

## *R workshop #3: Modelli a effetti misti*

Nicola Romanò

### *Introduzione*

Come abbiamo visto nelle lezioni, sia le misure ripetute che i design annidati pongono alcune sfide all'analisi dei dati. In particolare, questi tipi di design sono problematici in quanto contengono osservazioni correlate.

Ad esempio, nel caso di un design di misure ripetute, in cui misuriamo un determinato parametro nello stesso soggetto in momenti diversi, è probabile che ciascuna delle misurazioni dipenda (ovvero sia correlata) dal valore precedente.

Uno dei modi migliori per gestire questi dati è l'uso di modelli a effetti misti, un'estensione del modello lineare che consente di tenere conto di effetti casuali nel modello.

Per il contesto di questo workshop avremo bisogno di usare il pacchetto `nlme`<sup>1</sup>. Come al solito, questo pacchetto può essere installato usando il seguente comando:

```
install.packages("nlme")
```

L'installazione deve essere eseguita solo una volta. Il pacchetto può quindi essere utilizzato dopo il caricamento utilizzando:

```
library(nlme)
```

Nota: i modelli a effetti misti sono uno strumento piuttosto complesso da usare. Lo scopo di questo workshop è di presentarti questi modelli e darti un'idea di come usarli per alcune analisi di base. Questa è ben lungi dall'essere una presentazione completa<sup>2</sup>, e l'analisi di progetti più complessi può non essere così banale!

### *Obiettivi formativi*

Dopo aver completato questo workshop sarai in grado di:

- Creare un modello a effetti misti per esplorare semplici misure ripetute o design annidati.
- Interpretare l'output di un modello a effetti misti

### *Design a misure ripetute*

Consideriamo un semplice design a misure ripetute.

Siamo interessati a valutare l'effetto dell'agonista dopaminergico bromocriptina sulla crescita dei prolattinomi (adenomi pituitari che

<sup>1</sup> L'altro pacchetto comunemente usato è `lme4`, con la funzione `lmer`. La sintassi è leggermente diversa ma si applica un ragionamento simile

<sup>2</sup> Se sei veramente interessato ad ampliare le tue conoscenze in questo settore, un ottimo libro è "Mixed Effects Models in S and S-PLUS" di Pinheiro e Bates (questo libro usa S, che è il linguaggio da cui è derivato R; il codice S può essere eseguito in R senza troppi problemi)

secernono prolattina). Prendiamo 45 topi e li assegnamo casualmente a uno dei tre gruppi (15 / gruppo).

Il gruppo di controllo riceve un intervento chirurgico simulato, mentre gli altri due gruppi ricevono un impianto sottocutaneo contenente 1 o 10 mg di bromocriptina. Seguiamo quindi la crescita dell'adenoma nel tempo misurando i livelli plasmatici di prolattina (PRL).

Abbiamo due effetti fissi in questo design: tempo e trattamento, e un effetto casuale, il topo. Poiché ogni topo viene misurato più volte, le misure provenienti dallo stesso animale non saranno indipendenti, da cui la necessità di un modello a effetti misti.

Per questo esempio, iniziamo caricando il file `bromocriptine-workshop3.csv`

```
bromocriptine <- read.csv("bromocriptine-workshop3.csv")
```

```
summary(bromocriptine)
```

##	Time	Mouse	PRL	Group
##	Min. : 0	Min. : 1	Min. : 0.4252	Bromo1 :90
##	1st Qu.: 30	1st Qu.:12	1st Qu.: 31.4421	Bromo10:90
##	Median : 75	Median :23	Median : 78.0624	CTRL :90
##	Mean : 75	Mean :23	Mean :148.6180	
##	3rd Qu.:120	3rd Qu.:34	3rd Qu.:222.3295	
##	Max. :150	Max. :45	Max. :775.6684	

Come al solito, esplora i dati, prova a tracciarli e vedere possibili relazioni tra variabili <sup>3</sup>.

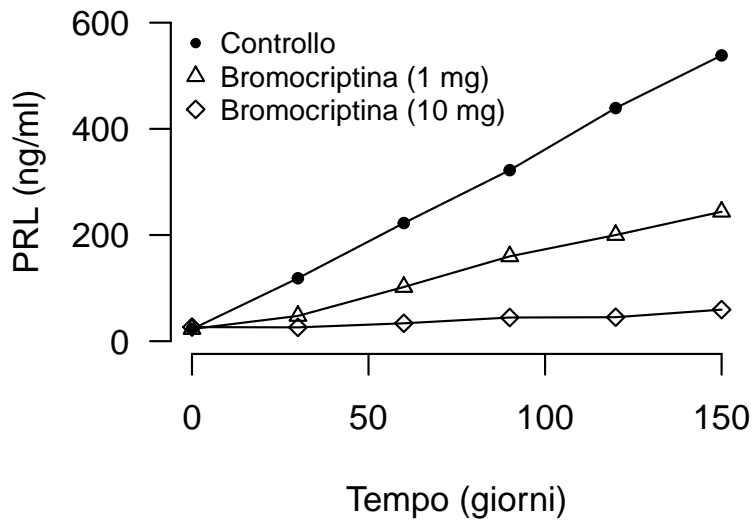
Inoltre, riorganizziamo l'ordine dei livelli nel fattore `Group` in modo che il gruppo di controllo venga utilizzato come livello di riferimento.

```
bromocriptine$Group <- factor(bromocriptine$Group,
  levels = c("CTRL", "Bromo1", "Bromo10"))
```

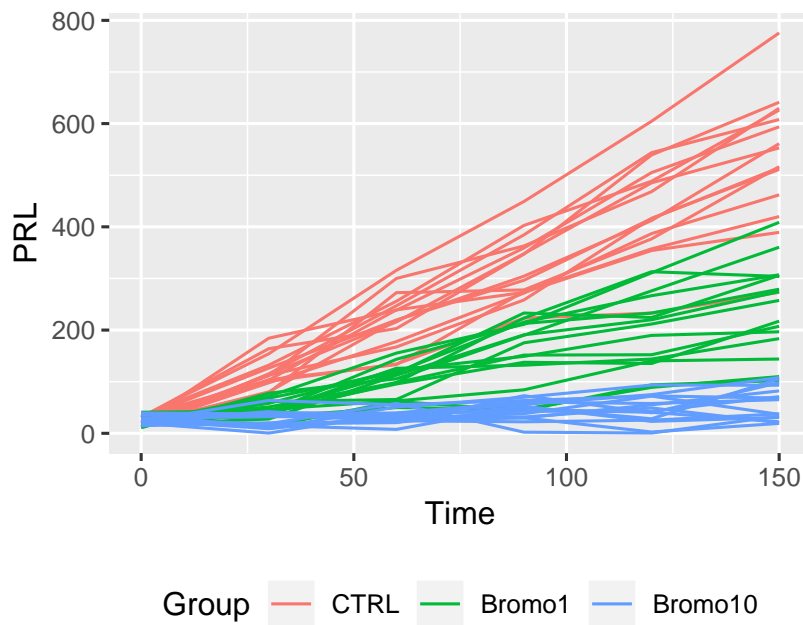
Qui sotto ho tracciato i valori medi di PRL nel tempo nei tre gruppi <sup>4</sup>

<sup>3</sup> Fai riferimento ai workshop precedenti se non ricordi come

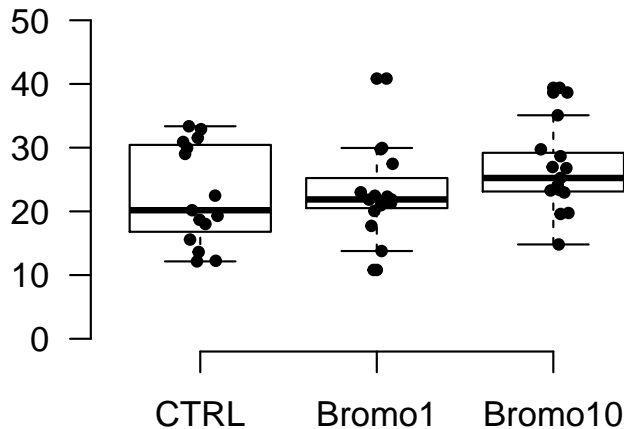
<sup>4</sup> Come sfida, prova a riprodurre questo grafico!



È chiaro che esiste un effetto dose-dipendente del farmaco e che, nel complesso, il cambiamento dei livelli di PRL nel tempo può essere studiato utilizzando un modello lineare. Se osserviamo le risposte dei singoli topi possiamo vedere che iniziano più o meno allo stesso livello, ma poi aumentano in modi diversi (con pendenze diverse) a seconda del trattamento, ma anche all'interno del trattamento.



Possiamo vedere come le differenze individuali tra i topi non siano molto pronunciate al tempo 0.



Costruiamo ora il nostro modello <sup>5</sup>. Modelliamo il gruppo e il tempo come effetti fissi, così come la loro interazione, e modelliamo `Mouse` come fattore casuale. Creiamo un modello di pendenza casuale, dal momento che ciò che sembra essere variabile tra i soggetti è la pendenza. Specifichiamo l'effetto casuale come `Time - 1 | Mouse`, nel senso che vogliamo usare il mouse come un effetto casuale, e vogliamo avere pendenze casuali sul Tempo ma non intercette casuali (da cui il -1).

<sup>5</sup> Ricorda di caricare prima il pacchetto nlme!

```
model <- lme(PRL ~ Group * Time, data = bromocriptine, random = ~Time - 1 | Mouse)
summary(model)
```

```
## Linear mixed-effects model fit by REML
## Data: bromocriptine
##      AIC      BIC    logLik
## 2564.473 2593.08 -1274.236
##
## Random effects:
## Formula: ~Time - 1 | Mouse
##           Time Residual
## StdDev: 0.54899 20.62831
##
## Fixed effects: PRL ~ Group * Time
##              Value Std.Error DF   t-value p-value
## (Intercept)  17.239483  3.854825 222    4.472183  0.0000
## GroupBromo1  -3.546567  5.451545  42   -0.650562  0.5189
```

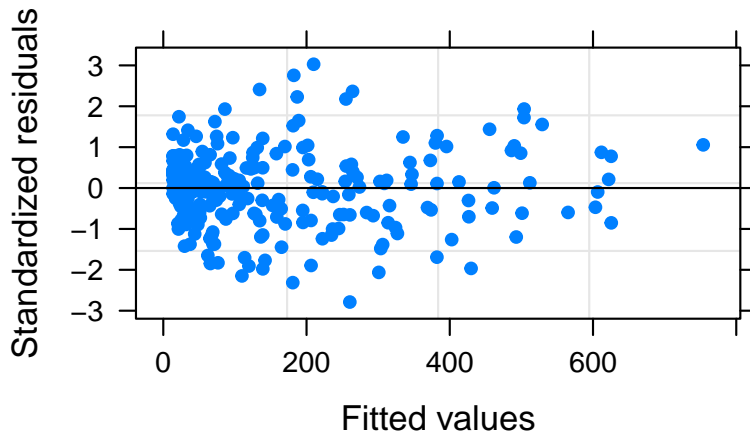
```
## GroupBromo10      5.390355  5.451545  42   0.988776  0.3284
## Time              3.466547  0.147966 222  23.428049  0.0000
## GroupBromo1:Time -1.924222  0.209255 222  -9.195581  0.0000
## GroupBromo10:Time -3.244864  0.209255 222 -15.506739  0.0000
## Correlation:
##              (Intr) GrpBr1 GrpB10 Time   GrB1:T
## GroupBromo1    -0.707
## GroupBromo10   -0.707  0.500
## Time           -0.237  0.167  0.167
## GroupBromo1:Time 0.167 -0.237 -0.118 -0.707
## GroupBromo10:Time 0.167 -0.118 -0.237 -0.707  0.500
##
## Standardized Within-Group Residuals:
##      Min      Q1      Med      Q3      Max
## -2.78846661 -0.59600115  0.02844046  0.52908281  3.02785483
##
## Number of Observations: 270
## Number of Groups: 45
```

Questo è un modello abbastanza complesso, le parti importanti che vogliamo vedere nel sommario sono:

- AIC, BIC e logLik: sono misure di bontà del fit. Sia per AIC che per BIC più piccolo il valore, migliore è il fit; per la `_log likelihood`, più alta è meglio.
- La parte dell'effetto casuale ci dà le deviazioni standard per gli effetti casuali e per i residui.
- La parte a effetti fissi ci fornisce le stime per i coefficienti del modello. In questo caso, l'intercetta 17.23 è il livello PRL per un topo nel gruppo di controllo (poiché questo è il livello di riferimento della nostra variabile di gruppo), al tempo 0. Gli altri coefficienti sono interpretati come abbiamo visto nella lezione #2. Si noti che esiste, come previsto, una forte interazione tra tempo e trattamento, cioè PRL varia in modo diverso nel tempo per trattamenti diversi.
- Una tabella di correlazione. Per la maggior parte, se non tutte, delle situazioni con cui ti occuperai, puoi tranquillamente ignorarla.
- Un riassunto della distribuzione dei residui
- Il numero di osservazioni e gruppi. Puoi utilizzare questi numeri per verificare di aver correttamente specificato la struttura dell'esperimento nel modello. Abbiamo un totale di 270 osservazioni (puoi verificare eseguendo `ncol(bromocriptina)`) e 45 gruppi (cioè unità sperimentali), corrispondenti ai 45 topi. Questo ci dice che R ha capito che quelle 270 osservazioni non sono indipendenti, ma provengono da 45 topi, quindi più osservazioni sono associate allo stesso topo.

Possiamo controllare come di consueto la distribuzione dei residui rispetto ai valori fittati (sebbene l'output abbia un formato leggermente diverso rispetto a `lm`)

```
plot(model, pch = 20)
```

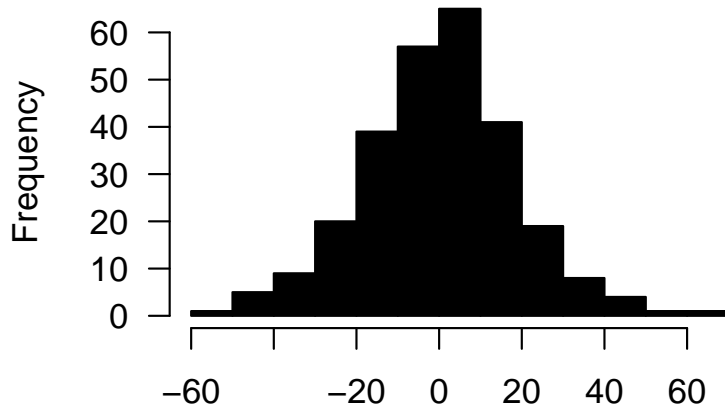
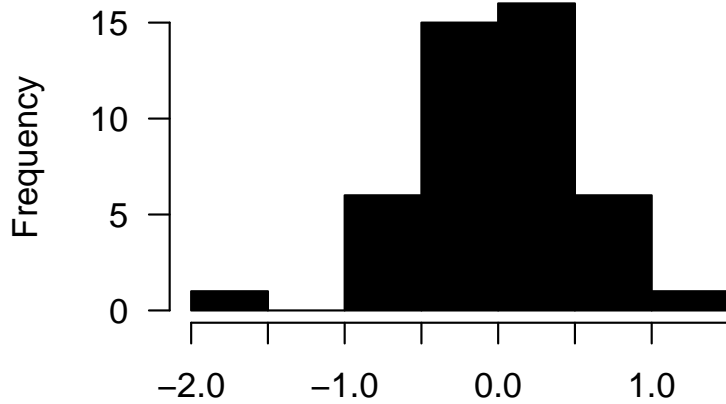


Analizziamo ora la distribuzione degli effetti casuali e confrontiamola con quella dei residui. La funzione `random.effects` restituisce gli effetti casuali. Possiamo combinarla con `hist` e possiamo vedere che gli effetti casuali provengono da una distribuzione normale, come previsto, con una varianza diversa da quella dei residui (notare la diversa scala x).

```
head(random.effects(model))
```

```
##           Time
## 1  0.49678070
## 2  0.44133005
## 3 -0.05455666
## 4 -0.31447629
## 5  0.58834643
## 6 -1.55698489
```

```
par(mfrow = c(2, 1))
hist(random.effects(model)$Time, main = "", col = "black",
     xlab = "Effetti casuali", las = 1)
hist(resid(model), main = "", col = "black", xlab = "Residui",
     las = 1)
```



Possiamo anche verificare che R abbia fittato correttamente un modello di pendenza casuale.

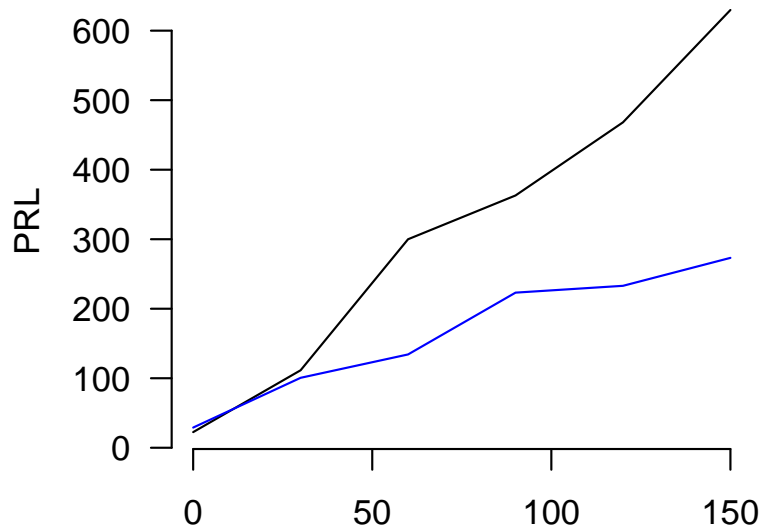
```
head(coef(model))
```

```
##      (Intercept) GroupBromo1 GroupBromo10      Time GroupBromo1:Time
## 1      17.23948   -3.546567    5.390355  3.963328    -1.924222
## 2      17.23948   -3.546567    5.390355  3.907877    -1.924222
## 3      17.23948   -3.546567    5.390355  3.411991    -1.924222
## 4      17.23948   -3.546567    5.390355  3.152071    -1.924222
## 5      17.23948   -3.546567    5.390355  4.054894    -1.924222
## 6      17.23948   -3.546567    5.390355  1.909562    -1.924222
##      GroupBromo10:Time
## 1          -3.244864
## 2          -3.244864
## 3          -3.244864
## 4          -3.244864
## 5          -3.244864
## 6          -3.244864
```

Nota come tutti i coefficienti sono uguali per tutti gli animali, ma

la pendenza per il tempo è stata cambiata per ciascun animale. Ad esempio, tracciamo i dati per i topi 1 e 6. Questi sono entrambi topi di controllo, ma hanno profili abbastanza diversi.

```
plot(PRL ~ Time, bromocriptine, subset = bromocriptine$Mouse ==
     1, t = "l", las = 1, bty = "n")
lines(PRL ~ Time, bromocriptine, subset = bromocriptine$Mouse ==
     6, col = "blue")
```

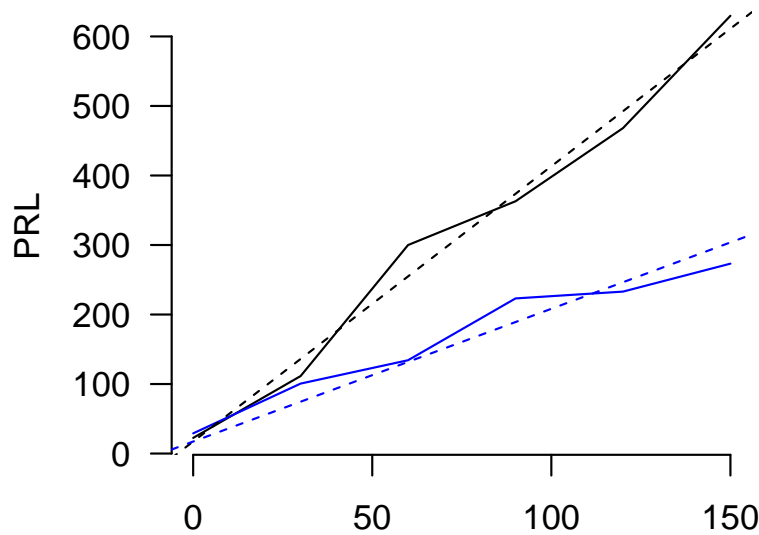


Infatti, guardando le pendenze fittate, sono 3.96 e 1.91, mentre l'intercetta è 17.24 per entrambi.

Possiamo usare `abline` per aggiungere le due rette fittate al grafico.

```
abline(17.24, 3.96, lty = "dashed") # Mouse 1
abline(17.24, 1.91, lty = "dashed") # Mouse 6
```





Infine, usiamo `emmeans` per confrontare i tre diversi trattamenti. Qui usiamo un argomento extra (`cov.reduce = range`) per dire a `emmeans` di guardare agli estremi `[0, 150]` dell'intervallo di tempo. Se non usiamo questo argomento, `emmeans` `epairs` effettueranno confronti solo nel tempo medio (cioè, 75).

```
library(emmeans)

marginals <- emmeans(model, ~Group * Time, cov.reduce = range)
pairs(marginals, by = "Time")

## Time = 0:
## contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
## CTRL - Bromo1    3.5466  5.451545 42   0.651  0.7931
## CTRL - Bromo10  -5.3904  5.451545 42  -0.989  0.5879
## Bromo1 - Bromo10 -8.9369  5.451545 42  -1.639  0.2407
##
## Time = 150:
## contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
## CTRL - Bromo1   292.1799 30.559605 42   9.561 <.0001
## CTRL - Bromo10  481.3392 30.559605 42  15.751 <.0001
## Bromo1 - Bromo10 189.1593 30.559605 42   6.190 <.0001
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
```

La nostra analisi post-hoc ha rivelato che c'è una differenza significativa tra tutti i gruppi al tempo 150, ma non al momento 0. Se vuoi testare su tutti i tempi, puoi usare `cov.reduce = unique`.

### *Nested design - a split plot experiment*

We will now analyse a split plot experiment as an example of a nested design<sup>6</sup>.

For this examples we will use the Oats dataset that comes with the `nlme` package (this is automatically loaded when you load `nlme`).

These data comes from an example of split-plot design by Yates (1935).

The treatment structure used in the experiment was a 3 x 4 full factorial, with three varieties of oats and four concentrations of nitrogen. The experimental units were arranged into six blocks, each with three whole-plots subdivided into four subplots. The varieties of oats were assigned randomly to the whole-plots and the concentrations of nitrogen to the subplots. All four concentrations of nitrogen were used on each whole-plot.

In this experiment we have six blocks of land, each of which is divided in 3 plots, each of which is further divided in 4 subplots. In each plot we grow one variety of grain (chosen at random), and in each subplot we use a different nitrogen concentration (nitrogen is used as a fertiliser). Because we have 4 subplots, we use 4 different nitrogen concentrations. The varieties of grain are called Golden Rain, Marvellous and Victory. Our output variable is the yield of the specific plot. This is a 3 x 4 full factorial design, meaning that each of the 3 variety was treated with each of the 4 nitrogen combinations (therefore it is “full”, because all possible combinations are taken into account).

We ask whether 1) nitrogen has an effect on yield and 2) whether the different varieties give different yields 3) if there is an interaction between the two.

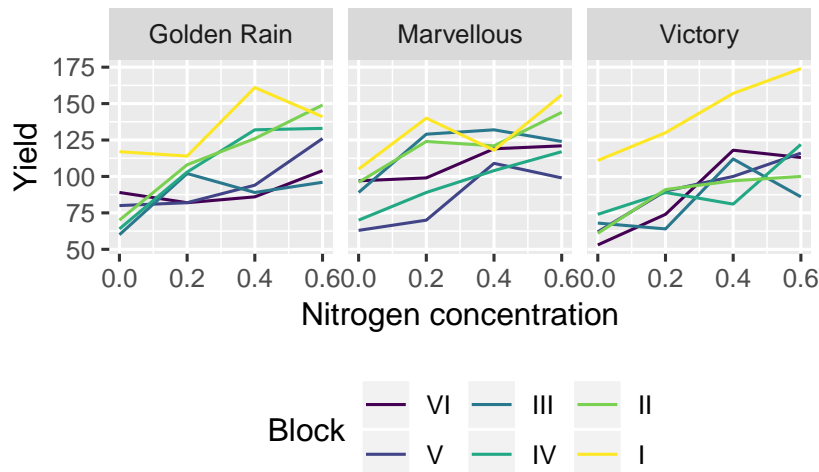
We start as usual by exploring and plotting the dataset

```
summary(Oats)
```

##	Block	Variety	nitro	yield
##	VI :12	Golden Rain:24	Min. :0.00	Min. : 53.0
##	V :12	Marvellous :24	1st Qu.:0.15	1st Qu.: 86.0
##	III:12	Victory :24	Median :0.30	Median :102.5
##	IV :12		Mean :0.30	Mean :104.0
##	II :12		3rd Qu.:0.45	3rd Qu.:121.2
##	I :12		Max. :0.60	Max. :174.0

<sup>6</sup> This example is taken from Pinheiro and Bates, 2000

You can produce several interesting plots with these data, and I encourage you to do so. This is a plot summarising the relationship between the different variables.



We can see clear plot-to-plot differences, and it looks like yield grows approximatively linearly with nitrogen concentration.

We now need to think about what are the random effects and how they are nested. We have 6 blocks, each divided in 3 plots (one per variety) and each divided in 4 subplots (one per nitrogen concentration). Because we only get one measure of yield from each subplot, we will not consider this as a random effect, but we will consider plots nested within blocks as our random effects.

Let's create our model!

```
model.oats <- lme(yield ~ nitro * Variety, data = Oats,
  random = ~1 | Block/Variety)
```

Note that we have created a random intercept model (look at the graph above and think why we have done that!). Also, we are using Blocks and plots (we use Variety, since each plot is associated with a variety) as our random effects, nested within each other. Note that we list the larger factors first, then those contained within. If we had multiple levels of nesting we could indicate them using multiple / (e.g. City/School/Class)

Let's see the summary<sup>7</sup>

```
summary(model.oats)
```

```
## Linear mixed-effects model fit by REML
## Data: Oats
##      AIC      BIC    logLik
##  581.2372 600.9441 -281.6186
##
## Random effects:
```

<sup>7</sup> For a more concise output you can also do `anova(model.oats)`

```
## Formula: ~1 | Block
##      (Intercept)
## StdDev:    14.64487
##
## Formula: ~1 | Variety %in% Block
##      (Intercept) Residual
## StdDev:    10.39931 12.99039
##
## Fixed effects: yield ~ nitro * Variety
##              Value Std.Error DF   t-value p-value
## (Intercept)   81.90000  8.570714 51  9.555796  0.0000
## nitro         75.33333 11.858548 51  6.352661  0.0000
## VarietyMarvellous  8.51667  8.684675 10  0.980655  0.3499
## VarietyVictory   -8.60000  8.684675 10 -0.990250  0.3454
## nitro:VarietyMarvellous -10.75000 16.770519 51 -0.641006  0.5244
## nitro:VarietyVictory    5.75000 16.770519 51  0.342864  0.7331
## Correlation:
##              (Intr) nitro  VrtyMr VrtyVc ntr:VM
## nitro          -0.415
## VarietyMarvellous -0.507  0.410
## VarietyVictory   -0.507  0.410  0.500
## nitro:VarietyMarvellous  0.294 -0.707 -0.579 -0.290
## nitro:VarietyVictory    0.294 -0.707 -0.290 -0.579  0.500
##
## Standardized Within-Group Residuals:
##      Min      Q1      Med      Q3      Max
## -1.78878623 -0.64954429 -0.06301223  0.57818033  1.63463810
##
## Number of Observations: 72
## Number of Groups:
##      Block Variety %in% Block
##      6          18
```

We can see a clear effect of nitrogen, but not of variety, and no significant interactions. Also, note that the output is slightly different from the previous example in that - It tells us that there are 72 observations, from 18 plots (coded as Varieties) nested into 6 blocks. - The standard deviations in the random effect part of the summary are for intercept and residual rather than slope and residual as before, since we are fitting a random intercept model.

Since the interaction terms are not significant we can drop them and get a simpler model

```
model.oats.2 <- lme(yield ~ nitro + Variety, data = Oats, random = ~1 | Block/Variety)

summary(model.oats.2)

## Linear mixed-effects model fit by REML
## Data: Oats
##      AIC      BIC    logLik
## 592.8918 608.4283 -289.4459
```

```
##
## Random effects:
## Formula: ~1 | Block
## (Intercept)
## StdDev: 14.64482
##
## Formula: ~1 | Variety %in% Block
## (Intercept) Residual
## StdDev: 10.43758 12.86697
##
## Fixed effects: yield ~ nitro + Variety
## Value Std.Error DF t-value p-value
## (Intercept) 82.40000 8.058510 53 10.225215 0.0000
## nitro 73.66667 6.781487 53 10.862908 0.0000
## VarietyMarvellous 5.29167 7.078909 10 0.747526 0.4720
## VarietyVictory -6.87500 7.078909 10 -0.971195 0.3544
## Correlation:
## (Intr) nitro VrtyMr
## nitro -0.252
## VarietyMarvellous -0.439 0.000
## VarietyVictory -0.439 0.000 0.500
##
## Standardized Within-Group Residuals:
## Min Q1 Med Q3 Max
## -1.62947645 -0.65841389 -0.07207178 0.55784903 1.71462741
##
## Number of Observations: 72
## Number of Groups:
## Block Variety %in% Block
## 6 18
```

The conclusion from the simpler model are essentially the same: a significant effect of nitrogen but not of variety. Also, the estimations for the random effects have only had minimal changes (look at the standard deviations for residuals and for the intercept).

We can check that some the regressions make sense by plotting regression lines for different plots, just as we did before.

---

We have only scratched the surface of how to use mixed-effects models, and there is a lot more to it. For the scope of this course what we have done is more than enough, but if you are interested there are a lot of resources around to become an expert in this topic!