Дисперсионный анализ, часть 1

Математические методы в зоологии с использованием R

Марина Варфоломеева

1. **Множественные сравнения**
2. **Дисперсионный анализ**
3. **Post hoc тесты**

Знакомимся дисперсионным анализом

Вы сможете

- Объяснить, в чем опасность множественных сравнений, и как с ними можно бороться
- Рассказать, как в дисперсионном анализе моделируются значения зависимой переменной
- Перечислить и проверить условия применимости дисперсионного анализа
- Интерпретировать и описать результаты, записанные в таблице дисперсионного анализа
- Провести множественные попарные сравнения при помощи post hoc теста Тьюки, представить и описать их результаты

Множественные сравнения

Пример: сон у млекопитающих

- `TotalSleep` - общая продолжительность сна. В нашем анализе это будет зависимая переменная
- `Danger` - уровень опасности среды для вида, пять градаций (1 - 5)

Данные: Allison, Cicchetti (1976), электронная версия Statlib database

Скачиваем данные с сайта

Не забудьте войти в вашу директорию для матметодов при помощи `setwd()`

```
library(downloader)

# в рабочем каталоге создаем суб-директорию для данных
if(!dir.exists("data")) dir.create("data")

# скачиваем файл в xlsx, либо в текстовом формате
if (!file.exists("data/sleep.xlsx")) {
  download(
    url = "https://varmara.github.io/mathmethr/data/sleep.xlsx",
    destfile = "data/sleep.xlsx")
}

if (!file.exists("data/sleep.csv")) {
  download(
    url = "https://varmara.github.io/mathmethr/data/sleep.xls",
    destfile = "data/sleep.csv")
}
```

Читаем данные из файла одним из способов

Чтение из xlsx

```
library(readxl)
sleep <- read_excel(path = "data/sleep.xlsx", sheet = 1)
```

Чтение из csv

```
sleep <- read.table("data/sleep.csv", header = TRUE, sep = "\t")
```

Все ли правильно открылось?

```
str(sleep) # Структура данных
```

```
# 'data.frame': 62 obs. of  11 variables:
#  $ Species    : Factor w/ 62 levels "Africanelephant",..: 1 2 3 4 5 6 7 8 9
#  $ BodyWt     : num  6654 1 3.38 0.92 2547 ...
#  $ BrainWt    : num  5712 6.6 44.5 5.7 4603 ...
#  $ NonDreaming: num  NA 6.3 NA NA 2.1 9.1 15.8 5.2 10.9 8.3 ...
#  $ Dreaming   : num  NA 2 NA NA 1.8 0.7 3.9 1 3.6 1.4 ...
#  $ TotalSleep : num  3.3 8.3 12.5 16.5 3.9 9.8 19.7 6.2 14.5 9.7 ...
#  $ LifeSpan   : num  38.6 4.5 14 NA 69 27 19 30.4 28 50 ...
#  $ Gestation  : num  645 42 60 25 624 180 35 392 63 230 ...
#  $ Predation  : int  3 3 1 5 3 4 1 4 1 1 ...
#  $ Exposure   : int  5 1 1 2 5 4 1 5 2 1 ...
#  $ Danger     : int  3 3 1 3 4 4 1 4 1 1 ...
```

```
head(sleep, 2)     # Первые несколько строк файла
```

```
#                 Species BodyWt BrainWt NonDreaming Dreaming
# 1        Africanelephant   6654  5712.0          NA       NA
# 2 Africangiantpouchedrat      1     6.6         6.3        2
#   TotalSleep LifeSpan Gestation Predation Exposure Danger
```

Знакомимся с данными

Есть ли пропущенные значения?

```
sapply(sleep, function(x)sum(is.na(x)))
```

```
#     Species      BodyWt     BrainWt NonDreaming    Dreaming
#           0           0           0          14          12
#  TotalSleep    LifeSpan   Gestation   Predation    Exposure
#           4           4           4           0           0
#      Danger
#           0
```

К счастью, про уровень опасности (`Danger`) информация есть для всех объектов.

Но есть пропущенные значения продолжительности сна (`TotalSleep`).

Каков объем выборки?

В одной из переменных, которые нам интересны, есть пропущенные значения. Это нужно учесть при рассчете объема выборки.

Удалим из датафрейма `sleep` строки, где `TotalSleep` принимает значение `NA`.

```
flt <- ! is.na(sleep$TotalSleep)
sl <- sleep[flt, ]
```

Дальше будем работать с датафреймом `sl`. В нем нет пропущенных значений в интересующих нас переменных

```
nrow(sl)
```

```
# [1] 58
```

Каков объем выборки в каждой группе?

```
table(sl$Danger)
```

```
#
#  очень низкий        низкий       средний       высокий очень высокий
#            18            14            10             9             7
```

Задание

Постройте график зависимости общей продолжительности сна (`TotalSleep`) от уровня опасности среды (`Danger`). Используйте `geom_boxplot`.

Раскрасьте график в зависимости от уровня опасности среды (используйте эстетики `fill` или `colour`)

Придумайте, каким образом посчитать, в какой группе животных общая продолжительность сна больше?

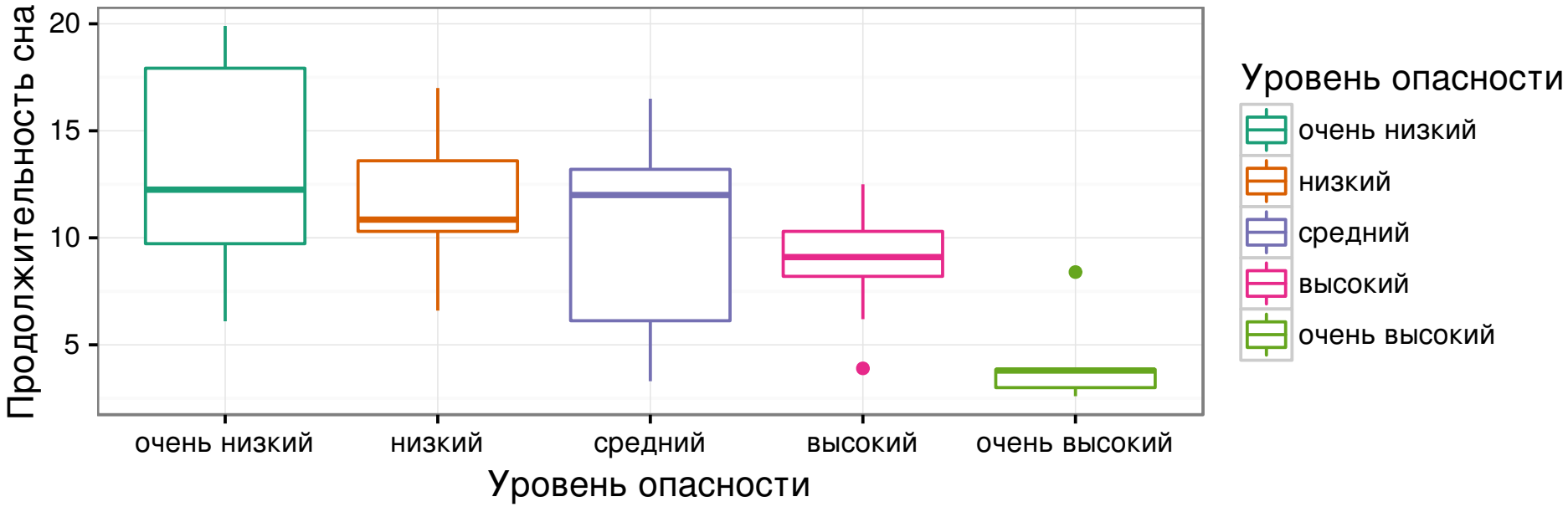
Дополнительное задание:

Попробуйте сменить палитру раскраски, используя `scale_colour_brewer` (варианты можно посмотреть в справке в подразделе примеров или в интернете Colors (ggplot2): раздел RColorBrewer palette chart)

Решение

```
library(ggplot2)
theme_set(theme_bw())

gg_sl <- ggplot(data = sl, aes(x = Danger, y = TotalSleep, colour = Danger)) +
  labs(x = "Уровень опасности", y = "Продолжительность сна") +
  scale_colour_brewer("Уровень опасности", palette = "Dark2")
gg_sl + geom_boxplot()
```



Множественные сравнения

Мы могли бы сравнить среднюю продолжительность сна в разных группах при помощи t-критерия.

- 5 групп
- 10 сравнений

Если для каждого сравнения вероятность ошибки первого рода будет $\alpha_{per\ comparison} = 0.05$, то для группы — ?

Множественные сравнения

Мы могли бы сравнить среднюю продолжительность сна в разных группах при помощи t-критерия.

- 5 групп
- 10 сравнений

Если для каждого сравнения вероятность ошибки первого рода будет $\alpha_{per\ comparison} = 0.05$, то для группы — ?

$\alpha_{family\ wise} = 0.05 * 10$

В половине случаев мы рискуем найти различия там где их нет!!!

Поправка Бонферрони

Если нужно много сравнений, можно снизить $\alpha_{per\ comparison}$

$$\alpha_{per\ comparison} = \frac{\alpha_{family\ wise}}{n}$$

Поправка Бонферрони

Если нужно много сравнений, можно снизить $\alpha_{per\ comparison}$

$$\alpha_{per\ comparison} = \frac{\alpha_{family\ wise}}{n}$$

Например, если хотим зафиксировать $\alpha_{family\ wise} = 0.05$

С поправкой Бонферрони $\alpha_{per\ comparison} = 0.05/10 = 0.005$

Очень жесткий критерий!

Дисперсионный анализ

Модель дисперсионного анализа

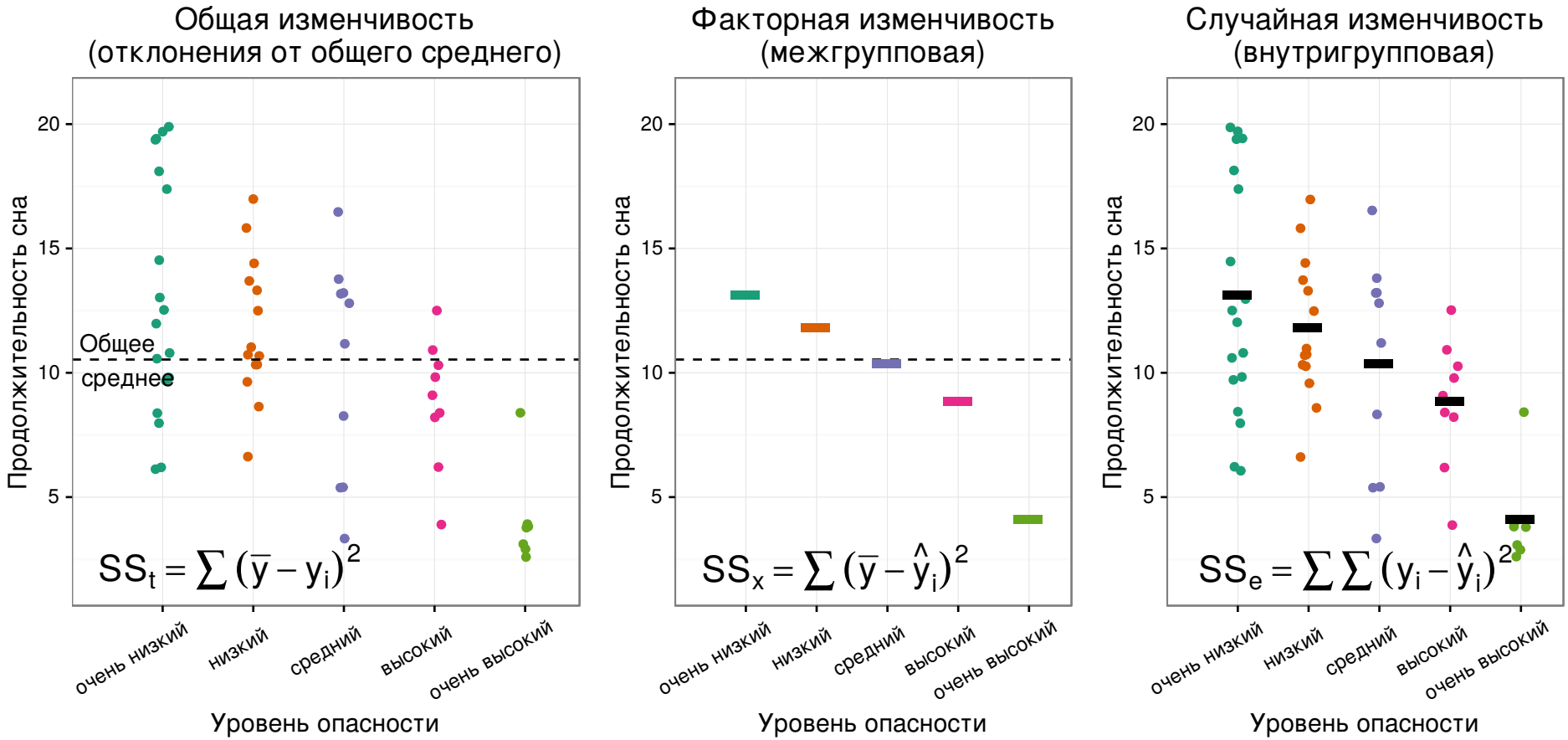
$$y_{ij} = \mu + a_i + \varepsilon_{ij}$$

Из чего складываются средние значения в группах по фактору?

Группа	Общее среднее	Эффект	Случайная изменчивость
очень низкий	μ	a_1	ε_{1j}
низкий	μ	a_2	ε_{2j}
...	...	...	...
очень высокий	μ	a_5	ε_{5j}

Структура общей изменчивости

Общая изменчивость (SSt) = Факторная (SSx) + Случайная (SSe)



Если выборки из одной совокупности, то Факторная изменчивость = Случайная изменчивость

Таблица дисперсионного анализа

Источник изменчивости	SS	df	MS	F
Название фактора	$SS_x = \sum (\bar{y} - \hat{y}_i)^2$	$df_x = a - 1$	$MS_x = \frac{SS_x}{df_x}$	$F_{df_x df_e} = \frac{MS_x}{MS_e}$
Случайная	$SS_e = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	$df_e = N - a$	$MS_e = \frac{SS_e}{df_e}$	
Общая	$SS_t = \sum (\bar{y} - y_i)^2$	$df_t = N - 1$		

Гипотезы: $H_0 : MS_x = MS_e$, $H_A : MS_x MS_e$

Минимальное упоминание результатов в тексте должно содержать F_{df_x, df_e} и p.

Дисперсионный анализ в R

Используем Anova из пакета car, хотя есть и другие функции. Зачем? Когда факторов будет больше одного, эта функция сможет правильно оценить значимость каждого из них независимо от других.

Anova(результат_функции_lm) - дисперсионный анализ

```
library(car)
sl_mod <- lm(TotalSleep ~ Danger, data=sl)
sl_anova <- Anova(sl_mod)
sl_anova
```

```
# Anova Table (Type II tests)
#
# Response: TotalSleep
#           Sum Sq Df F value    Pr(>F)
# Danger    457.26  4  8.0523 0.0000378 ***
# Residuals 752.41 53
# ---
# Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

- Общая продолжительность сна различается у видов животных, которые в разной степени подвержены опасностям в течение жизни ($F_{4,53} = 8.05$, $p < 0.01$).

Результаты дисперсионного анализа

Результаты дисперсионного анализа можно представить в виде таблицы

- Общая продолжительность сна различается у видов животных, которые в разной степени подвержены опасностям в течение жизни (Табл. 2).

Table 2: Результаты дисперсионного анализа продолжительности сна млекопитающих в зависимости от уровня опасностей, которым они подвергаются в течении жизни. SS — суммы квадратов отклонений, df — число степеней свободы, F — значение F-критерия, P — доверительная вероятность.

	SS	df	F	P
Уровень опасности	457.3	4	8.1	< 0.01
Остаточная	752.4	53		

Вопрос:

Назовите условия применимости дисперсионного анализа

- Подсказка: дисперсионный анализ - линейная модель, как и регрессия

Вопрос:

Назовите условия применимости дисперсионного анализа

- Подсказка: дисперсионный анализ - линейная модель, как и регрессия

Вопрос:

Назовите условия применимости дисперсионного анализа

- Подсказка: дисперсионный анализ - линейная модель, как и регрессия

Условия примененимости дисперсионного анализа:

- Случайность и независимость групп и наблюдений внутри групп
- Нормальное распределение остатков
- Гомогенность дисперсий остатков

Вопрос:

Назовите условия применимости дисперсионного анализа

- Подсказка: дисперсионный анализ - линейная модель, как и регрессия

Условия примененимости дисперсионного анализа:

- Случайность и независимость групп и наблюдений внутри групп
- Нормальное распределение остатков
- Гомогенность дисперсий остатков

Другие ограничения

- Лучше работает, если размеры групп примерно одинаковы (т.наз. сбалансированный дисперсионный комплекс)
- Устойчив к отклонениям от нормального распределения (при равных объемах групп или при больших выборках)

Задание: Проверьте условия применимости

Проверьте условия применимости дисперсионного анализа, используя графики остатков

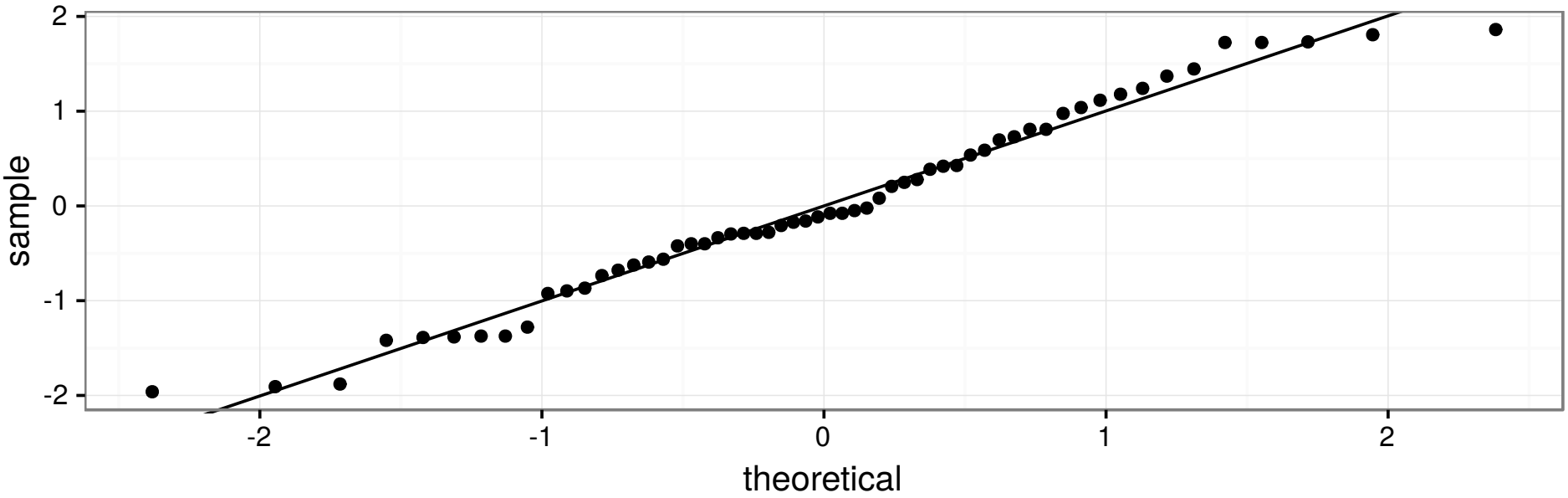
Решение: 1. Данные для проверки условий применимости на графиках остатков

```
# Данные для анализа остатков
sl_diag <- fortify(sl_mod)
head(sl_diag)
```

```
#   TotalSleep       Danger       .hat   .sigma      .cooksd   .fitted
# 1        3.3      средний 0.10000000 3.663258 0.0854675133 10.310000
# 2        8.3      средний 0.10000000 3.792511 0.0070267928 10.310000
# 3       12.5 очень низкий 0.05555556 3.802964 0.0002985783 13.083333
# 4       16.5      средний 0.10000000 3.694691 0.0666417404 10.310000
# 5        3.9      высокий 0.11111111 3.734657 0.0477828562  8.811111
# 6        9.8      высокий 0.11111111 3.801093 0.0019373477  8.811111
#       .resid  .stdresid
# 1 -7.0100000 -1.9611318
# 2 -2.0100000 -0.5623217
# 3 -0.5833333 -0.1593084
# 4  6.1900000  1.7317270
# 5 -4.9111111 -1.3825029
# 6  0.9888889  0.2783773
```

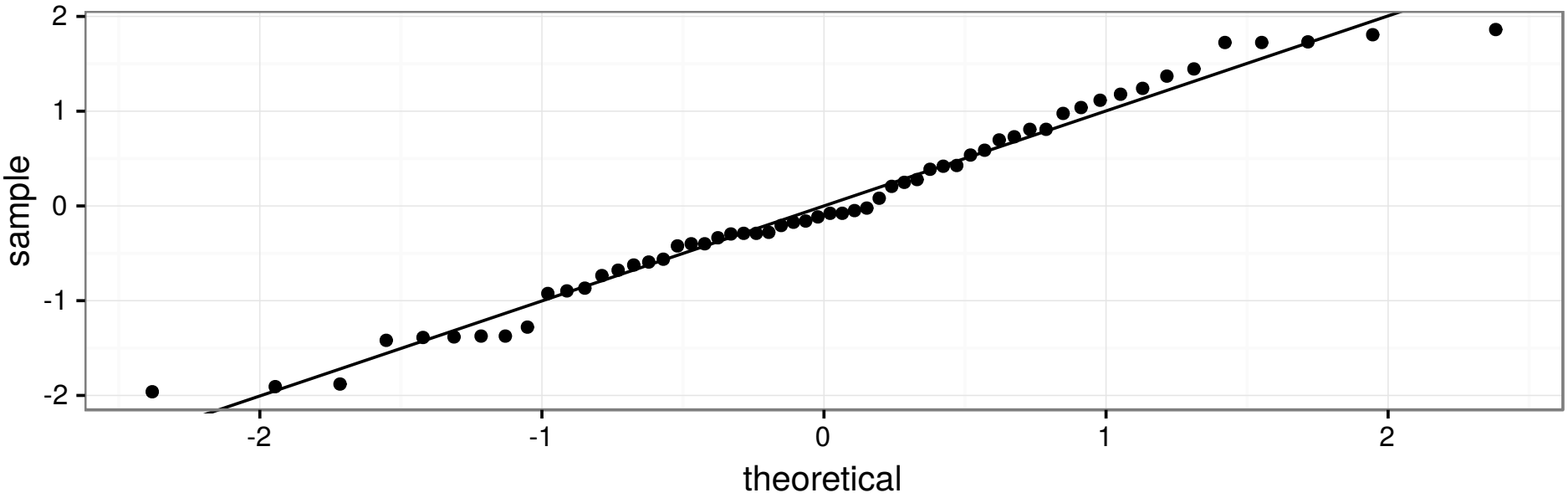
Решение: 2. Нормальность распределения

```
ggplot(sl_diag) + geom_point(stat = "qq", aes(sample = .stdresid)) +
  geom_abline(intercept = 0, slope = sd(sl_diag$.stdresid))
```



Решение: 2. Нормальность распределения

```
ggplot(sl_diag) + geom_point(stat = "qq", aes(sample = .stdresid)) +
  geom_abline(intercept = 0, slope = sd(sl_diag$.stdresid))
```

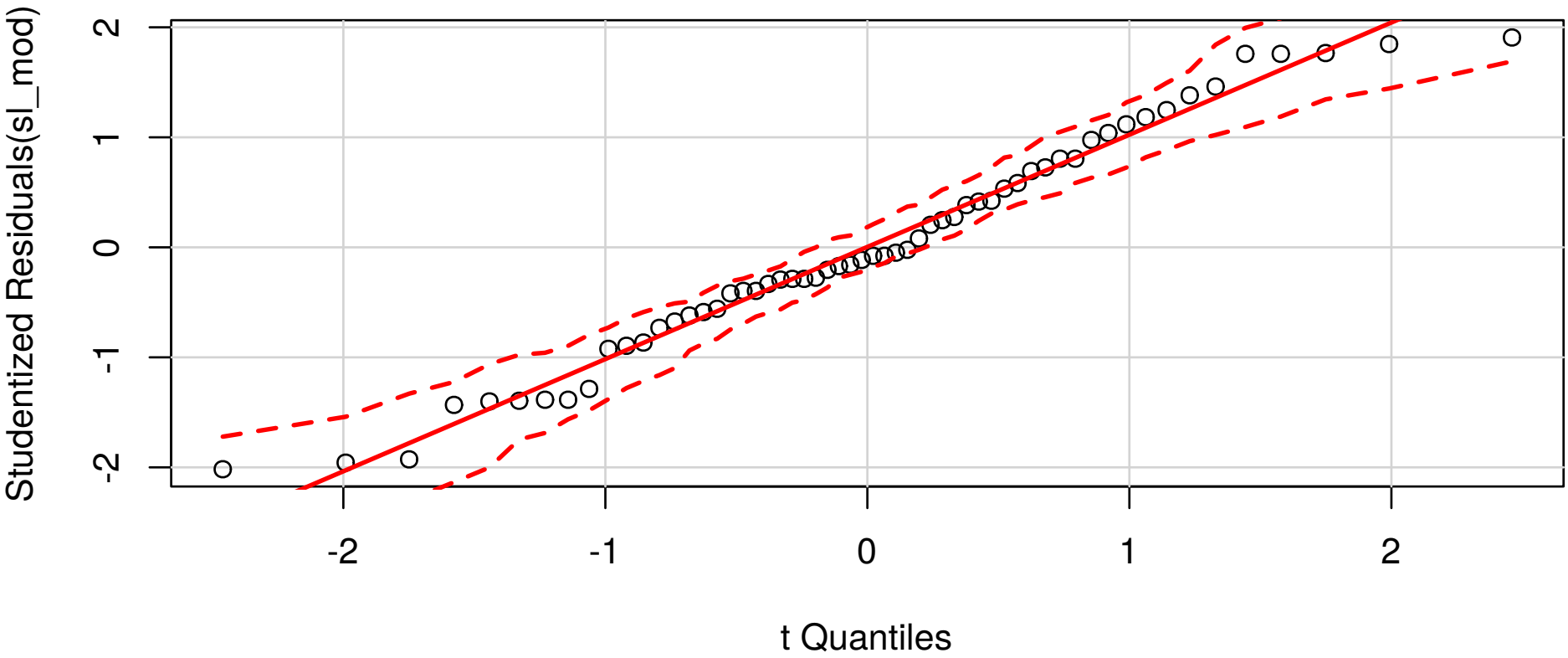


- Распределение практически нормальное

Немного более удобный квантильный график для проверки нормальности распределения

qqPlot() из пакета car

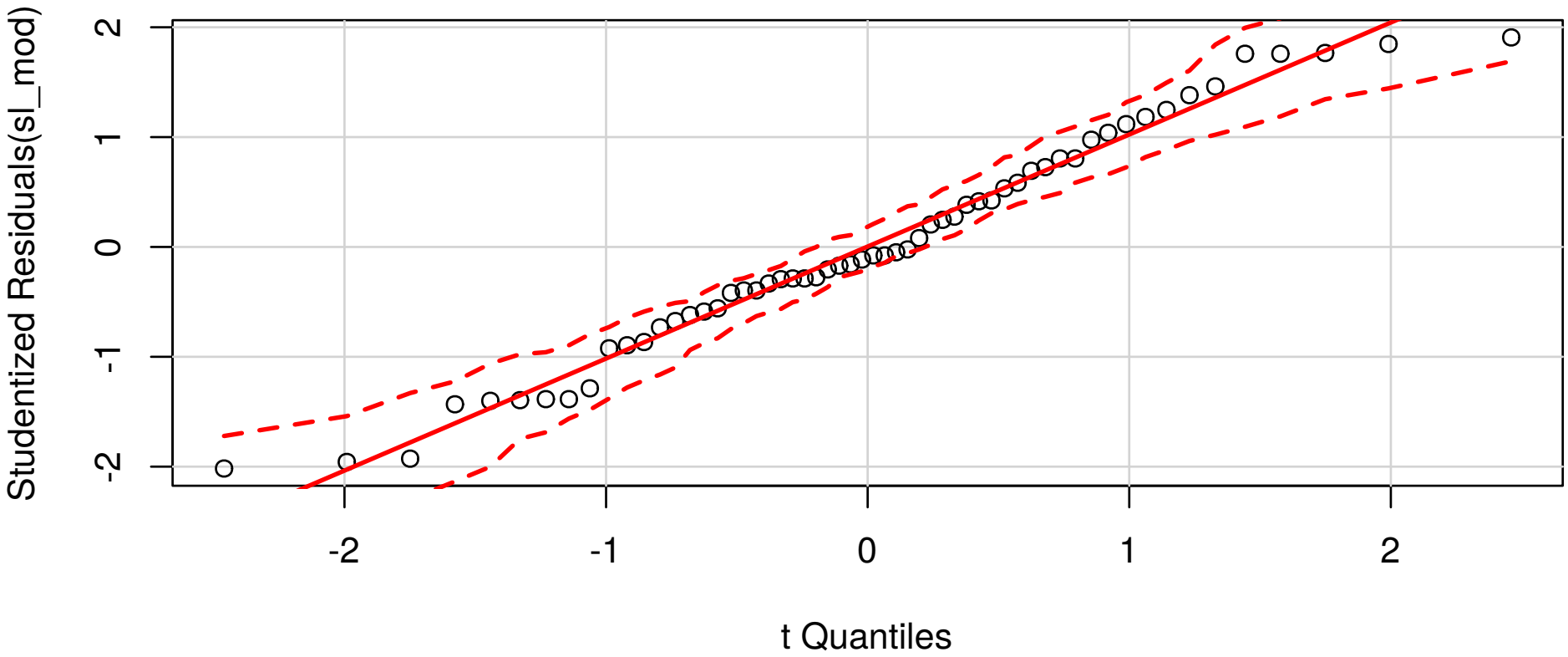
```
qqPlot(sl_mod)
```



Немного более удобный квантильный график для проверки нормальности распределения

qqPlot() из пакета car

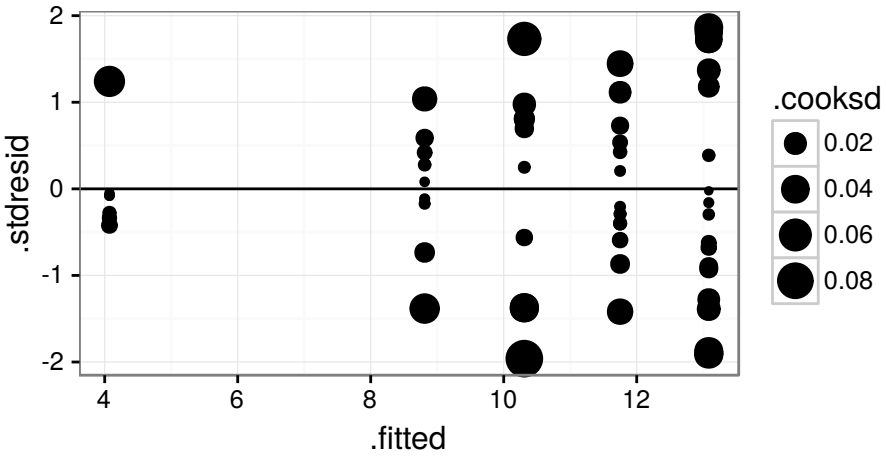
```
qqPlot(sl_mod)
```

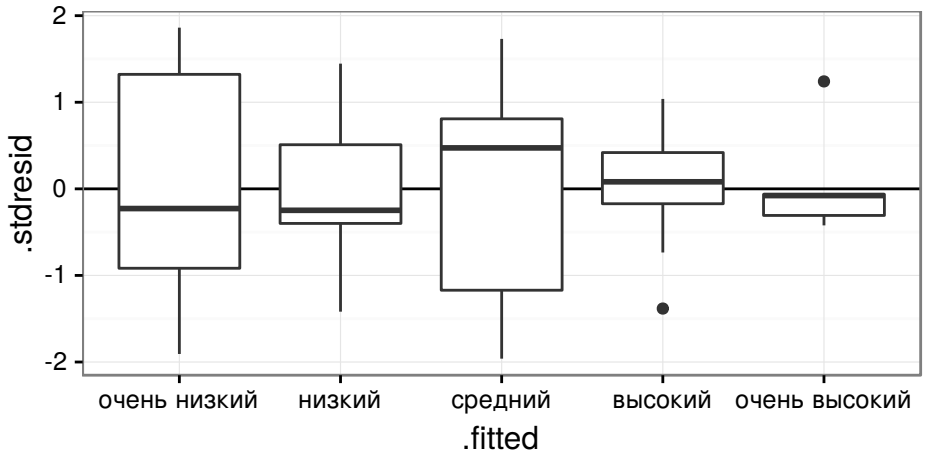


- Нет отклонений от нормального распределения

Решение: 3. Выбросы, гомогенность дисперсий, паттерны в остатках

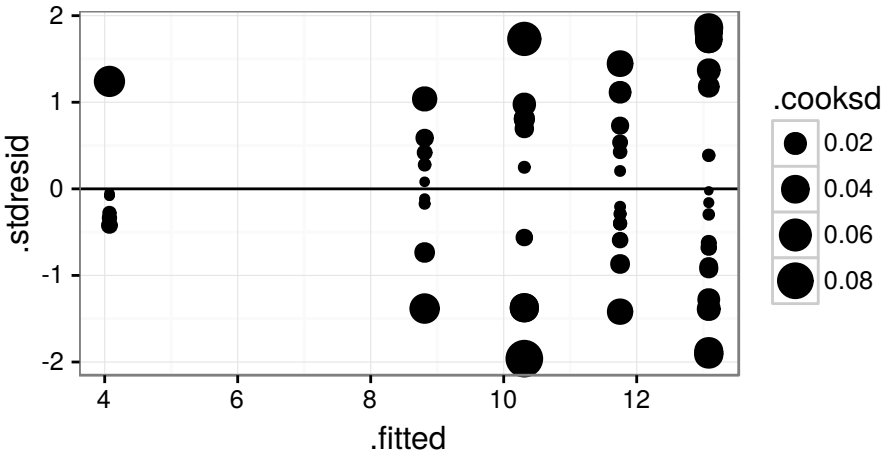
```
gg_res <- ggplot(sl_diag, aes(x = .fitted, y = .stdresid)) +
  geom_hline(yintercept = 0)
gg_1 <- gg_res + geom_point(aes(size = .cooksd))
gg_2 <- gg_res + geom_boxplot(aes(x = Danger))
library(gridExtra)
grid.arrange(gg_1, gg_2, ncol = 2)
```

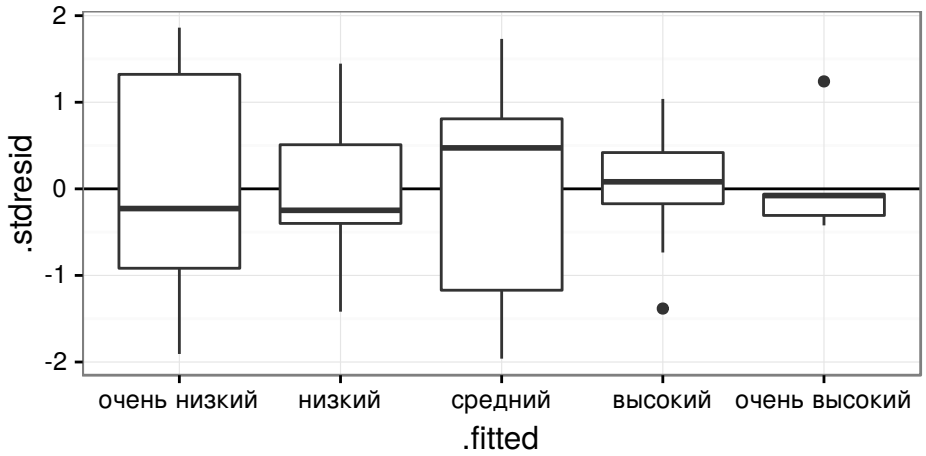




Решение: 3. Выбросы, гомогенность дисперсий, паттерны в остатках

```
gg_res <- ggplot(sl_diag, aes(x = .fitted, y = .stdresid)) +
  geom_hline(yintercept = 0)
gg_1 <- gg_res + geom_point(aes(size = .cooksd))
gg_2 <- gg_res + geom_boxplot(aes(x = Danger))
library(gridExtra)
grid.arrange(gg_1, gg_2, ncol = 2)
```





- Остатки в пределах двух стандартных отклонений, расстояния Кука маленькие - можно продолжать.
- Подозрительно маленькая дисперсия продолжительности сна в группе с очень высоким уровнем опасности.

Решение: 4. Паттерны в остатках (графики остатков от переменных в модели и вне ее).

На самом деле, нужно еще построить графики остатков от переменных в модели и вне ее — чтобы выяснить, не забыли ли мы включить другие важные предикторы.

Построй те самостоятельно графики, используя код. Какие из переменных хорошо было бы добавить в модель?

```
sl_diag_full <- data.frame(sl_diag, sl)
gg_other <- ggplot(sl_diag_full, aes(y = .stdresid)) + geom_hline(yintercept = 0)
gg_other + geom_point(aes(x = log(BodyWt)))
gg_other + geom_point(aes(x = log(BrainWt)))
gg_other + geom_point(aes(x = NonDreaming))
gg_other + geom_point(aes(x = Dreaming))
gg_other + geom_point(aes(x = log(LifeSpan)))
gg_other + geom_point(aes(x = Gestation))
gg_other + geom_point(aes(x = Predation))
gg_other + geom_point(aes(x = Exposure))
```

Решение: 4. Паттерны в остатках (графики остатков от переменных в модели и вне ее).

На самом деле, нужно еще построить графики остатков от переменных в модели и вне ее — чтобы выяснить, не забыли ли мы включить другие важные предикторы.

Построй те самостоятельно графики, используя код. Какие из переменных хорошо было бы добавить в модель?

```
sl_diag_full <- data.frame(sl_diag, sl)
gg_other <- ggplot(sl_diag_full, aes(y = .stdresid)) + geom_hline(yintercept = 0)
gg_other + geom_point(aes(x = log(BodyWt)))
gg_other + geom_point(aes(x = log(BrainWt)))
gg_other + geom_point(aes(x = NonDreaming))
gg_other + geom_point(aes(x = Dreaming))
gg_other + geom_point(aes(x = log(LifeSpan)))
gg_other + geom_point(aes(x = Gestation))
gg_other + geom_point(aes(x = Predation))
gg_other + geom_point(aes(x = Exposure))
```

- На всех графиках, кроме Predation и Exposure, величина остатков зависит от переменных, невключенных в модель. Правильно было бы их добавить. Но сейчас, в учебных целях, мы продолжим работать с простым однофакторным дисперсионным анализом.

Post hoc тесты

Post-hoc тесты

Дисперсионный анализ показывает, есть ли влияние фактора (= различаются ли средние значения зависимой переменной между группами)

Пост-хок тесты показывают, какие именно из возможных пар средних значений различаются.

Свойства post-hoc тестов для попарных сравнений средних

- Применяются, если влияние фактора значимо
- Делают поправку для снижения вероятности ошибки I рода α, (но не слишком, чтобы не снизилась мощность, чтобы не возросла β)
- Учитывают величину различий между средними
- Учитывают количество сравниваемых пар
- Различаются по степени консервативности (Тьюки - разумный компромисс)
- Работают лучше при равных объемах групп, при гомогенности дисперсий

Пост-хок тест Тьюки в R

- `glht()` - “general linear hypotheses testing”
- `linfct` - аргумент, задающий гипотезу для тестирования
- `mcp()` - функция, чтобы задавать множественные сравнения (обычные пост-хоки)
- `Danger = “Tukey”` - тест Тьюки по фактору `Danger`

```
library(multcomp)
sl_pht <- glht(sl_mod, linfct = mcp(Danger = ”Tukey”))
```

Результаты попарных сравнений (тест Тьюки)

```
summary(sl_pht)
```

```
#
#    Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
#
# Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
#
#
# Fit: lm(formula = TotalSleep ~ Danger, data = sl)
#
# Linear Hypotheses:
#                                    Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
# низкий - очень низкий == 0           -1.333      1.343  -0.993   0.8553
# средний - очень низкий == 0          -2.773      1.486  -1.866   0.3441
# высокий - очень низкий == 0          -4.272      1.538  -2.777   0.0550 .
# очень высокий - очень низкий == 0    -9.012      1.678  -5.370   <0.001 ***
# средний - низкий == 0                -1.440      1.560  -0.923   0.8850
# высокий - низкий == 0                -2.939      1.610  -1.826   0.3662
# очень высокий - низкий == 0          -7.679      1.744  -4.402   <0.001 ***
# высокий - средний == 0               -1.499      1.731  -0.866   0.9066
# очень высокий - средний == 0         -6.239      1.857  -3.360   0.0118 *
# очень высокий - высокий == 0         -4.740      1.899  -2.496   0.1052
# ---
# Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
# (Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Описываем результаты пост-хок теста

- Продолжительность сна у видов, подвергающихся очень высокому уровню опасности в течение жизни, значительно меньше, чем у тех, кто живет при среднем, низком и очень низком уровне опасности (тест Тьюки, $p < 0.05$).

Описываем результаты пост-хок теста

- Продолжительность сна у видов, подвергающихся очень высокому уровню опасности в течение жизни, значительно меньше, чем у тех, кто живет при среднем, низком и очень низком уровне опасности (тест Тьюки, $p < 0.05$).

Но лучше еще и нарисовать график.

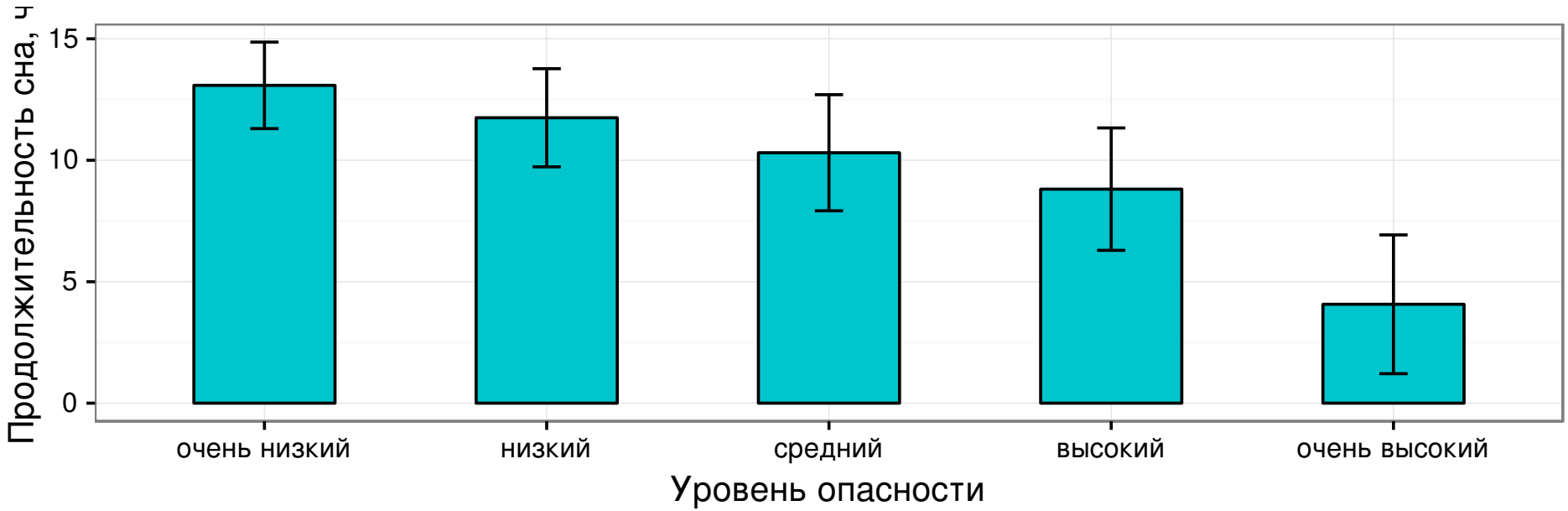
Данные для графика при помощи predict()

```
MyData <- data.frame(Danger = levels(sl$Danger))
MyData$Danger <- factor(
  MyData$Danger,
  levels = c("очень низкий", "низкий", "средний", "высокий", "очень высокий")
  labels = c("очень низкий", "низкий", "средний", "высокий", "очень высокий")
MyData <- data.frame(MyData,
                     predict(sl_mod, newdata = MyData,
                             interval = "confidence"))
MyData
```

```
#           Danger       fit       lwr       upr
# 1  очень низкий 13.083333 11.302064 14.864603
# 2        низкий 11.750000  9.730230 13.769770
# 3       средний 10.310000  7.920176 12.699824
# 4       высокий  8.811111  6.292015 11.330207
# 5 очень высокий  4.071429  1.215043  6.927815
```

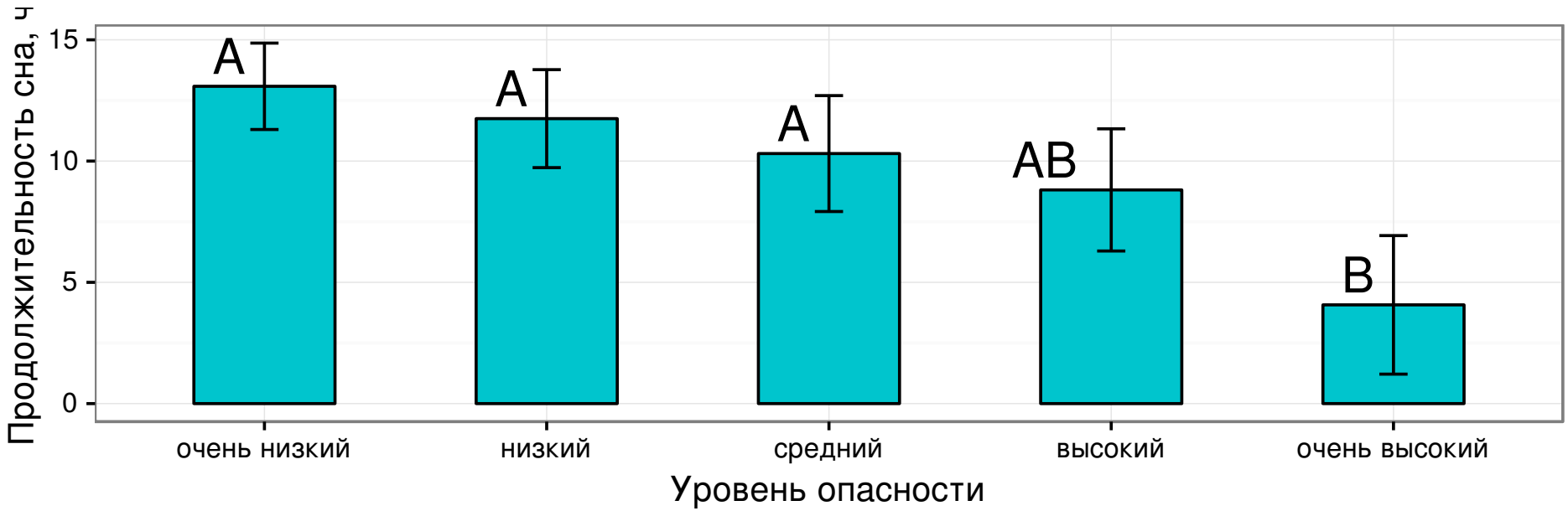
Этот график можно использовать для представления результатов

```
gg_means <- ggplot(MyData, aes(x = Danger, y = fit)) +
  geom_bar(stat = "identity", fill = "turquoise3", colour = "black", width = 
  geom_errorbar(aes(ymin = lwr, ymax = upr), width = 0.1) +
  labs(x = "Уровень опасности", y = "Продолжительность сна, ч")
gg_means
```



Достоверно различающиеся по пост-хок тесту группы обозначим разными буквами

```
gg_means +
  geom_text(aes(label = c("A", "A", "A", "AB", "B"),
                vjust = -0.3, hjust = 1.5), size = 6)
```



Take home messages

- При множественных попарных сравнениях увеличивается вероятность ошибки первого рода. Поправка Бонферрони - способ точно рассчитать, насколько нужно снизить уровень значимости для каждого из сравнений
- При помощи дисперсионного анализа можно проверить гипотезу о равенстве средних значений
- Условия применимости (должны выполняться, чтобы тестировать гипотезы)
  - Случайность и независимость групп и наблюдений внутри групп
  - Нормальное распределение
  - Гомогенность дисперсий
- Post hoc тесты - это попарные сравнения после дисперсионного анализа, которые позволяют сказать, какие именно средние различаются

Дополнительные ресурсы

- Quinn, Keough, 2002, pp. 173-207
- Logan, 2010, pp. 254 - 282
- Open Intro to Statistics, pp.236-246
- Sokal, Rohlf, 1995, pp. 179-260
- Zar, 2010, pp. 189-207