

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 (на

Кроме этого в обоих случаях можно строить различные регрессионные модели: Зависимая переменная – признак (фенотип), независимыми переменными – 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

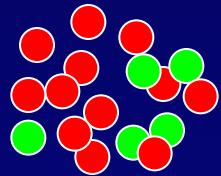
OR – количественная мера предрасположенности (**O**dd **R**atio)

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

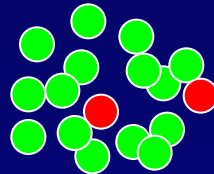
Группа больных

Контроль (здоровые)



$P_{\text{больные}}$

\gg



$P_{\text{контроль}}$



● - 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!

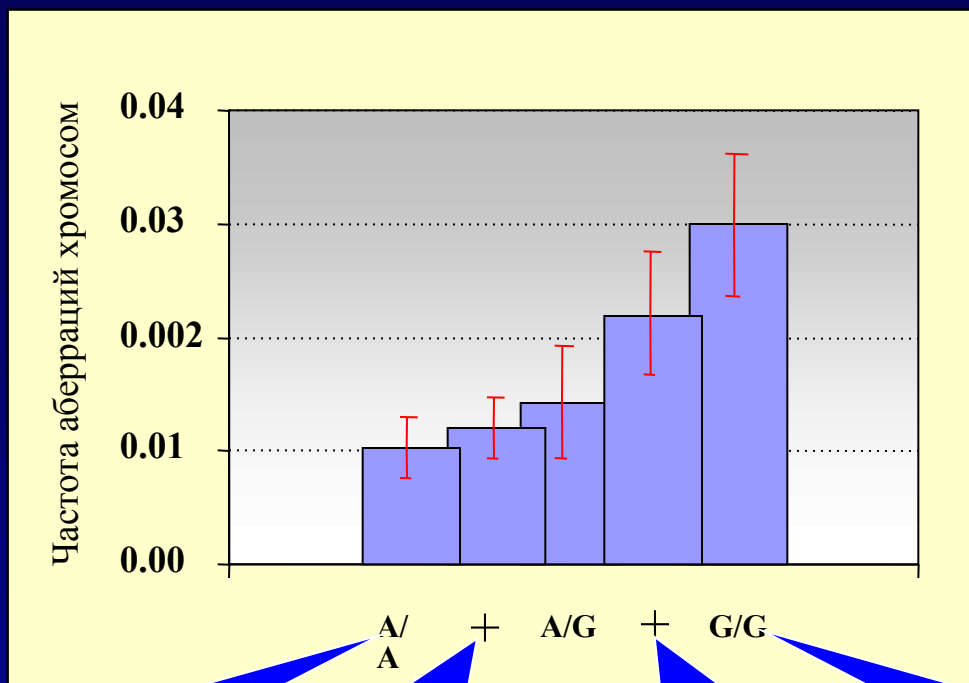


30 дней

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

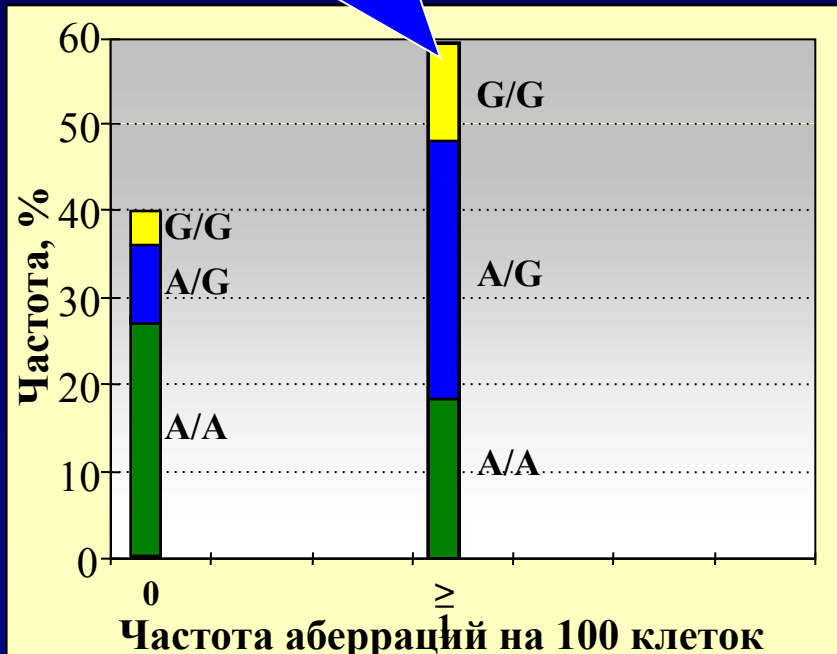
- Самое простое и необходимое: вычисление средних значений и дисперсий для каждого генотипа. Далее сравнение средних значений (не по Стрессу)

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 низким (или высоким) значением признака



Группа людей с нулевым уровнем aberrаций



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 и независимыми переменными (генотипами) x_i . Например так: А/А - 0, А/Т - 1, Т/Т - 2

- Логистическая и пуассоновская регрессии

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

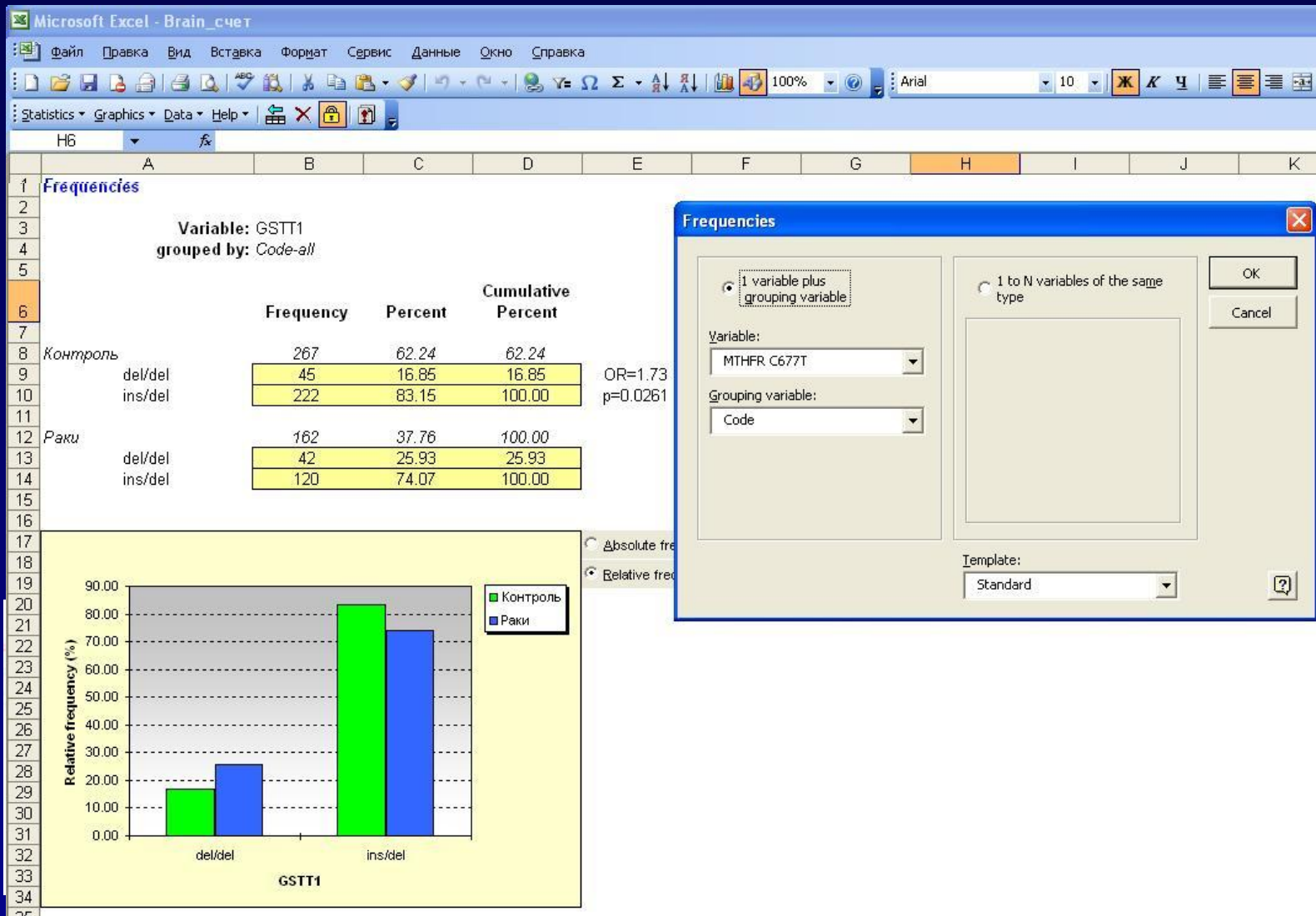
p – частота aberrаций
 x_i – генотип i -го локуса
 a_i – коэф. регрессии

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



The 'Frequencies' dialog box is shown, allowing for the configuration of the analysis. It includes options for the number of variables and the grouping variable.

Variable: MTHFR C677T

Grouping variable: Code

Template: Standard

Free!

Free!

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,

ии
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
Вероятн
Вероятн

... 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

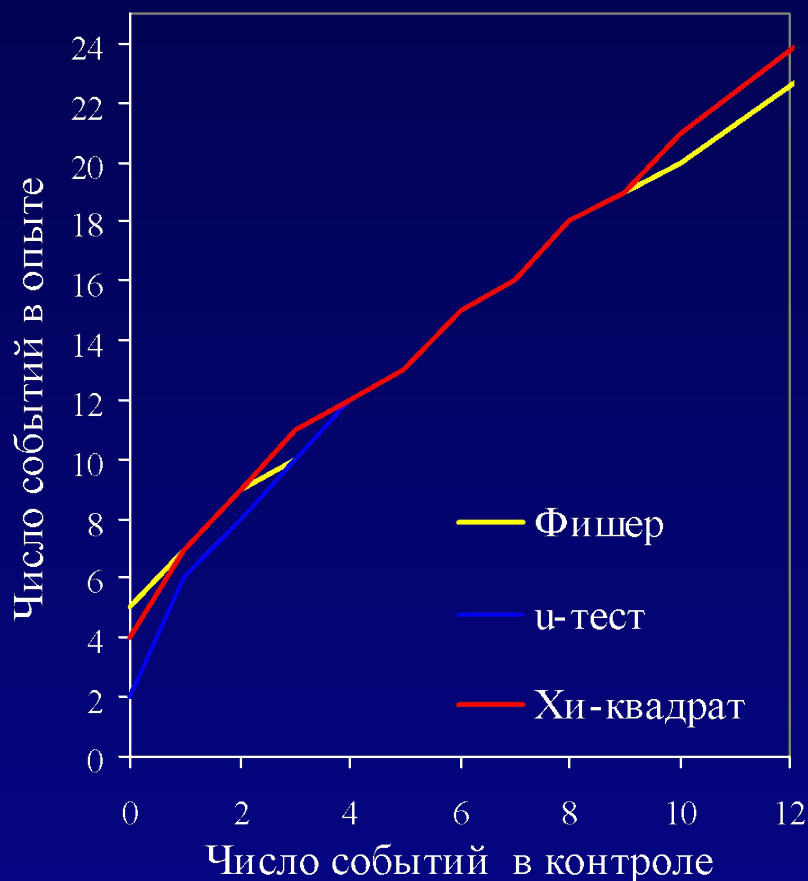
Крайний случай:

«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	9
3	11	11	11
4	12	12	12
5	13	13	13
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.

The group
For each

A:

B:

Stratified
strata hav

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,

Exact tests:

Fisher's P:

One-tailed

Two-tailed

Double one-tail

Mid-P:

One-tailed

Two-tailed

Double one-tail

Overall's continuity

One-tailed

Two-tailed

Double one-tail

[New data](#)

Comparison of two proportions or odds

Stratum 2

[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

Exact tests:

Fisher's P:

One-tailed:

Two-tailed:

Double one-tail

Mid-P:

One-tailed:

Two-tailed:

Double one-tail

Overall's continuity

One-tailed:

Two-tailed:

Double one-tail

[New data](#)

Comparison of two proportions or odds

Strata 1 to 2 combined

[Back to "Comparison of..." menu](#)

Unadjusted odds ratio = 0.20 to 0.81
Adjusted odds ratio = 0.17 to 0.98

Значимость
гетерогенности
выборок

Вычисление OR для
совокупности выборок

Unadjusted odds

Heterogeneity of odds ratio
chi-sq (DF: 1) = 0.0000 P = 0.888

Heterogeneity index (Higgins & 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](#)

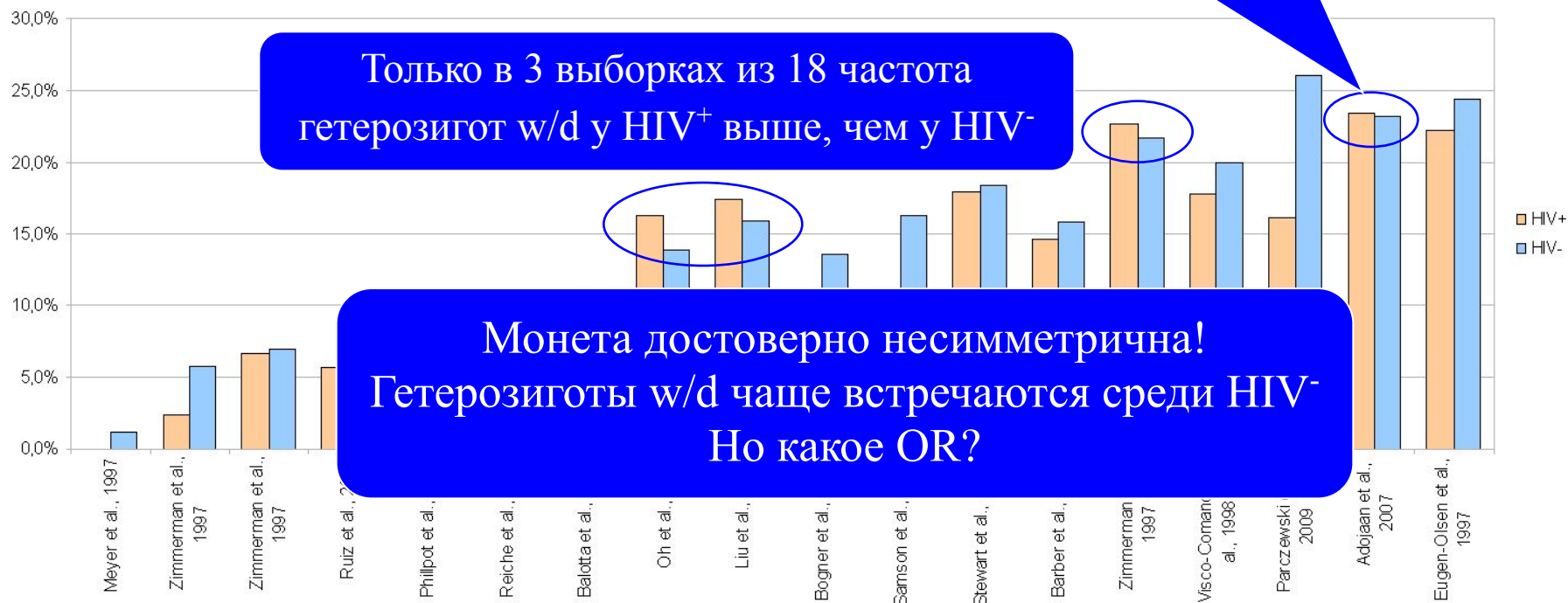
Объединение выборок с незначительными различиями

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

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

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 одинаково распределенные выборки Наблюдаем проявление феномена ассоциаций

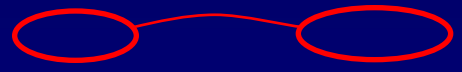
Частоты минорных аллелей (в среднем 0.1)

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

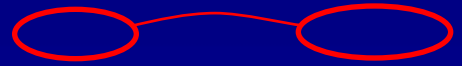
OR

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

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

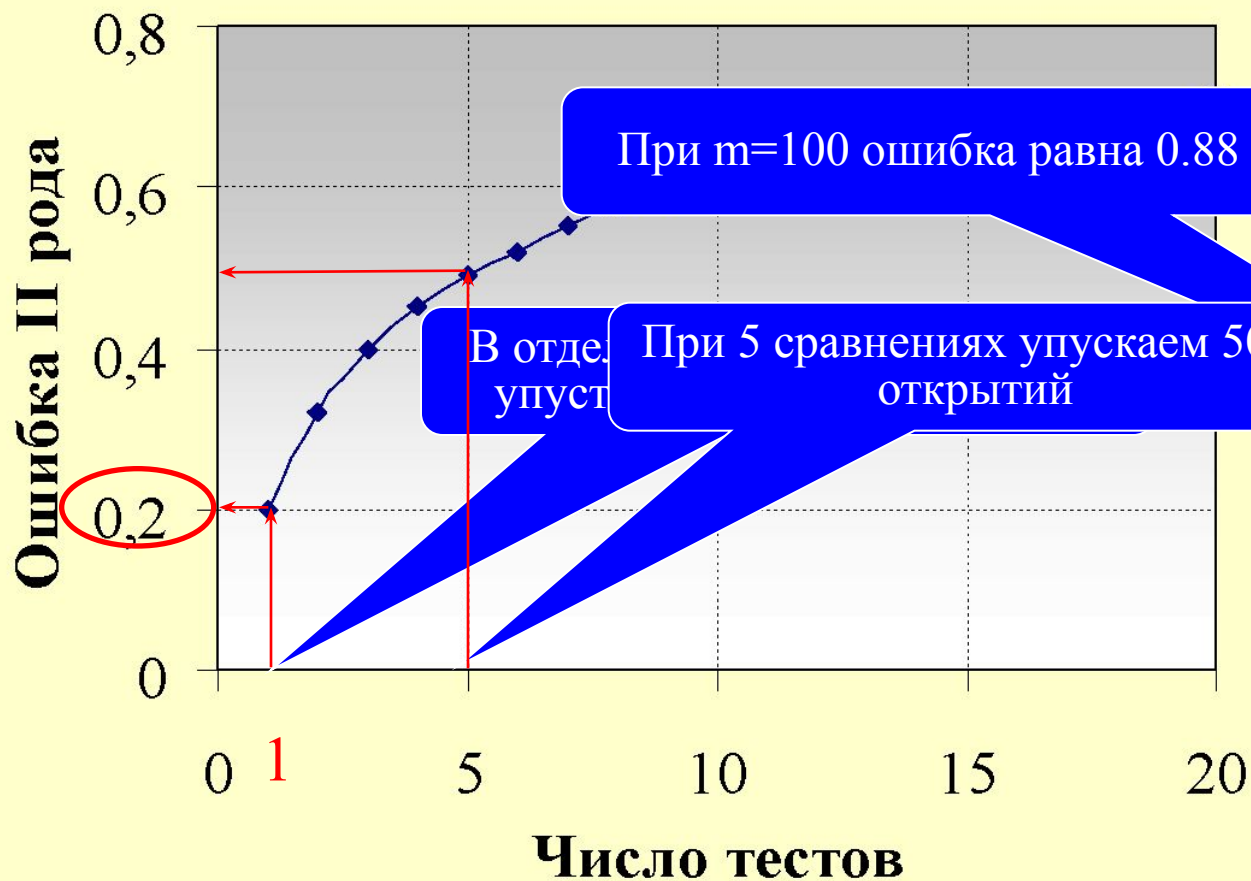
❑ **F**alse **D**iscovery **R**ate control: **FDR** - контроль

❑ **P**ermutation 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	В
1	0,001	0,005	0,005
2	0,0055	0,005	0,010
3	0,015	0,005	0,015
4	0,025	0,005	0,020
5	0,035	0,005	0,025
6	0,045	0,005	0,030
7	0,3	0,005	0,030
8	0,4	0,005	0,030
9	0,5	0,005	0,030
10	0,8	0,005	0,030

Располагаем тесты в порядке увеличения p_i

Значимые различия после коррекции по FDR

В первой клетке p_i втрое больше и т.д.

Поправка Бонферрони оставляет значимым лишь первое сравнение

И это все!!!

Для 6-ого тестирования этого значения

НОСТЬ

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	p-value	
	Case (100)	Control (100)		0,0001	0,000
1	62	26	4,6	0,0001	0,000
2	57	26	2,7	0,009	0,010
3	51	26	2,8	0,011	0,007
4	49	26	1,9	0,023	0,025
5	47	26	1,0	0,071	0,109
6	46	26	1,0	0,096	0,098
7	45	26	1,0	0,103	0,058
8	44	26	1,0	0,120	0,067
9	43	26	1,0	0,571	0,476
10	42	26	1,0	0,911	1,000

Но так бывает не всегда

Значимо по Бонферрони

Совсем маленькая программка

```

simNum = 10000
surDif = Table[0, {Length[frCase]};
Do[1, RandomPermutation[2, volSample];
tot = Join[ill, health];
ill = tot[[take1, volSample];
health = tot[[take2, volSample];
genCase1 = gen[ill];
genControl1 = gen[health];
xiSq = genCase1[[genControl1]]^2 / (genCase1[[genControl1]] - N);
p1 = 1 - ChiSquareDistribution[xiSq];
surDif = surDif + ChiStep[p1];
simp = surDif / simNum; N;
    
```

