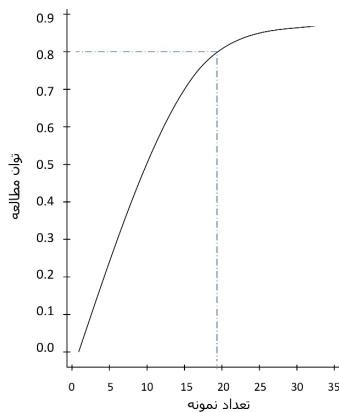
نگهداری حیوانات: رعایت شرایط مساعد محیطی و روش‌های درست نگهداری از حیوانات نظیر پرهیز از نگهداری انفرادی تا حد ممکن و اجرای روش‌های غنی‌سازی محیطی.

استفاده از حیوانات: رعایت دقیق اصول اخلاقی در کار با حیوانات برای کاهش یا حتی جلوگیری کامل از درد و رنج آن‌ها؛ استفاده از جدیدترین و بهترین تکنیک‌های کار با حیوانات آزمایشگاهی که به بهبود شرایط کار با آن‌ها کمک می‌کند؛ استفاده نکردن دوباره از یک حیوان برای پژوهش مگر در موارد بسیار استثنایی.

پایان کار با حیوانات: تدوین ضوابط پایان کار با حیوانات پیش از آغاز پژوهش برای جلوگیری از مرگ خودبه‌خودی حیوانات در اثر احتضار طولانی و پر رنج؛ خاتمه کار با حیوان بلافاصله پس از اخذ نتایج مورد نظر؛ القای مرگ بدون درد و رنج (یوتانزی) در حیوانات (توجه شود که «پایان کار با حیوان» الزماً به معنای کشتن حیوان نیست).

اندازه اثر استاندارد (Standard Effect Size): «اندازه اثر استاندارد» یا «اندازه اثر نسبی» یا Cohen's d ، عبارت است از تناسب سیگنال/نویز یا تفاوت میانگین دو گروه تقسیم بر انحراف معیار که یک پارامتر محاسباتی است، فاقد یکا بوده و فقط نشان‌دهنده شدت اندازه اثر نسبت به میزان پراکندگی داده‌های مطالعه است. در صورت در نظرگیری هر یک از مقادیر سیگنال یا نویز به تنهایی، مقایسه مطالعه‌های مختلف با یکدیگر بسیار دشوار می‌شود، اما اندازه اثر استاندارد، ضریبی از انحراف معیار هر مطالعه به دست می‌دهد که در نتیجه مقایسه مطالعه‌های مختلف با یکدیگر را امکان‌پذیر می‌کند (۴، ۱۱). اندازه اثر استاندارد به عنوان یک نشانه عمومی برای شدت اثر یک تیمار به کار می‌رود. مقدار این تناسب در مطالعه‌های علوم مختلف با یکدیگر ممکن است متفاوت باشد. در تحقیق‌های حیوانات آزمایشگاهی، آثار کوچک، متوسط و بزرگ حسب مقدار d معادل به ترتیب 0.5 ، 1.0 و 1.5 تعیین می‌شود.

خطای نوع یک (type I error): خطای ألفا: α : معادل با میزان معناداری آماری پژوهش بوده و با p (مخفف probability یا احتمال) نشان داده می‌شود. در حقیقت این مقدار نشان‌دهنده احتمال وقوع نتایج به دلایلی غیر از اثر تیمار مورد آزمون باشد. به عنوان مثال، تفاوت‌های دو گروه ممکن است به دلیل تفاوت فیزیولوژیک حیوانات با هم یا خطای دستگاه اندازه‌گیری رخ داده و ربطی به تیمار مورد استفاده نداشته باشد. بنابراین وقتی به عنوان مثال $p=0.05$ را معادل مقدار آماری معنادار در نظر بگیریم، به این معناست که چنانچه فقط 5 درصد (یا کمتر) احتمال وجود داشته باشد که داده‌های به دست آمده به اثر تیمار مرتبط نباشد، آنگاه می‌توانیم بگوییم که اثر مشاهده شده به احتمال زیاد در نتیجه تیمار مورد آزمایش رخ داده است؛ هرچند این موضوع به این معنا نیست که فرض صفر پژوهش (بی اثر بودن تیمار) رد می‌شود. در حالت برعکس، چنانچه ارزیابی نتایج در مطالعه فوق به $p > 0.05$ منجر شود، این موضوع به این معنا نیست که تیمار مورد پژوهش فاقد هرگونه تأثیر بوده است، بلکه مفهوم آن این است که اثر تیمار به اندازه کافی بزرگ نبوده که بتواند در این مطالعه تشخیص داده شود و در حقیقت فرض صفر هیچ پژوهشی هرگز نمی‌تواند صحیح باشد (۱۱). به عنوان مثال، اگر در مطالعه اثر یک داروی کاهنده فشار خون در رت‌ها، $p=0.05$ در نظر گرفته شود، به این معناست که اگر در 5 درصد (یا کمتر از 5 درصد) از رت‌ها، کاهش معنادار فشار خون بین گروه‌ها دیده شود ولی این تفاوت ارتباطی به اثر دارو نداشته و به عنوان مثال، به دلیل تفاوت فیزیولوژی حیوانات مختلف با هم بوده باشد، در این صورت با اطمینان کافی می‌توانیم بگوییم که اثر مشاهده شده در مطالعه، در نتیجه تیمار رخ داده است. توجه شود که در تحقیق‌های پزشکی به طور معمول عرف بر این است که حد آستانه p معادل 5 درصد ($p=0.05$) در نظر گرفته شود. با این حال باید توجه داشت که این مقدار را می‌توان به صورت دلخواه و حسب نیازهای یک پژوهش به هر میزان دیگری نیز تعیین کرد و قانونی برای معنادار بودن p در مقدار 5 درصد وجود ندارد. فلسفه عدد p از آنجا آغاز شد که رونالد فیشر -مبدع این روش آماری- تنها



تصویر ۱. نمودار فرضی از ارتباط بین تعداد نمونه‌ها و توان مطالعه در یک پژوهش (اقتباس از (۳))

پارامترهای مطالعه (نظیر انحراف معیار) مراجعه کرده و سعی در بهبود وضعیت آن‌ها به نحوی کرد که با مقدار ۸۰ درصد توان مطالعه، تعداد نمونه‌های مورد نیاز در حد قابل قبولی قرار گیرد. در صورت موفق نبودن در این روش، بهتر است طراحی آماری مطالعه تغییر داده شود. روال محاسبه تعداد حیوانات در مقاله حاضر به ترتیب

زیر بوده که در ادامه تشریح می‌شوند:

- ۱) محاسبه تعداد واحد آزمون مورد نیاز
 - ۲) محاسبه تعداد کل حیوانات مورد نیاز حسب واحدهای آزمون
 - ۳) محاسبه تعداد حیوانات در هر گروه
 - ۴) در نظرگیری تعداد احتمالی حیوانات حذفی
 - ۵) محاسبه کل تعداد حیوانات مورد نیاز
- محاسبه تعداد واحد آزمون مورد نیاز:**

انواع مطالعه‌های مداخله‌ای و روش محاسبه تعداد نمونه در آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس جدول مذکور، روش آنالیز توان مطالعه بر این اصل استوار است که ۵ پارامتر آماری -تعداد نمونه، اندازه اثر، انحراف معیار، خطای نوع یک، و توان- از طریق فرمول‌های ریاضی با یکدیگر در ارتباط هستند. بنابراین اگر پژوهشگر از این ۵ پارامتر، ۴ مورد را در اختیار داشته باشد، می‌تواند یک مورد باقی‌مانده را محاسبه کند (۱۵). به عنوان مثال، در صورت نیاز به محاسبه تعداد نمونه، باید ۴ پارامتر دیگر را بدانیم. یا چنانچه تعداد نمونه‌های قابل استفاده به دلایل اخلاقی یا دلایل علمی موجه، غیر قابل تغییر باشد، آنگاه با داشتن ۳ پارامتر دیگر از پارامترهای پیش‌گفته، می‌توانیم مقدار پارامتر باقی‌مانده (به عنوان مثال، توان مطالعه یا انحراف معیار ناشی از انجام مطالعه‌ای با مشخصات مورد نظر) را محاسبه کنیم (۱۶). روش برابرسازی منابع ترجیحاً در مواردی استفاده می‌شود که روش آنالیز توان ممکن نباشد.

قالب محاسبه‌های مبتنی بر اثر «دوطرفه» بررسی خواهد شد. به طور معمول تعداد نمونه‌های مورد نیاز در روش دوطرفه، اندکی بیشتر از روش یک‌طرفه است (۴). باید توجه داشت که در پژوهش روی حیوانات آزمایشگاهی، در اغلب موارد فرض بر این است که اثر تیمار به صورت دوطرفه خواهد بود. بنابراین چنانچه پژوهشگر با دلایل بسیار قوی فرض را بر این بگذارد که اثر تیمار تنها در یک جهت ظاهر می‌شود، می‌تواند از روش «یک‌طرفه» استفاده کند. توجه شود که تغییر نوع محاسبات آماری از روش دوطرفه به یک‌طرفه (یا بالعکس) چنانچه پس از حصول داده‌ها به عنوان مثال، با هدف به دست آوردن نتایج «معنادار آماری» بین گروه‌ها انجام شود، عملی نادرست بوده و می‌تواند تقلب علمی محسوب شود (۱۱).

محاسبه تعداد حیوانات:

عمده‌ترین هدف پژوهشگر از محاسبه تعداد حیوانات مورد نیاز، دستیابی به مقدار مشخصی از «توان» در مطالعه است. با این حال این یک اصل غیرقابل تغییر نیست و در روش دیگر پژوهشگر می‌تواند تعداد حیوانات را حسب قضاوت حرفه‌ای خود انتخاب کرده و توان احتمالی مطالعه برای این تعداد حیوانات را پیش از انجام مطالعه - محاسبه کرده (۳)، ارزیابی کند که آیا انجام پژوهش با این میزان توان واجد توجیه علمی است و سپس در صورت انجام مطالعه، این موضوع را در هنگام گزارش نتایج ارائه کند. روش اخیر به طور ویژه در مطالعه‌هایی که برای حیوانات بسیار رنج‌آور است، مفید واقع می‌شود.

برای درک عمیقی از موضوع تعیین تعداد نمونه، لازم است رابطه بین تعداد نمونه و توان مطالعه (تصویر ۱) بررسی شود. در تصویر ۱، افزایش تعداد نمونه‌ها تا ۱۵ حیوان موجب افزایش خطی مقدار توان مطالعه می‌شود. به عبارتی افزایش هر یک حیوان به مطالعه می‌تواند مقدار توان مطالعه را به میزان قابل توجهی افزایش دهد. اما با افزایش تعداد حیوانات به بیش از این مقدار، توان مطالعه با نرخ آهسته‌تری رشد کرده به نحوی که به عنوان مثال، در صورت استفاده از تعداد بیش از ۲۰ حیوان، افزایش ۱۰ حیوان به مطالعه فقط موجب افزایش ۵ درصد (معادل ۵ درصد) در میزان توان مطالعه می‌شود. بر این اساس، پژوهشگران حرفه‌ای هنگام محاسبه تعداد نمونه، فقط به یک عدد واحد اکتفا نکرده، بلکه نموداری شبیه نمودار فوق را برای انواع تعداد حیوانات قابل استفاده ترسیم می‌کنند. برای ترسیم این نمودار می‌توان از نرم‌افزارهای آماری استفاده کرد یا برای مقادیر مختلف توان، تعداد نمونه را محاسبه و نمودار را رسم کرد. این اقدام اجازه می‌دهد تا تعداد نمونه‌های مورد نیاز مطالعه حسب ارزیابی هزینه-فایده به دست آید. در اینجا، هزینه مطالعه از افزایش تعداد نمونه‌ها ناشی شده و شامل هزینه اخلاقی (ناشی از درد و رنج حیوانات)، هزینه مالی، انرژی، زمانی و نیروی کار انسانی خواهد بود. فواید حاصل از افزایش تعداد حیوانات، شامل افزایش توان مطالعه بوده که چنانچه به درستی - حسب اهمیت موضوع پژوهش - انتخاب شود، بر ارزش مطالعه می‌افزاید (۳).

به عنوان یک قاعده کلی بهتر است تعداد نمونه حسب توان ۹۰-۸۰ درصد محاسبه شود، مگر اینکه تعداد نمونه در این حالت در قسمتی از نمودار قرار گیرد که توان مورد نیاز موجب افزایش شدید تعداد نمونه‌ها شود. در چنین شرایطی باید به سایر

جدول ۱. روش محاسبه تعداد نمونه حسب نوع مطالعه

روش محاسبه تعداد نمونه	نوع مطالعه
تجربیات قبلی پژوهشگر مقاله‌هایی که با ابزار و مواد مشابه و بر روی گونه مشابه حیوانات کار کرده‌اند.	مطالعه‌های پایلوت (pilot studies)
تجربیات قبلی پژوهشگر مقاله‌هایی که با ابزار و مواد مشابه و بر روی گونه مشابه حیوانات کار کرده‌اند روش برابرسازی منابع (Resource Equation)	مطالعه‌های اکتشافی (exploratory experiments)
آنالیز توان مطالعه (Power Analysis) روش برابرسازی منابع	مطالعه‌های تاییدکننده (confirmatory experiment)

مطالعه‌های پایلوت: امکان‌سنجی انجام مطالعه‌های بزرگ و کسب اطلاعات اولیه؛ مطالعه‌های اکتشافی: تولید فرضیات جدید حسب الگوی پاسخ‌دهی به یک تیمار یا مداخله خاص؛ مطالعه‌های تاییدکننده: آزمون ترجیحاً یک فرضیه که به نحو شفافی قبل از انجام مطالعه تشریح شده است.

برای استفاده از این روش محاسبه، لازم است درباره جهت اثر تیمار مورد آزمون نیز آگاهی داشته باشیم. روش محاسبه تعداد نمونه برای این نوع مطالعه‌ها در فایل صفحه‌گسترده پیوست (<https://goo.gl/5PkfFn>): برگه «میانگین آماری دو گروه-غیر زوج» آورده شده است.

ب) محاسبه تعداد نمونه برای مطالعه‌های مبتنی بر مقایسه میانگین آماری بیش از دو گروه

در مورد مطالعه‌هایی که تعداد سه یا بیش از سه گروه مجزا داریم که میانگین گروه‌ها را با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) تحلیل می‌کنیم، از این روش استفاده می‌شود. با توجه به دشواری تعیین انحراف معیار و اندازه اثر در چنین مطالعه‌هایی بهتر است از نرم‌افزارهای آماری برای محاسبه تعداد نمونه‌های مورد نیاز استفاده شود. در یک روش، می‌توان مقدار «اندازه اثر استاندارد» را در نظر گرفته و حسب تعداد گروه‌های تیمار از نرم‌افزار G Power برای محاسبه تعداد نمونه مورد نیاز استفاده کرد. با استفاده از نرم‌افزار G Power همچنین می‌توان میانگین تخمینی هر گروه - که از نظر علمی برای پژوهشگران جالب توجه است - را به نرم‌افزار داده و حسب مقدار تخمینی انحراف معیار کلی برای پژوهش، تعداد نمونه‌های مورد نظر را تعیین کرد. در روش دیگر، می‌توان از روش مقایسه دوتایی (pairwise comparison) نظیر تست post-hoc پس از ANOVA استفاده کرده و فرض را بر این گذاشت که گروه‌ها به صورت دو-به-دو و به روشی شبیه t-test مورد مطالعه قرار می‌گیرند. بر این اساس دو گروهی که به نظر می‌آید کمترین میزان اندازه اثر واجد اهمیت بالینی را داشته باشند، انتخاب می‌کنیم؛ به عنوان مثال، در یک پژوهش دارویی، گروه کنترل و گروه دوز پایین دارو را در نظر می‌گیریم. در چنین شرایطی اگر اختلاف آماری بین هر یک از دیگر گروه‌های مورد پژوهش بیشتر از مقدار پیش‌بینی شده باشد، اختلاف آن گروه نیز از نظر آماری معنادار خواهد شد. سپس تعداد حیوانات محاسبه شده برای هر یک از این دو گروه فرضی را ضربدر تعداد گروه‌های اصلی مطالعه می‌کنیم تا تعداد کل حیوانات مورد نیاز برای مطالعه محاسبه شود. توجه شود که چنانچه در محاسبه‌های خود، کمترین میزان اندازه اثر واجد اهمیت بالینی را در نظر بگیریم، ممکن است به تعداد زیادی حیوان نیاز داشته و تفاوت آماری در بسیاری از گروه‌ها دیده شود. در چنین شرایطی، لازم است پژوهشگر مجرب نسبت به میزان اندازه اثر مورد نیاز تصمیم‌گیری کرده و اگر اثردهی دارو تنها در دوز متوسط یا بالای آن مد نظر است، میزان اندازه اثر را متوسط یا بیشترین میزان ممکن در نظر بگیرد. توجه شود که در صورت نیاز به استفاده از تست post hoc برای مقایسه هر یک از گروه‌ها با هم، لازم است این موضوع از ابتدا مورد توجه قرار گرفته و میزان معناداری مورد نیاز حسب کمترین میزان لازم برای تست post hoc انتخاب شود. به عنوان مثال، اگر مطالعه اصلی بر اساس $p=0.05$ انجام می‌شود، اما تست post hoc نیاز به $p=0.001$ دارد، لازم است محاسبه تعداد نمونه‌ها حسب $p=0.001$ انجام شود، در غیر این صورت میزان توان مطالعه ممکن است کاهش پیدا کند.

ب) محاسبه تعداد نمونه برای مطالعه‌های مبتنی بر مقایسه میانگین آماری در طرح آماری زوج

در مطالعه‌هایی که هر یک از حیوانات، هر دو تیمار مورد مطالعه را دریافت می‌کنند و تحلیل داده‌ها با استفاده از paired t test انجام می‌شود، این روش به کار می‌رود. در این مطالعه‌ها هر حیوان به عنوان کنترل خود نیز عمل می‌کند، بنابراین داده‌های بیشتری از هر حیوان تولید شده و این امر به کاهش تعداد نمونه‌ها می‌انجامد. از سوی دیگر، به دلیل کاهش انحراف معیار (ناشی از تفاوت‌های بین حیوانات در مطالعه‌های غیر زوج)، داده‌های حاصله از مطالعه‌های زوج، پیش و پس از اعمال تیمار پراکندگی کمتری داشته و این موضوع نیز به کاهش تعداد نمونه‌های مورد نیاز کمک می‌کند (۳). در واقع، در این مطالعه به جای داشتن دو انحراف معیار برای دو گروه مختلف، فقط یک انحراف معیار داریم. با این حال باید توجه داشت که در برخی موارد، استفاده از حیوانات در این نوع طرح پژوهشی ممکن است موجب افزایش رنج و دیسترس آن‌ها شده و استفاده از این نوع طرح، از نظر اخلاقی مجاز نباشد. توجه شود که روش محاسبه تعداد نمونه در این نوع

برای محاسبه‌های تعداد نمونه، می‌توان با آگاهی از فرمول مربوطه، از روش دستی استفاده کرد که برای بسیاری از افراد روش به نسبت دشواری است و توضیح آن در این مختصر نمی‌گنجد. فرمول‌های استفاده شده به این منظور در منبع دیگر (۱۷) آورده شده است. همچنین می‌توان از فایل صفحه‌گسترده پیوست به مقاله حاضر (<https://goo.gl/5PkfFn>) استفاده کرد. در مورد محاسبه‌های پیچیده‌تر، استفاده از نرم‌افزارهای آماری نظیر نرم‌افزار رایگان محاسبه تعداد نمونه Russ Lenth's (قابل دانلود از <https://goo.gl/2b6ak7>) (۱۸) یا نرم‌افزار G Power (قابل دانلود از <http://www.gpower.hhu.de>) یا نرم‌افزارهای nQuery یا MINITAB توصیه می‌شود. همچنین می‌توان از فایل‌های صفحه‌گسترده‌ای که به این منظور طراحی شده (نظیر: <https://goo.gl/LebECh>) بهره برد (۱۹) و یا در وبسایت‌هایی که به این منظور طراحی شده‌اند (نظیر <http://www.biomath.info/power/index.html>) و (<http://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>) به صورت آنلاین به محاسبه تعداد نمونه پرداخت. در ضمن در صورت استفاده از روش بلاک‌بندی یا covariate، می‌توان از نرم‌افزار رایگان InVivoStat¹ برای محاسبه تعداد نمونه‌ها استفاده کرد (۲۰). توجه شود که استفاده از روش‌های آنالیز توان مطالعه برای محاسبه تعداد نمونه، تنها برای محاسبه تعداد نمونه و توان در هنگام طراحی مطالعه کاربرد داشته و نباید از آن‌ها برای آنالیز نتایج در پایان مطالعه‌ها استفاده کرد (۲۱). اجرای تکنیک‌های محاسبه تعداد نمونه تحت دو گروه عمده روش‌های آماری امکان‌پذیر است (۲۰):

الف) روش آماری frequentist: که فرض‌های صفر و یک را برای مطالعه در نظر گرفته و بین توان مطالعه و تعداد نمونه موازنه‌ای را حاصل می‌کند. این روش نیاز به آگاهی از ۴ پارامتر (از ۵ پارامتر: تعداد نمونه، اندازه اثر، انحراف معیار، خطای نوع یک، و توان) را دارد که ممکن است پژوهشگر در مورد صحت آن‌ها اطمینان چندانی نداشته باشد و روش مذکور نیز این عدم قطعیت را در نظر نمی‌گیرد.

ب) روش آماری Bayesian: طیف وسیعی از تکنیک‌های آماری را پوشش می‌دهد که عدم قطعیت پارامترهای پیش از مطالعه را در نظر می‌گیرند. اما روش‌های محاسبه‌ای به نسبت پیچیده‌ای دارد و در بحث حاضر بررسی نمی‌شود. برای آشنایی با تفاوت‌های دو روش آماری فوق، مراجعه به منابع مرتبط (۶، ۲۰) توصیه می‌شود.

در بحث حاضر، محاسبه تعداد نمونه در مطالعه‌های تاییدکننده حسب روش frequentist شده است. توجه شود که فرمول ریاضی قابل استفاده برای محاسبه تعداد نمونه در روش آنالیز توان، حسب نوع طرح آماری مطالعه تعیین می‌شود. مطالعه‌های تاییدکننده در قالب طرح‌های آماری بسیار متنوعی ممکن است انجام شوند که ذکر تمامی آن‌ها در این مجال میسر نیست. با این حال برخی از رایج‌ترین طرح‌های آماری انجام این مطالعه‌ها به شرح زیر بوده که در ادامه روش محاسبه تعداد نمونه در آن‌ها ارائه شده است.

الف) مقایسه میانگین آماری بین دو گروه مجزا
ب) مقایسه میانگین آماری در بیش از دو گروه
پ) مقایسه میانگین آماری در طرح آماری زوج
ت) مقایسه نسبت‌ها در دو گروه
ث) مطالعه‌های تک‌گروهی.

ج) سایر طرح‌های آماری: روش‌های آنالیز توان مطالعه برای سایر حالت‌های خاص و برخی دیگر از طرح‌های آماری در منابع دیگر (۲۲، ۲۱، ۲۴) آورده شده است. همچنین روش آنالیز توان برای محاسبه تعداد نمونه مورد نیاز در طرح آماری پرکاربرد فاکتوریل در منبع دیگر (۱۳) تشریح شده است.

الف) محاسبه تعداد نمونه برای مطالعه‌های مبتنی بر مقایسه میانگین آماری بین دو گروه

در مطالعه‌ها با ساختار به طور کامل تصادفی (completely randomized design) که هدف مطالعه عبارت از بررسی وجود اختلاف آماری بین میانگین داده‌های دو گروه است، می‌توان از روش آنالیز توان مطالعه به این منظور استفاده کرد. در این مطالعه‌ها میانگین گروه‌ها را با استفاده از two-sample t test تحلیل می‌کنیم.

از مطالعه‌ای مقایسه میانگین گروه‌ها یا سایر انواع مطالعه‌های جایگزین - که با تعداد کمتر حیوانات قادر به تولید نتایج معتبر هستند بهره برد، مگر اینکه چنین جایگزین‌هایی موجود نباشد.

ت) محاسبه تعداد نمونه برای مطالعه‌های تک‌گروهی

چنانچه میزان وقوع یک عارضه در جمعیتی از حیوانات مشخص باشد و در مطالعه‌ای هدف این باشد که وقوع یا عدم وقوع این عارضه با میزان مشخصی از احتمال ارزیابی شود به عنوان مثال، اینکه آیا یک نوع تومور خاص در یک جمعیت از حیوانات وجود دارد یا خیر برای تعیین تعداد حیوانات لازم برای آزمون، از فرمول زیر استفاده می‌شود (۲۲):

$$n = \frac{\log(\beta)}{\log(P/n)}$$

n = تعداد حیوانات مورد نیاز

β = میزان خطای نوع ۲

Pn = درصدی از جمعیت حیوانی که تحت تاثیر عارضه قرار نگرفته باشد

برای مثال، چنانچه میزان وقوع یک تومور خاص در جمعیت مشخصی از موش‌های رت معادل ۴۰ درصد باشد و پژوهشگر بخواهد با احتمال ۹۵ درصد قادر به تشخیص وقوع تومور در این جمعیت باشد، نیاز به انجام آزمایش روی ۶ قطعه موش رت دارد:

$$\frac{\log(0.05)}{\log(0.6)} = 5.86 \approx 6$$

روش برابری منابع (resource equation):

روش ارجح در تعیین تعداد نمونه‌ها، استفاده از روش آنالیز توان است، با این حال در مواردی این روش میسر نبوده و ممکن است نیازمند استفاده از روش دیگری به نام «برابری منابع» باشیم (۴، ۱۵). از روش برابری منابع، ممکن است بتوان در موارد زیر استفاده کرد:

- چنانچه نتوان برای اندازه اثر مقداری مشخص کرد، به عنوان مثال:

- چنانچه تعداد پارامترهای زیادی ارزیابی شده است. هرچند باید توجه داشت که در یک پژوهش با طرح آماری موسوم به «فاکتوریل» (۱۳)، به طور ترجیحی باید از روش آنالیز توان به جای روش «برابری منابع» استفاده شود.

- مقادیر متعددی از یک پارامتر اندازه‌گیری شده باشد،

- یا در تحقیقات بنیادین که ممکن است نتوان مقدار اندازه اثر واجد اهمیت بالینی را تعیین کرد.

* چنانچه نتوان هیچ‌گونه مقداری را برای انحراف معیار تعیین کرد،

* چنانچه لازم است از روش‌های پیچیده آنالیز داده‌ها در پایان پژوهش استفاده شود،

* در مطالعه‌های اکتشافی که آزمون فرضیه مطالعه هدف اصلی مطالعه نیست و پژوهشگران تنها مشتاق به یافت هرگونه تفاوت بین گروه‌ها هستند، و

* در پژوهش‌هایی که به دلیل ساختار پیچیده آن‌ها و وجود گروه‌های تیمار مختلف و تداخل بین گروه‌ها، ممکن است استفاده از روش آنالیز توان دشوار باشد.

در روش برابری منابع، مقداری به نام E محاسبه می‌شود که این مقدار عبارت است از درجه آزادی استفاده شده در آزمون اثر «متغیر» در آنالیز واریانس (ANOVA). این روش بر پایه به دست آوردن تخمین مناسب از مقدار انحراف معیار تدوین شده است. در حالت انتخاب صحیح تعداد نمونه‌ها، محاسبه به نحوی خواهد بود که مقدار E بین اعداد ۱۰ تا ۲۰ باشد. چنانچه، عدد E کمتر از ۱۰ محاسبه شود، بدین معناست که با افزودن واحدهای آزمون بیشتر می‌توان احتمال به دست آوردن نتایج معنادار را افزایش داد و اگر عدد E بیش از مقدار ۲۰ باشد، به این معناست که تعداد زیاد واحدهای آزمون استفاده شده در پژوهش، تاثیر چندانی در افزایش احتمال به دست آوردن نتایج معنادار نخواهد داشت. البته نتایج این روش محاسبه را نباید خیلی قطعی در نظر گرفت، بلکه لازم است هزینه‌های اخلاقی و

ریالی تعداد نمونه محاسبه شده نیز بررسی شده و تصمیم‌گیری شود (۱۵). به عنوان مثال، چنانچه در پژوهشی از نمونه‌های باکتریایی در لوله آزمایش استفاده شود، ممکن است هزینه اخلاقی و ریالی آزمایش به قدری پایین باشد که بتوان E را خیلی بیش از ۲۰ در نظر گرفت. اما در آزمایش دیگری ممکن است مدل آزمایش

مطالعه‌ها بستگی به این دارد که (۲):

۱) آیا ترتیب اعمال هر یک از تیمارها در مورد هر حیوان مشابه حیوانات دیگر است یا اینکه ترتیب اعمال تیمارها به هر حیوان تصادفی انتخاب می‌شود،
۲) هر حیوان کمتر یا بیش از دو تیمار دریافت می‌کند.

در صورت اعمال تصادفی تیمارها یا اعمال بیش از دو تیمار می‌توان همچنان از روش آنالیز توان اقدام کرد، با این حال به دلیل برخی پیچیدگی‌ها توصیه می‌شود که در این زمینه به متخصص آمار یا مراجع تخصصی مربوطه مراجعه شود.

تفاوت بین مطالعه‌های دارای طرح زوج و غیرزوج از منظر محاسبه تعداد نمونه‌های مورد نیاز در این است که در مطالعه‌های زوج به دلیل تکرار مطالعه روی یک حیوان، به احتمال بسیار زیاد یک همبستگی مثبت (positive correlation) بین نتایج وجود خواهد داشت. همبستگی مثبت به این مفهوم است که در صورت افزایش مقدار یک متغیر، مقدار متغیر دیگر نیز افزایش می‌یابد و در صورت کاهش یکی، دیگری نیز دچار کاهش می‌شود. در مواردی که این همبستگی برای تمامی داده‌ها اتفاق بیفتد، مقدار همبستگی را معادل یک در نظر می‌گیرند.

چنانچه این مقدار برابر صفر باشد، یعنی هیچ ارتباطی بین دو متغیر موجود نیست. مقادیر همبستگی بین صفر و یک نشان‌دهنده میزان احتمال بروز همبستگی مثبت است. میزان همبستگی معادل یک- (همبستگی منفی) به این معناست که اگر یک پارامتر افزایش یابد، دیگری کاهش می‌یابد. میزان همبستگی بین صفر و یک- عکس موضوع ذکر شده برای همبستگی مثبت است. فرمول مورد استفاده در تعیین تعداد نمونه در مطالعه‌های دارای طرح زوج از مزیت وجود همبستگی استفاده کرده و به این وسیله موجب کاهش تعداد نمونه‌های مورد نیاز می‌شود.

بنابراین تعیین مقدار همبستگی برای محاسبه تعداد نمونه‌ها در این روش حائز اهمیت زیادی است. این مقدار به طور معمول بر پایه نتایج مطالعه‌های قبلی یا انجام مطالعه پایلوت تخمین زده می‌شود (۴). با این حال چنانچه این مقدار در دسترس نباشد می‌توان با تخمین خوبی مقدار آن را حدود ۰/۲۵ در نظر گرفت. چه

اینکه اگر مقدار آن را صفر در نظر بگیریم، تعداد نمونه‌های محاسبه شده در فرمول حاضر تفاوتی با فرمول محاسبه در مطالعه‌های غیرزوج نداشته و اصولاً استفاده از طرح زوج تغییری در تعداد حیوانات به وجود نمی‌آورد. محاسبه تعداد نمونه برای این نوع مطالعه‌ها در فایل صفحه‌گسترده پیوست <https://goo.gl/5PkfFn> برکه «میانگین آماری دو گروه - زوج» امکان‌پذیر است.

ت) محاسبه تعداد نمونه برای مطالعه‌های مبتنی بر مقایسه نسبت‌ها در دو گروه

چنانچه نتایج یک پژوهش بتواند یکی از دو حالت ممکن رو اتخاذ کند (به عنوان مثال درمان/عدم درمان)، آنگاه نسبت وقوع هر یک از حالت‌ها در گروه‌ها به طور معمول با تست Fisher's exact بررسی می‌شود. در این مطالعه‌ها برای محاسبه تعداد نمونه، نیازمند دانستن مقادیر زیر هستیم:

- مقدار تناسب مورد انتظار برای گروه کنترل (π_1)؛
- مقدار تناسب مورد انتظار در گروه تیمار که واجد نتایج با اهمیت از منظر بالینی یا علمی است (π_2)؛

- مقدار توان مورد نیاز مطالعه
- سطح معناداری (p value) مورد انتظار مطالعه.

توجه شود که در این مطالعه‌ها، تقاض بین دو تناسب مورد انتظار ($\pi_1 - \pi_2$) معادل اندازه اثر مورد انتظار پژوهشگر از مطالعه است. به عنوان مثال، چنانچه احتمال مرگ و میر ناشی از حجم مشخص خونریزی در حیوانات معادل ۲۰ درصد باشد ($\pi=0.2$) و اکنون ماده‌ای کشف کرده‌ایم که امید داریم تجویز آن بتواند میزان مرگ و میر ناشی از حجم مشخص خونریزی را به مقدار مهم از نظر بالینی به عنوان مثال، ۵ درصد ($\pi_2=0.05$) برساند (یا به عبارتی اندازه اثر به میزان ۰/۱۵)، آنگاه در صورت در نظرگیری قدرت ۸۰ درصد و سطح معناداری ۵ درصد، با داشتن اطلاعات فوق می‌توان با استفاده از نرم‌افزارهای آماری یا فایل صفحه‌گسترده پیوست مقاله حاضر <https://goo.gl/5PkfFn> برکه «مقایسه نسبت‌ها»، تعداد حیوانات مورد نیاز در هر گروه را معادل ۱۳ حیوان محاسبه کرد. با توجه به

تعداد بیشتر نمونه‌های مورد نیاز در این نوع مطالعه‌ها، بهتر است تا حد امکان

چندین گروه وجود داشته و هر گروه با گروه دیگر مقایسه می‌شود، به طور معمول از طرح متعادل (balanced design) استفاده می‌شود. به این معنا که تعداد حیوانات در تمام گروه‌ها یکسان در نظر گرفته شده تا به این وسیله بتوان حساسیت پژوهش را افزایش داد.

۲) در پژوهش‌هایی که چندین گروه تیمار و یک گروه کنترل وجود داشته و هدف مقایسه بین هر گروه تیمار با گروه کنترل است، می‌توان برای افزایش حساسیت پژوهش، تعداد حیوانات گروه کنترل را بیشتر در نظر گرفت. به این صورت که اگر هدف مقایسه تعداد x گروه تیمار با یک گروه کنترل است، تعداد حیوانات در گروه‌های تیمار یکسان گرفته می‌شود و سپس تعداد حیوانات در گروه کنترل معادل \sqrt{x} برابر تعداد حیوانات در یک گروه تیمار، در نظر گرفته می‌شود. باید توجه داشت که این روش با فرض یکسان بودن میزان پراکندگی داده‌ها در گروه‌های مختلف، تعریف شده است که البته در عمل ممکن است چنین شرطی محقق نشود. در صورت تحقق نیافتن شرط فوق، از روش‌های آماری خاص (نظیر روش‌های non-linear data transformation) برای تصحیح دیتاها استفاده شده و سپس از روش ارائه شده در منبع (۲۴) برای محاسبه تعداد نمونه در گروه کنترل استفاده می‌شود.

در نظرگیری تعداد احتمالی ریزش نمونه‌ها

پس از محاسبه تعداد حیوانات مورد نیاز، لازم است میزان ریزش نمونه‌ها مثلاً، به دلیل مرگ و میر احتمالی یا حذف حیوانات از آزمایش، محاسبه شده و به تأیید کمیته اخلاق برسد. برای این کار بهتر است حداکثر میزان مرگ‌ومیر قابل قبول حسب اصول علمی/اخلاقی و با تکیه بر مطالعه‌های مشابه قبلی و تجربیات پژوهشگران، برای هر گروه به طور مجزا تخمین زده شود. سپس از فرمول زیر برای محاسبه تعداد حیوانات مورد نیاز در هر گروه استفاده شود:

(تعداد حیوانات محاسبه شده \times درصد مرگ و میر احتمالی) + تعداد حیوانات محاسبه شده = تعداد حیوانات مورد نیاز

به عنوان مثال، اگر تعداد موش‌های گروه تیمار پروژهای معادل ۶ قطعه محاسبه شده باشد و میزان مرگ و میر حیوانات در این گروه معادل ۱۰ درصد در نظر گرفته شود، تعداد تلفات احتمالی در این گروه معادل $0.6 \times 6 = 3.6$ (یک قطعه موش) بوده، بنابراین تعداد موش‌های مورد نیاز در این گروه معادل با ۷ قطعه خواهد بود.

محاسبه کل تعداد حیوانات مورد نیاز

در پایان با تجمیع تعداد حیوانات محاسبه شده در هر گروه، تعداد کل حیوانات مورد نیاز در مطالعه به دست می‌آید.

نتیجه‌گیری:

در مقاله حاضر، اصول محاسبه تعداد حیوانات در طیف وسیعی از طرح‌های آماری معمول بررسی شد. با این حال دانش آمار دانش بسیار وسیع و پیچیده‌ای است و این مختصر هرگز نمی‌تواند جایگزین مشاوره با یک متخصص آمار زیستی شده یا پاسخگوی تمام سوال‌های کاربران برای طراحی انواع مطالعه‌های آماری باشد. در برخی موارد، آگاهی از نحوه انجام یک پژوهش در قالب یک طرح آماری خاص می‌تواند به سادگی موجب کاهش شدید تعداد حیوانات مورد نیاز و صرفه‌جویی عظیمی در منابع حیوانی، مالی، زمانی و نیروی انسانی شده و نتایج بسیار معتبرتری را حاصل کند.

منابع:

1. Festing MF. How to reduce the number of animals used in research by improving experimental design and statistics. ANZCCART Fact Sheet 2011;10:1-11.
2. Anonymous. Experimental Design National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research; 2018 [Available from: <https://eda.nc3rs.org.uk/experimental-design/>]

آن‌قدر دردناک بوده یا حیوانات استفاده شده به حدی گران‌قیمت باشد که مجبور باشیم با E کمتر از ۱۰ محاسبه تعداد نمونه را انجام دهیم هر چند در مورد اخیر به احتمال توان مطالعه پایین‌تر خواهد بود، اما از نظر اخلاقی و علمی موضوعی قابل توجیه و بدون اشکال است.

با وجودی که روش برابری منابع بر اساس ANOVA طرح‌ریزی شده است، اما برای تمامی پژوهش‌های مشتمل بر استفاده از حیوانات آزمایشگاهی صادق است؛ هر چند بیشترین توانایی آن در یافتن اندازه اثرهای «بزرگ» است. برای محاسبه E در ساده‌ترین نوع این دست از مطالعه‌ها می‌توان از فرمول زیر استفاده کرد:

$$E = (\text{تعداد کل گروه‌ها}) - (\text{تعداد کل واحدهای آزمون})$$

برای مثال در پژوهشی که هدف آن مطالعه آثار دوزهای مختلف یک دارو است، ۶ گروه داریم (یک گروه کنترل و پنج گروه تیمار). اگر هر موش معادل یک واحد آزمون باشد و تعداد موش‌ها در هر گروه به صورت انتخابی ۱۰ قطعه در نظر گرفته شود، مقدار E برابر خواهد بود با:

$$E = (10 \times 6) - 6 = 54$$

با توجه به این که عدد ۵۴ بزرگ‌تر از ۲۰ است، این امر نشان دهنده آن است که استفاده از تعداد ۱۰ موش در هر گروه ضروری نیست و این امر موجب بروز مشکل‌های اخلاقی مبنی بر استفاده بی‌دلیل از تعداد زیاد حیوانات و نیز هدر رفتن منابع مالی و انرژی و زمان پژوهشگر خواهد شد. با آزمون اعداد دیگر برای تعداد موش‌ها در این پژوهش به این نتیجه می‌رسیم که اگر تعداد موش‌ها در هر گروه معادل ۴ در نظر گرفته شود، عدد E مساوی با ۱۸ بوده و شرط روش «برابری منابع» محقق می‌شود. بنابراین تعداد ۴ قطعه موش برای هر گروه در این مطالعه کافی است. روش برابری منابع در سایر طرح‌های آماری با فرمول‌های دیگری محاسبه می‌شود که جزئیات آن در منبع دیگر (۲۳) آمده است. هر چند روش برابری منابع، روش ساده‌ای است، اما دقت و استحکام علمی آن به اندازه روش Power Analysis نیست و اندازه اثر مورد نیاز مطالعه یا انحراف معیار حیوانات مورد مطالعه را مدنظر قرار نمی‌دهد (۱۳).

محاسبه تعداد کل حیوانات مورد نیاز حسب واحدهای آزمون

تا اینجا، تعداد واحدهای آزمون مورد نیاز مطالعه محاسبه شد. در شرایطی که هر حیوان معادل یک واحد آزمون باشد، «تعداد حیوانات» استفاده شده، برابر با «تعداد واحد آزمون» محاسبه شده است. اما در مواردی که هر گروه از حیوانات یک واحد آزمون محسوب شوند (به عنوان مثال، نوزادان مادری که اثر عوامل تراژوژنیک روی مادر بررسی شده)، تعداد حیوانات استفاده شده بیشتر از تعداد واحدهای آزمون بوده و عبارت است از:

$$\text{تعداد حیوانات در هر واحد آزمون} \times \text{تعداد واحد آزمون مورد نیاز} = n$$

در مواردی که یک حیوان به عنوان چند واحد آزمون در نظر گرفته شود، تعداد حیوانات استفاده شده کمتر از تعداد واحدهای آزمون بوده و عبارت است از:

$$n = \frac{(\text{تعداد واحد آزمون مورد نیاز})}{(\text{تعداد واحد آزمون در هر حیوان})}$$

محاسبه تعداد حیوانات در هر گروه

تعداد حیوانات در گروه‌های مختلف یک پژوهش به روش زیر تعیین می‌شود (۲۴):
۱) در پژوهش‌هایی که دو گروه داشته و هدف مقایسه دو گروه با هم است، یا

Accessed: June 2018).

3. Souba WW, Wilmore DW. Surgical research. San Diego, CA: Academic Press; 2001. p. 75-80.
4. Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources. 2002;43(4):244-58.

5. Wang H, Chow S-C, Chen M. A Bayesian Approach on Sample Size Calculation for Comparing Means. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*. 2005;15(5):799-807.
6. Sadia F, Hossain SS. Contrast of Bayesian and Classical Sample Size Determination. *Journal of Modern Applied Statistical Methods*. 2014;13(2):Article 23.
7. Inoue LYT, Berry DA, Parmigiani G. Relationship Between Bayesian and Frequentist Sample Size Determination. *The American Statistician*. 2005;59(1):79-87.
8. Sahu SK, Smith TMF. A Bayesian method of sample size determination with practical applications. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A (Statistics in Society)*. 2006;169(2):235-53.
9. Sarrafzadeh-Rezaei F, Ahmadi-Noorbakhsh S. Management, Anesthesia, and Surgery of Laboratory Animals. Urmia, Iran :Urmia University Press; 2010 (text in Persian).
10. Mirabzadeh Ardakani E, Ahmadi-Noorbakhsh S. Euthanasia of Laboratory Animals. Tehran, Iran: Pasteur Institute of Iran; 2014 (text in Persian).
11. Field AP. *Discovering statistics using IBM SPSS statistics*. 4th ed. London: SAGE; 2013.
12. Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ES, et al. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(5):365-76.
13. Shaw R, Festing MF, Peers I, Furlong L. Use of factorial designs to optimize animal experiments and reduce animal use. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2002;43(4):223-32.
14. Noordzij M, Tripepi G, Dekker FW, Zoccali C, Tanck MW, Jager KJ. Sample size calculations: basic principles and common pitfalls. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(5):1388-93.
15. Hau J, Schapiro SJ. *Handbook of laboratory animal science*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2011. p. 381-388.
16. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2013;4(4):303-6.
17. Sullivan L. *Power and Sample Size Determination* Boston Univeristy School of Public Health: Boston Univeristy School of Public Health; [Available from: http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/bs/bs704_power/BS704_Power_print.html] (Accessed: June 2018).
18. Lenth RV. Java applets for power and sample size [Computer software]: Department of Statistics and Actuarial Science – University of Iowa; 2006-9 [Available from: <http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>](Accessed: June 2018).
19. Anonymous. *Sample Size Calculations* Boston University Research Support: Boston University Research Support; 2014 [Available from: <https://www.bu.edu/researchsupport/compliance/animal-care/working-with-animals/research/sample-size-calculations-iacuc/>](Accessed: June 2018).
20. J. AC. Sample size determination: a review. *Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician)*. 1997;46(2):261-83.
21. Jones S, Carley S, Harrison M. An introduction to power and sample size estimation. *Emergency Medicine Journal : EMJ*. 2003;20(5):453-8.
22. Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample size determination. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2002;43 (4 :) 207 - 13 .
23. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *The Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2017;24(5):101-5.
24. Bate S, Karp NA. A common control group - optimising the experiment design to maximise sensitivity. *PloS One*. 2014;9(12):e114872.