Дисперсионный анализ, часть 1Математические методы в зоологии с использованием R

Марина Варфоломеева

Знакомимся дисперсионным анализом

Вы сможете

- Объяснить, в чем опасность множественных сравнений, и как с ними можно бороться
- Рассказать, из каких частей состоит общая изменчивость
- Перечислить и проверить условия применимости дисперсионного анализа
- Интерпретировать и описать результаты, записанные в таблице дисперсионного анализа
- Провести множественные попарные сравнения при помощи post hoс теста Тьюки, представить и описать их результаты

Множественные сравнения

Пример: сон у млекопитающих

Известно, что у разных млекопитающих продолжительность сна сильно варьирует. Ленивцы спят, коалы спят, а кому-то достаточно. Условия жизни у всех тоже разные. Давайте проверим, есть ли связь между продолжительностью сна и уровнем опасности среды.

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

Читаем данные из файла одним из способов

Чтение из xlsx

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

Чтение из csv

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

Все ли правильно открылось?

```
str(sleep) # Структура данных
```

Марина Варфоломеева

```
# 'data.frame': 62 obs. of 11 variables:
# $ Species : Factor w/ 62 levels "Africanelephant",..: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ...
# $ 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
           Africanelephant
                              6654 5712.0
                                                    NA
                                                              NA
  2 Africangiantpouchedrat
                                       6.6
                                                   6.3
                                 1
#
    TotalSleep LifeSpan Gestation Predation Exposure Danger
# 1
           3.3
                   38.6
                               645
                                                     5
                                                            3
# 7
```

Дисперсионный анализ, часть 1

Знакомимся с данными

Есть ли пропущенные значения (особенно, в переменных, которые нас интересуют)?

```
colSums(is.na(sleep))
```

```
# 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.

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

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)
```

```
#
```

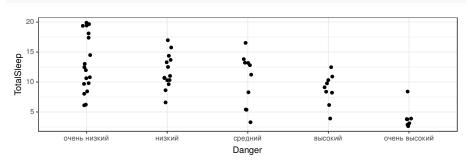
```
# очень низкий низкий средний высокий очень высокий
# 18 14 10 9 7
```

Задание 1

Дополните код, чтобы построить точечный график зависимости общей продолжительности сна (TotalSleep) от уровня опасности среды (Danger).

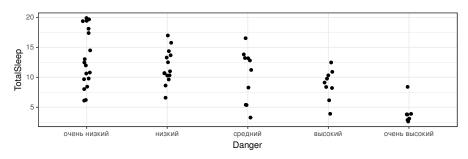
```
library( )
theme_set(theme_bw())

ggplot(data = , aes(x = , y = )) +
  geom_ (position = position_jitter(width = 0.05))
```



Решение 1

```
library(ggplot2)
theme_set(theme_bw())
ggplot(data = sl, aes(x = Danger, y = TotalSleep)) +
  geom_point(position = position_jitter(width = 0.05))
```



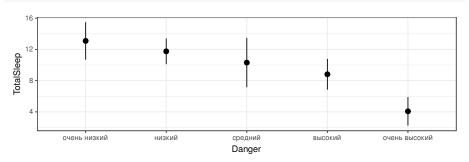
Точечный график — не самый удобный способ представления таких данных.

Задание 2

Точечный график— не самый удобный способ представления таких данных. Лучше было бы изобразить средние значения и их 95% доверительные интервалы.

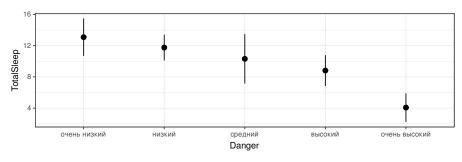
Замените в графике из прошлого задания геом на этот стат:

stat_summary(geom = 'pointrange', fun.data = mean_cl_normal)



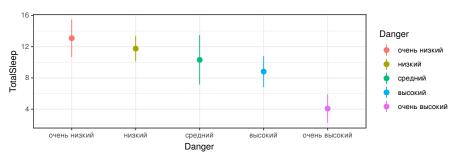
Решение 2

```
ggplot(data = sl, aes(x = Danger, y = TotalSleep)) +
   stat_summary(geom = 'pointrange', fun.data = mean_cl_normal)
```



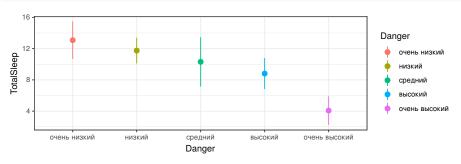
Задание 3

Раскрасьте график в зависимости от уровня опасности среды (используйте эстетику colour)



Решение 3

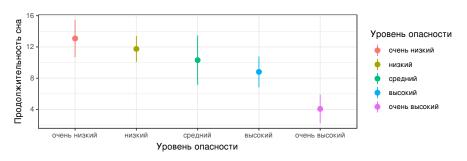
```
ggplot(data = sl, aes(x = Danger, y = TotalSleep, colour = Danger)) +
    stat_summary(geom = 'pointrange', fun.data = mean_cl_normal)
```



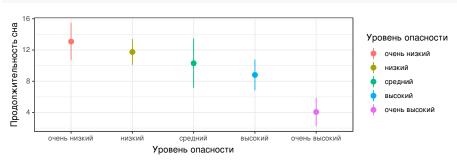
Задание 4

Создайте подписи к осям и легенде, при помощи слоя подписей labs(). Отредактируйте этот код и добавьте его к графику с предыдущего шага

```
labs(x = , = "Продолжительность cha", colour = )
```

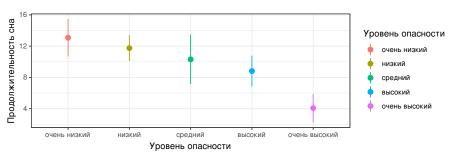


Решение 4



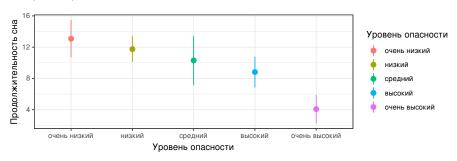
Множественные сравнения: число возможных сравнений

Мы могли бы сравнить среднюю продолжительность сна в разных группах при помощи t-критерия. У нас всего 5 групп. Сколько возможно между ними попарных сравнений?



Множественные сравнения: число возможных сравнений

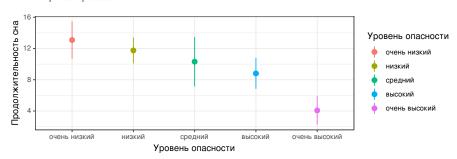
Мы могли бы сравнить среднюю продолжительность сна в разных группах при помощи t-критерия. У нас всего 5 групп. Сколько возможно между ними попарных сравнений?



Всего возможно 10 сравнений.

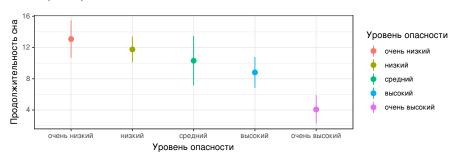
Множественные сравнения: вероятность совершить ошибку I рода

Всего возможно 10 сравнений. Если для каждого вероятность ошибки I рода будет $\alpha_{per\ comparison}=0.05$, то для всей группы из 10 сравнений — ?



Множественные сравнения: вероятность совершить ошибку I рода

Всего возможно 10 сравнений. Если для каждого вероятность ошибки I рода будет $\alpha_{per\ comparison}=0.05$, то для всей группы из 10 сравнений — ?



Для независимых тестов вероятность совершить хотя бы одну ошибку I рода в группе сравнений будет $\alpha_{familu\ wise}=1-\left(1-0.05\right)^{10}=0.4012631$ (т.е. 40%).

Для зависимых тестов (например, для попарных сравнений) эта вероятность чуть ниже (Winer et al. 1991), но все равно хорошо бы внести поправку в

 $[\]alpha_{per\ comparison}$

Поправка Бонферрони

Если все-таки приходится делать много сравнений, нужно снизить $\alpha_{per\ comparison}$ до обычного уровня.

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

Поправка Бонферрони

Если все-таки приходится делать много сравнений, нужно снизить $lpha_{per\ comparison}$ до обычного уровня.

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

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

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

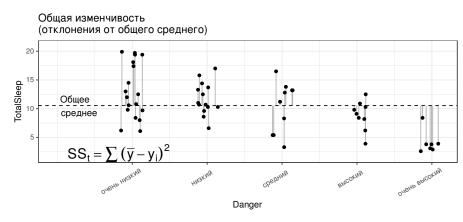
Это очень жесткая поправка! Мы рискуем не найти достоверных различий, даже там, где они есть...

Но есть выход. Вместо множества попарных сравнений можно использовать один тест — дисперсионный анализ (analysis of variation, ANOVA).

Дисперсионный анализ

Общая изменчивость

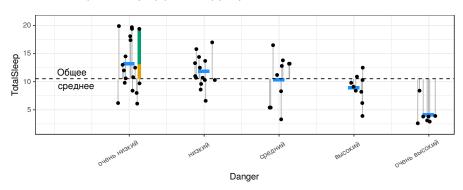
Общая изменчивость ${\rm SS_t}$ — это сумма квадратов отклонений наблюдаемых значений y_i от общего среднего \bar{y}



Отклонения от общего среднего

Отклонения от общего среднего складываются из двух составляющих:

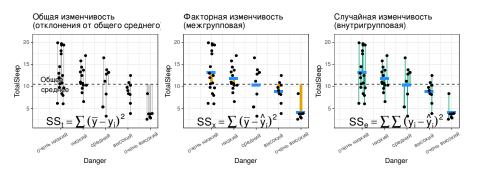
- Внутригрупповые отклонения отклонения наблюдаемых значений от внутригрупповых средних
- Межгрупповые отклонения отклонения внутригрупповых средних от общего среднего ("эффекты" групп)



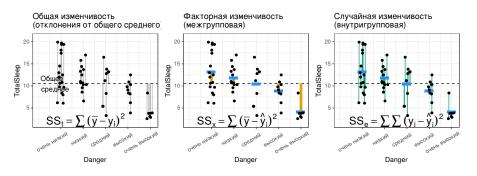
Структура общей изменчивости

Общая изменчивость SS_t складывается из изменчивости связанной с фактором SS_x и случайной изменчивости SS_e

$$SS_t = SS_x + SS_e$$



Средние квадраты отклонений



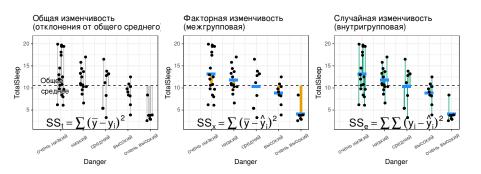
MS_{\star} полная дисперсия MS_{π} факторная дисперсия MS_{s} остаточная дисперсия

$$\begin{split} MS_t &= \frac{SS_t}{df_t} & MS_x &= \frac{SS_x}{df_x} & MS_e &= \frac{SS_e}{df_e} \\ SS_t &= \sum \left(\bar{y} - y_i\right)^2 & SS_x &= \sum \left(\hat{y} - \bar{y}\right)^2 & SS_e &= \sum \left(\hat{y} - y_i\right)^2 \\ df_t &= n - 1 & df_x &= a - 1 & df_e &= n - a \end{split}$$

Если выборки из одной совокупности, то

Если выборки из одной совокупности, то наблюдения из разных групп будут отличаться друг от друга не больше, чем наблюдения из одной группы, т.е. факторная дисперсия будет близка к случайной дисперсии $MS_x \sim MS_e$. Их равенство можно проверить при помощи F-критерия

$$F_{df_x,df_e} = \frac{MS_x}{MS_e}$$



F-критерий

$$F_{df_x,df_e} = \frac{MS_x}{MS_e}$$

Гипотезы:

 H_0 : все выборки взяты из одной совокупности — $\mu_1=\mu_2=\dots=\mu_a.$ Тогда $MS_r=MS_e$

 H_A : какая-то из выборок из другой совокупности, т.е. какое-то среднее значение μ_k отличается от других. Тогда $MS_x>MS_e$

F-статистика подчиняется F-распределению. Форма F-распределения зависит от двух параметров: $df_r=a-1$ и $df_e=n-a$

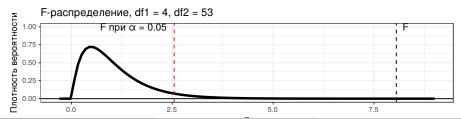


Таблица дисперсионного анализа

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

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

Дисперсионный анализ в R

Используем Anova из пакета саг, 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

```
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 ($F_{5,3} = NA$, NA).

library(car)

Описание результатов 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. 1).

Table 1: 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 — уровень значимости

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

Назовите условия применимости дисперсионного анализа

Назовите условия применимости дисперсионного анализа

Подсказка: дисперсионный анализ - линейная модель, как и регрессия

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

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)

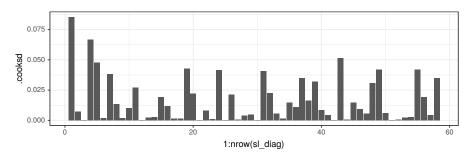
Задание: Проверьте условия применимости

Проверьте условия применимости дисперсионного анализа для модели sl_mod, Дополните код, чтобы построить графики остатков

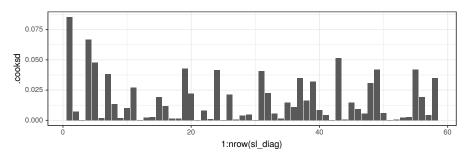
```
# Данные для анализа остатков
sl_diag <- fortify()
head(sl_diag)
# График расстояния Кука
ggplot(data = , aes(x = 1:nrow( ), y = )) +
geom_bar(stat = "identity")
# График остатков от предсказанных значений
ggplot(data = , aes(x = , y = .stdresid)) +
geom_
# Квантильный график остатков
qqPlot
```

```
# Данные для анализа остатков
sl diag <- fortify(sl mod)</pre>
head(sl diag)
#
    TotalSleep
                     Danger
                                   .hat
                                          .sigma
                                                      . cooksd
                                                                .fitted
           3.3
                    средний 0.10000000 3.663258 0.0854675133 10.310000
         8.3
                    средний 0.10000000 3.792511 0.0070267928 10.310000
         12.5 очень низкий 0.05555556 3.802964 0.0002985783 13.083333
          16.5
                    средний 0.10000000 3.694691 0.0666417404 10.310000
 5
                    высокий 0.11111111 3.734657 0.0477828562 8.811111
          3.9
           9.8
                    высокий 0.11111111 3.801093 0.0019373477
                                                               8.811111
        resid stdresid
  1 -7.0100000 -1.9611318
  2 -2.0100000 -0.5623217
    -0.5833333 -0.1593084
     6.1900000 1.7317270
# 5 -4.9111111 -1.3825029
     0.9888889 0.2783773
```

```
# График расстояния Кука
ggplot(data = sl_diag, aes(x = 1:nrow(sl_diag), y = .cooksd)) +
geom_bar(stat = "identity")
```

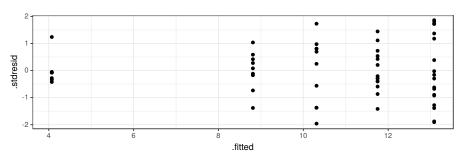


```
# График расстояния Кука
ggplot(data = sl_diag, aes(x = 1:nrow(sl_diag), y = .cooksd)) +
geom_bar(stat = "identity")
```

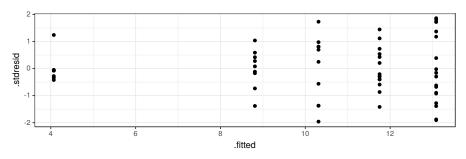


• Влиятельных наблюдений нет

```
# График остатков от предсказанных значений
ggplot(data = sl_diag, aes(x = .fitted, y = .stdresid)) +
geom_point()
```



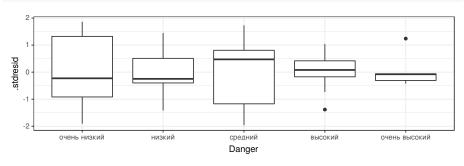
```
# График остатков от предсказанных значений
ggplot(data = sl_diag, aes(x = .fitted, y = .stdresid)) +
geom_point()
```



• В одной из групп маленький разброс

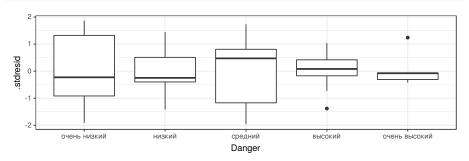
Если предиктор — дискретная переменная, то вместо обычного точечного графика остатков лучше построить боксплот остатков

```
# График остатков от значений дискретного предиктора
ggplot(data = sl_diag, aes(x = Danger, y = .stdresid)) + geom_boxplot()
```



Если предиктор — дискретная переменная, то вместо обычного точечного графика остатков лучше построить боксплот остатков

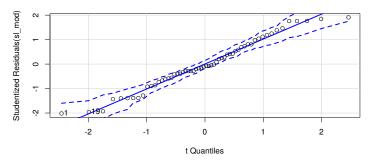
```
# График остатков от значений дискретного предиктора
ggplot(data = sl_diag, aes(x = Danger, y = .stdresid)) + geom_boxplot()
```



- Остатки в пределах двух стандартных отклонений.
- Подозрительно маленькая дисперсия продолжительности сна в группе с очень высоким уровнем опасности.

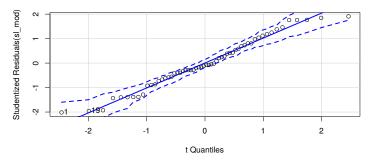
qqPlot(sl_mod)

#[1] 1 19



qqPlot(sl_mod)

#[1] 1 19



• Остатки распределены нормально

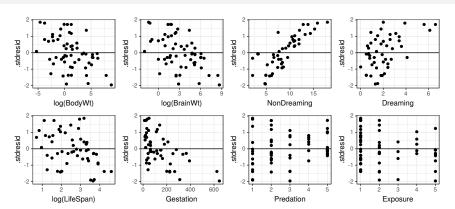
Решение: Паттерны в остатках (графики остатков от переменных в модели и вне ее).

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.

Постройте 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 = Dreaming)))
gg_other + geom_point(aes(x = Gestation)))
gg_other + geom_point(aes(x = Fredation)))
gg_other + geom_point(aes(x = Exposure))</pre>
```

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



 На всех графиках, кроме Predation и Exposure, величина остатков зависит от переменных, не включенных 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"))</pre>
```

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
                                   -2.773 1.486 -1.866 0.3441
# средний - очень низкий == 0
# 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
                                  -6.239
# очень высокий - средний == 0
                                              1.857 -3.360
                                                             0.0119 *
# очень высокий - высокий == 0
                                   -4.740
                                              1.899 -2.496
                                                             0.1051
# 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).

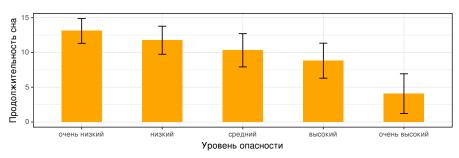
Но лучше еще и нарисовать график.

Данные для графика при помощи predict()

```
# 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
```

Задание

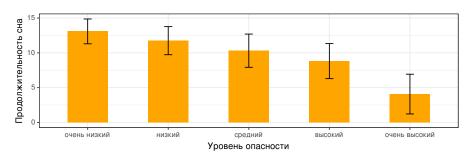
Используя данные из датафрейма MyData, дополните код и постройте график? где разными столбиками с заливкой оранжевого цвета будут показаны предсказанные средние значения, а усами будут показаны их доверительные интервалы.



```
gg_means <- ggplot(data = , aes(x = , y = )) +
  geom_bar(stat = "", width = 0.5) +
  geom_errorbar(aes(ymin = , ymax = ), width = 0.1) +
  labs()
qq means</pre>
```

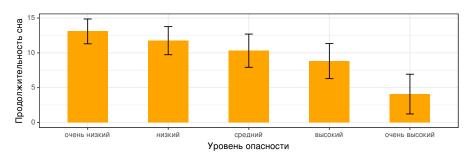
Этот график можно использовать для представления результатов

```
gg_means <- ggplot(data = MyData, aes(x = Danger, y = fit)) + geom_bar(stat = "identity", fill = "orange", width = 0.5) + geom_errorbar(aes(ymin = lwr, ymax = upr), width = 0.1) + labs(x = "Уровень опасности", y = "Продолжительность сна") qq means
```



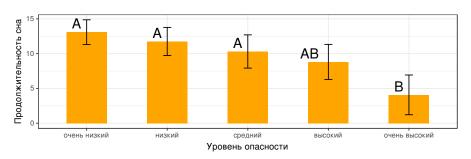
Этот график можно использовать для представления результатов

```
gg_means <- ggplot(data = MyData, aes(x = Danger, y = fit)) + geom_bar(stat = "identity", fill = "orange", width = 0.5) + geom_errorbar(aes(ymin = lwr, ymax = upr), width = 0.1) + labs(x = "Уровень опасности", y = "Продолжительность сна") qq means
```



Этот график можно использовать для представления результатов, но здесь не видно, какие именно группы различаются. Можно улучшить этот график.

Достоверно различающиеся по пост-хок тесту группы обозначим разными буквами



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
- Sokal, Rohlf, 1995, pp. 179-260
- Zar, 2010, pp. 189-207