

ОСНОВЫ БИОСТАТИСТИКИ

Александр Владимирович Рубанович

зав. лаб. экологической генетики ИОГен РАН

rubanovich@vigg.ru

тел. (499) 132-8958

Темы для обсуждения

- ☐ Оценка ассоциаций «генотип-фенотип» и их значимости
- ☐ Факторы, влияющие на значимость оценок
- ☐ Объединение выборок и метаисследования
- ☐ Учет множественности сравнений

Выявление ассоциаций «генотип-фенотип»: минимальный набор действий

- Фенотип – количественный признак (например: вес, содержание кальция, частота аббераций)

Кроме этого в обоих случаях можно строить различные регрессионные модели: Зависимая переменная – признак (фенотип), независимыми переменные – генотипы. Например так: A/A - 0, A/T - 1, T/T - 2

- Фенотип - количественный признак (например: вес, содержание кальция, частота аббераций)



Вычисляем средние значения признака для разных генотипов; значимость по критерию Манна-Уитни

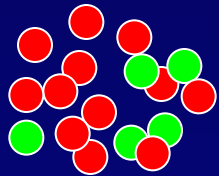
OR – количественная мера предрасположенности (**O**dd **R**atio)

OR – неперенный атрибут «**case-control association study**»
(выявление «генов предрасположенности» к заболеванию
путем сопоставлений частот генотипов у больных и здоровых)

OR показывает во сколько раз повышена вероятность
заболеть для носителя «плохого» генотипа

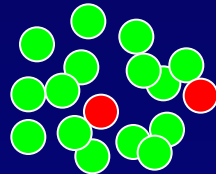
Группа больных

Контроль (здоровые)



$P_{\text{больные}}$

>>



$P_{\text{контроль}}$



● - генотип,
указывающий на
предрасположенность
к заболеванию

$$OR = \frac{P_{\text{больные}} (1 - P_{\text{контроль}})}{P_{\text{контроль}} (1 - P_{\text{больные}})}$$

OR>1 – генотип связан с болезнью

OR=1 – нет связи между генотипом и болезнью

OR<1 – протективный генотип

Soft для вычисления OR и проведения метаисследований

WinPepi Portal (2010) - computer programs for epidemiologists



Free!

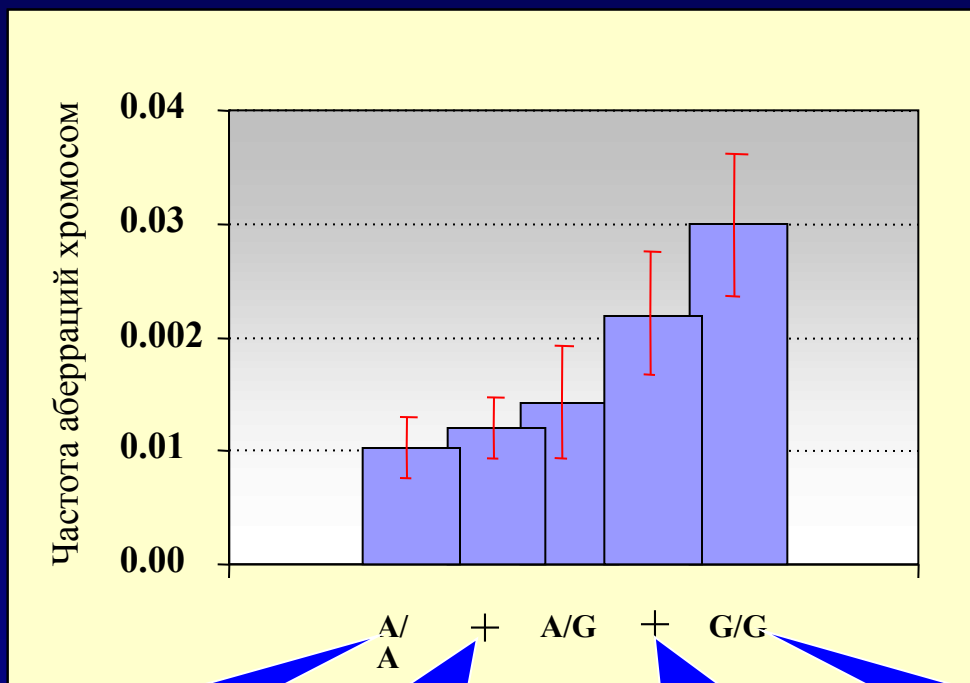


30 дней

Статистический анализ сопряженности генотипов и количественных признаков

- Самое простое и необходимое: вычисление средних значений признака для носителей различных генотипов. Далее сравнение по непараметрическому тесту

Обычно стараются рассмотреть две группы



Гомозигота по
мажорному аллелю

доминантная
аллель

Доминантная
аллель

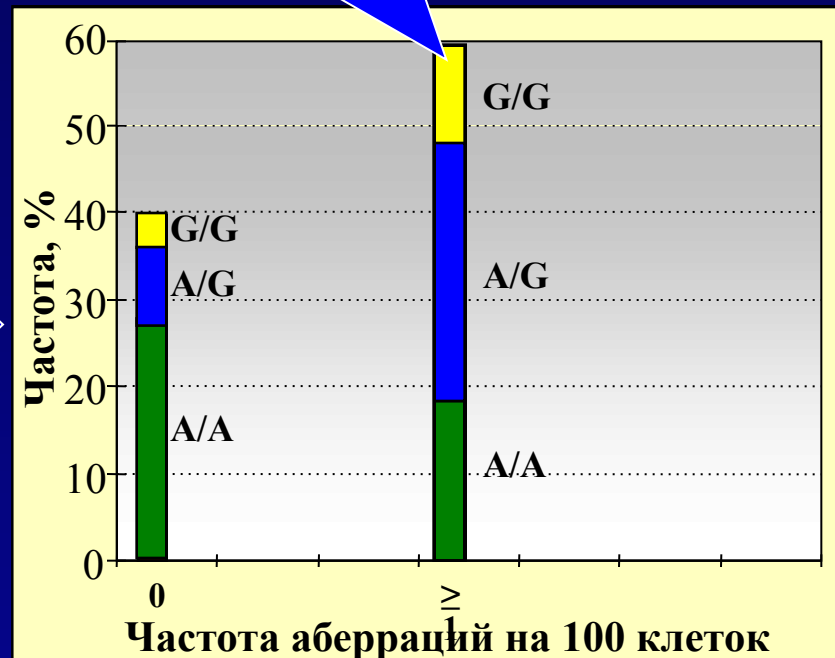
Гомозигота по
минорному аллелю

Статистический анализ сопряженности генотипов и количественных признаков

- Самое простое и необходимое: вычисление средних значений и дисперсий для каждого генотипа. Далее сравнение средних (не по Ст

Далее вычисляется OR и значимость по точному критерию Фишера. В данном примере риск возникновения aberrаций у носителей минорного аллеля G равен $OR=2,1$ и $p=0,015$

- Сравнение частот генотипов для низкого (или высоким) значением признака



Статистический анализ сопряженности генотипов и количественных признаков

- Самое простое и необходимое: вычисление средних значений признака для носителей различных генотипов. Далее сравнение по непараметрическому тесту (не по Стьюденту!)

- С зависимой переменной – признаком (p), независимыми переменными – генотипами (x_i).
Например так: А/А - 0, А/Т - 1, Т/Т - 2

- Логистическая и пуассоновская регрессии

$$p = \frac{1}{1 + e^{a_1 x_1 + \dots + a_n x_n}}$$

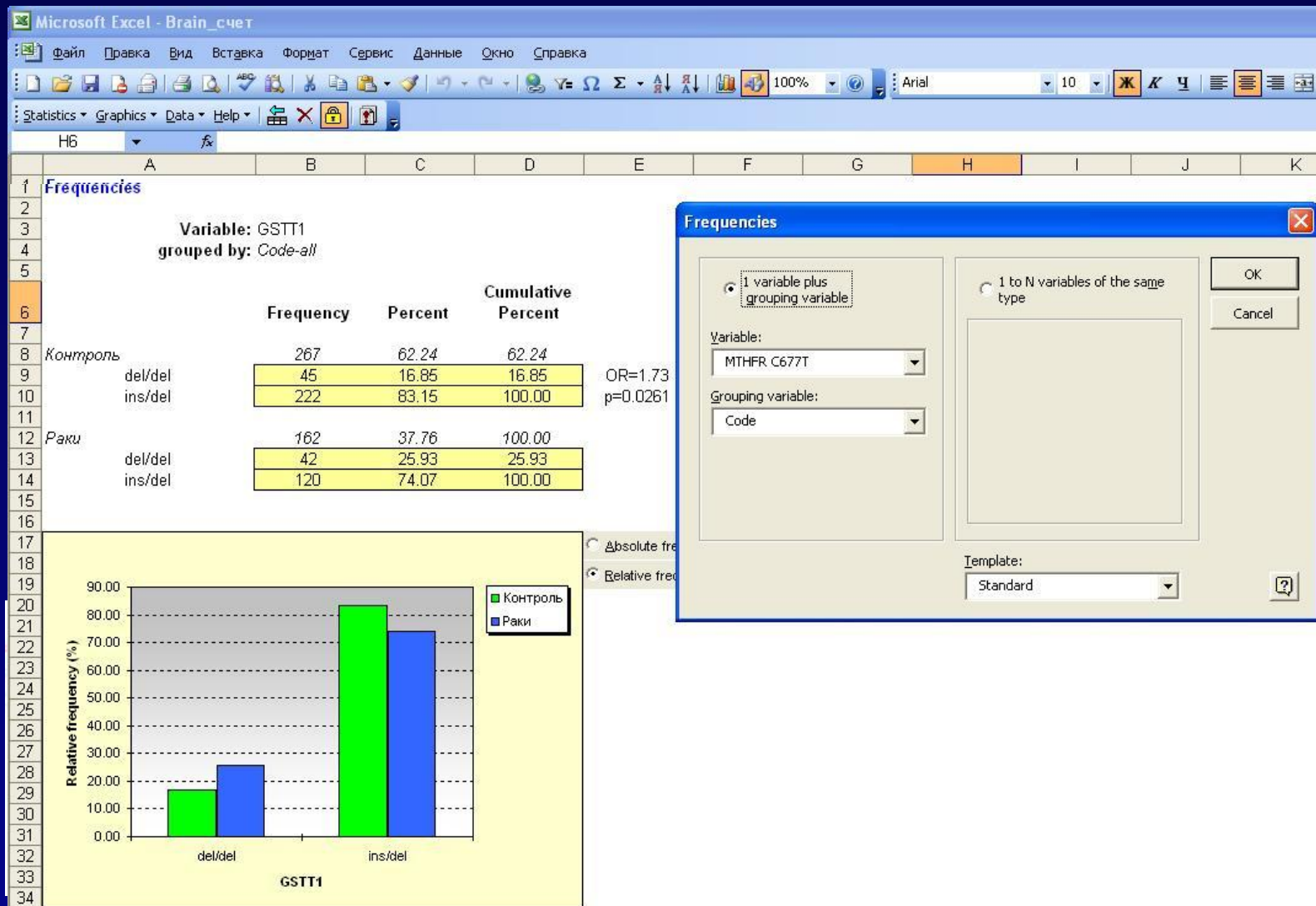
p – частота aberrаций
 x_i – генотип i -го локуса
 a_i – коэф. регрессии

Для логистической регрессии $a_i = \ln(\text{OR}_i)$

$$p = e^{a_0 + a_1 x_1 + \dots + a_n x_n}$$

Soft для работы с генотипами и гаплотипами

WinStat for Excel



Темы для обсуждения

- ☐ Оценка ассоциаций «генотип-фенотип» и их значимости
- ☐ Факторы, влияющие на значимость оценок
- ☐ Объединение выборок и метаисследования
- ☐ Учет множественности сравнений

Чуть-чуть об ошибках статистических тестов

Нулевая
различия

Традиционно биолог ориентирован на контроль
ошибки I рода (через уровень значимости),
т.е. на гарантии отсутствия ложных открытий,

и
ости

Ошибка I рода (α)

Вероятность отвергнуть правильную нулевую гипотезу =
Вероятность обнаружить различия там, где их нет = **Вероятность совершить фальшивое открытие**



Ошибка II рода (β)

Вероятность принять неправильную нулевую гипотезу =
Вероятность не обнаружить существующие различия =
Вероятность упустить открытие



Мощно
Вероятно
Вероятно

... и при этом мало заботится о возможности
упустить открытие (ошибка II рода)

От чего зависят ошибки статистических тестов?

❑ От размаха реально существующих отличий и разброса данных

❑ От объемов выборок

Ошибка I рода (вероятность фальшивого открытия)

❑ слабо зависит от объемов выборок,
если они сравнимы по величине

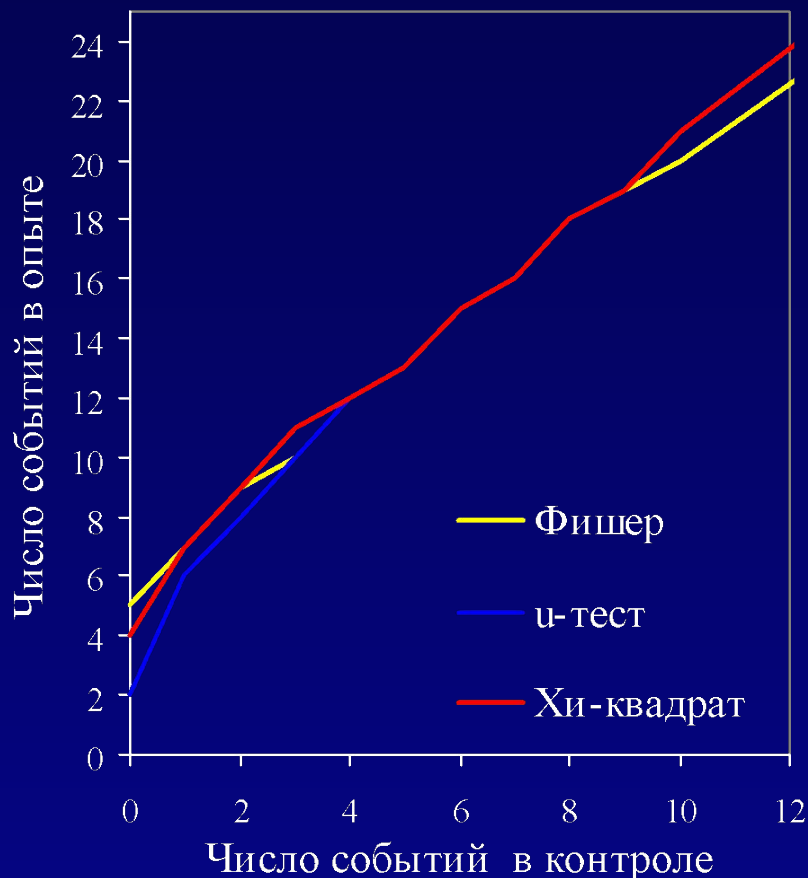
Крайний случай:

«критерий» св. Фомы Неверующего (0033)

Ошибка I рода = 0 $\Leftrightarrow$ Ошибка II рода = 1

Сравнение частот при уровне значимости 0.05

Объемы выборок в опыте и контроле одинаковы



Число событий в контроле	Минимальное число событий в опыте при значимом отличии от контроля		
	Стьюдент	χ^2	Фишер
0	2	4	5
1	6	7	7
2	8	9	8
3	10	11	10
4	12	13	12
5	14	15	14
6	15	15	15
7	16	16	16
8	18	18	18
9	19	19	19
10	21	21	20
20	35	35	33
30	47	47	46

больше 5
независимо от объемов выборок
(100 или 1000)

Темы для обсуждения

- ☐ Оценка ассоциаций «генотип-фенотип» и их значимости
- ☐ Факторы, влияющие на значимость оценок
- ☐ Объединение выборок и метаисследования
- ☐ Учет множественности сравнений

Проверка однородности материала и вычисление OR для нескольких выборок

□ Индекс рассеяния для биномиальных выборок

Можно ли объединить k независимых выборок и оценить частоту как

$$\bar{p} = \frac{\sum_i n_i}{\sum_i N_i}$$

Объем выборки	Число мутаций	Частота
N_1	n_1	p_1
N_2	n_2	p_2
....		
N_k	n_k	p_k

Выборки можно объединять, если

$$\frac{\sum_i N_i (p_i - \bar{p})^2}{\bar{p}} < 2k$$

□ Mantel-Haenszel test



Mantel-Haenszel test

Comparison of two proportions or odds

Back to "Comparison of..." menu

Analyzes any simple 2×2 contingency table.

☐ Check here for equivalence tests. ☐ Include missing data in analysis.

Comparison of two proportions or odds

Back to "Comparison of..." menu

Proportions (of "Yes"): A, 0.1000 B, 0.2200
If inverse sampling was used,

Comparison of two proportions or odds

Back to "Comparison of..." menu

```
Proportions (of "Yes"):  A, 0.0674  B, 0.1429
                        If inverse sampling was used,
                        see results at end of output.
```

Comparison of two proportions or odds

Back to "Comparison of..." menu

Значимость гетерогенности выборок

Вычисление OR для совокупности выборок

Unadjusted odds

Heterogeneity of odds ratio
chi-sq (DF: 1) = 0.07, p -value = 0.888

Heterogeneity index (Nagging's & Thompson's H):
H = 1.0

[A value above 1.5 suggests notable heterogeneity.]

Proportion of variation attributable to heterogeneity (Higgins & Thompson's I-squared):
I-squared = 0.0%

Use scroll-bar or <PgDn> or <PgUp> to see other results.

New data

Next stratum

All strata

Print

WinPepi

PORTAL

Copyright J.H. Abramson, Jan. 9, 2010, Version 10.0



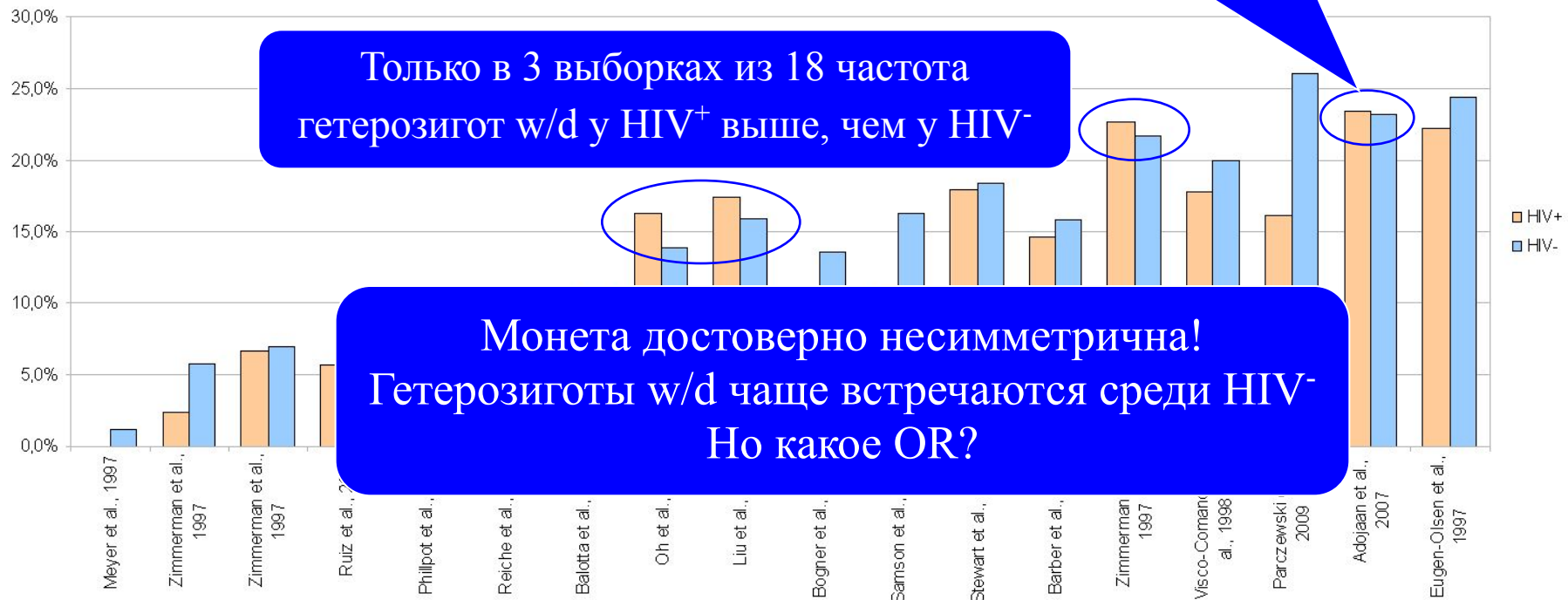
Объединение выборок с неизвестными частотами

частота гетерозигот в выборках HIV+ и HIV-

Если это принять за 4-ое превышение, то $p=0.015$

Только в 3 выборках из 18 частота гетерозигот w/d у HIV⁺ выше, чем у HIV⁻

Монета достоверно несимметрична!
Гетерозиготы w/d чаще встречаются среди HIV⁻
Но какое OR?



Если ассоциации нет, то случаи «больше-меньше» должны появляться с вероятностью $\frac{1}{2}$

Вероятность выпадения 3 (и менее) орлов в 18 бросаниях монеты равна

$$p = C_{18}^3 \left(\frac{1}{2}\right)^{18} + C_{18}^2 \left(\frac{1}{2}\right)^{18} + C_{18}^1 \left(\frac{1}{2}\right)^{18} + C_{18}^0 \left(\frac{1}{2}\right)^{18} \approx 0.0038$$

Ма

Протективное действие гетерозиготы
w/d CCR5 достоверно, но не велико: OR=1.15

ты

Мета-анализ	OR	RR = f_+ / f_-	$\Delta f = f_- - f_+$
Mantel-Haenszel оценка	0.87 (1.15)	0.887	0.016
Unadjusted оценка (по всем данным)	0.78	0.801	0.027
95%-довер. интервал	0.77 - 0.97	0.81 - 0.98	0.007-0.023
Значимость гетерогенности (p)	0.131	0.236	0.451
Число «null»-статей (OR=1) для ликвидации значимости	7	2	-
Значимость корреляции объемов выборок и эффектов (д.б. > 0.1)	0.188 (Regression asymmetry test, Egger) 0.211 (Adjusted rank correlation, Begg&Mazumdar):		
Итоговая значимость различий (Fisher's two-tailed)	0.014		

Темы для обсуждения

- ☐ Оценка ассоциаций «генотип-фенотип» и их значимости
- ☐ Факторы, влияющие на значимость оценок
- ☐ Объединение выборок и метаисследования
- ☐ Учет множественности сравнений

Генерируем две одноклассовые выборки

Наблюдаем проявление фенотипических ассоциаций

Частоты минорных аллелей (в среднем 0.1)

Ген	Больные	Здоровые
1	7	8
2	10	2
3	17	5
4	13	12
5	12	11
6	7	10
7	10	12
8	14	9
9	14	8
10	9	12
11	13	9
12	9	14
13	10	13
14	8	8
15	14	12
16	17	7
17	11	13
18	10	8
19	16	10
20	12	8

4

OR

Должно быть
OR=1

Значим

Сразу 3 локуса
«ассоциированы»
с заболеваемостью!

Как избежать фальшивых открытий?

❑ Правило Карло Бонферрони (1935):

При проведении m независимых статистических тестов значимы только те результаты, для которых

$$p < \frac{0.05}{m}$$

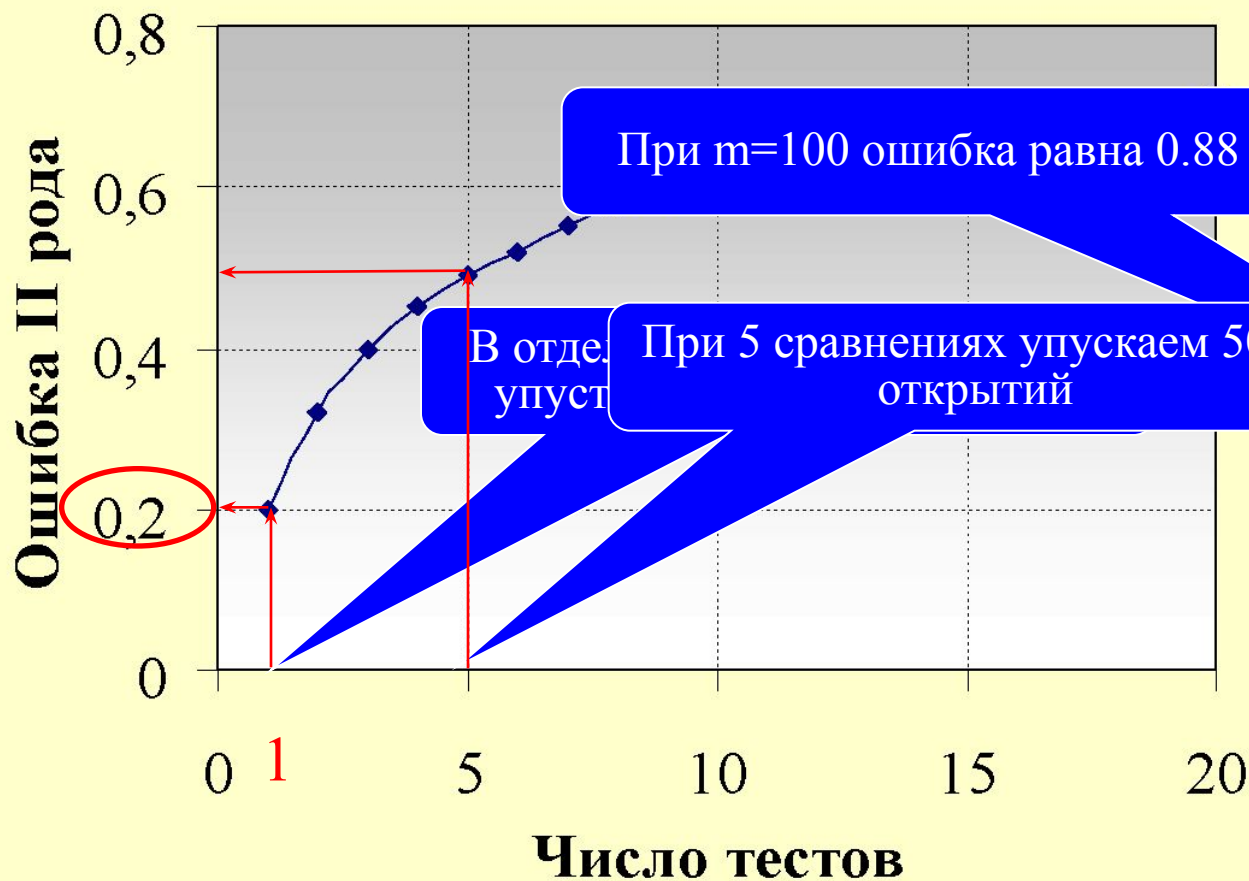
❑ **F**alse **D**iscovery **R**ate control: FDR - контроль

❑ Permutation test

(компьютерная перестановка лэйблов «case-control»)

Зависимость ошибки II рода от числа тестов (SNP)

При 100 сравнениях ради того, чтобы гарантировать отсутствие хотя бы одного ложного результата, мы упускаем 88% открытий!



Новый принцип проверки статистических гипотез: FDR-контроль

False Discovery Rate control: Benjamini, Hochberg (1995)

Вероятность хотя бы одного
фальшивого открытия < Уровня значимости
Ошибка I рода < 0.05

Традиционный принцип
заменяется на



105 статей в



Средняя доля фальшивых открытий < Выбранный уровень

$$E\left(\frac{\text{Число неправильно отвергнутых нулевых гипотез}}{\text{Число отвергнутых нулевых гипотез}}\right) < 0.05$$

Пример: множественные сравнения по 10 тестам

Тест	p_i	Корр В	Корр В
1	0,001	0,005	0,005
2	0,0055	0,007	0,010
3	0,01	0,009	0,015
4	0,015	0,011	0,020
5	0,02	0,013	0,025
6	0,025	0,015	0,030
7	0,3	0,017	0,035
8	0,4	0,019	0,040
9	0,5	0,021	0,045
10	0,8	0,023	0,050

Располагаем тесты в порядке увеличения p_i

Значимые различия после коррекции по FDR

В первой клетке $p_i = 0,001$ поправка Бонферрони составляет $0,005$ и оставляет значимым лишь первое сравнение

Во второй клетке $p_i = 0,0055$ поправка Бонферрони составляет $0,007$ и оставляет значимым лишь первое сравнение

В третьей клетке $p_i = 0,01$ поправка Бонферрони составляет $0,009$ и оставляет значимым лишь первое сравнение

В четвертой клетке $p_i = 0,015$ поправка Бонферрони составляет $0,011$ и оставляет значимым лишь первое сравнение

В пятой клетке $p_i = 0,02$ поправка Бонферрони составляет $0,013$ и оставляет значимым лишь первое сравнение

В шестой клетке $p_i = 0,025$ поправка Бонферрони составляет $0,015$ и оставляет значимым лишь первое сравнение

В седьмой клетке $p_i = 0,3$ поправка Бонферрони составляет $0,017$ и оставляет значимым лишь первое сравнение

В восьмой клетке $p_i = 0,4$ поправка Бонферрони составляет $0,019$ и оставляет значимым лишь первое сравнение

В девятой клетке $p_i = 0,5$ поправка Бонферрони составляет $0,021$ и оставляет значимым лишь первое сравнение

В десятой клетке $p_i = 0,8$ поправка Бонферрони составляет $0,023$ и оставляет значимым лишь первое сравнение

И это все!!!

Для 6-ого теста $p_i = 0,025$ поправка Бонферрони составляет $0,015$ и оставляет значимым лишь первое сравнение

Что делать, если FDR не помогает?

Permutation tests:

случайные перестановки пометок «case-control»
в компьютерных симуляциях по алгоритму:

- ❑ В исходной базе данных делаем случайную перестановку лейблов case-control

Точный тест Фишера – это тоже permutation test,
только реализованный аналитически (p
вычисляется
по формулам комбинаторной теории вероятностей)

- ❑ Вычисляем откорректированное p как

$$p' = \frac{\text{Число случаев } (p_{perm} \leq p)}{N}$$

Permutation test применительно к данным об ассоциации заболеваемости с 10 SNP

Переставляем отметки «case-control» 10000 раз. В результате получаем коррекцию p

SNP	Частота минорного аллеля		OR	Но так бывает не всегда	
	Case (100)	Control (100)			
1	62	26	4,6	0,0001	0,000
2	57	27	2,7	0,009	0,010
3	51	28	2,8	0,011	0,007
4	49	29	2,9	0,023	0,025
5	47	30	3,0	0,071	0,109
6	45	31	3,1	0,096	0,098
7	43	32	3,2	0,103	0,058
8	41	33	3,3	0,120	0,067
9	39	34	3,4	0,571	0,476
10	37	35	3,5	0,911	1,000

Значимо по Бонферрони

Совсем маленькая программка

```

simNum = 10000
simDif = Table[0, {Length[frCase]};
Do[1, RandomPermutation[2 volSample];
tot = Join[frCase, frControl];
ill = tot[[Take[1, volSample];
health = tot[[Take[1, volSample];
genCase1 = gen[ill];
genControl1 = gen[health];
xiSq = (genCase1 - genControl1)^2 / (genCase1 + genControl1);
pl = 1 - CDF[ChiSquareDistribution[1], xiSq];
simDif = simDif + 1;
simp = simDif / simNum; N;

```

