Přednáška IX.
Analýza rozptylu (ANOVA)

- Princip a metodika výpočtu
- Předpoklady analýzy rozptylu a jejich ověření
- Rozbor rozdílů jednotlivých skupin – násobné testování hypotéz
- Analýza rozptylu jako lineární model

evropský sociální fond v ČR EVROPSKÁ UNIE MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

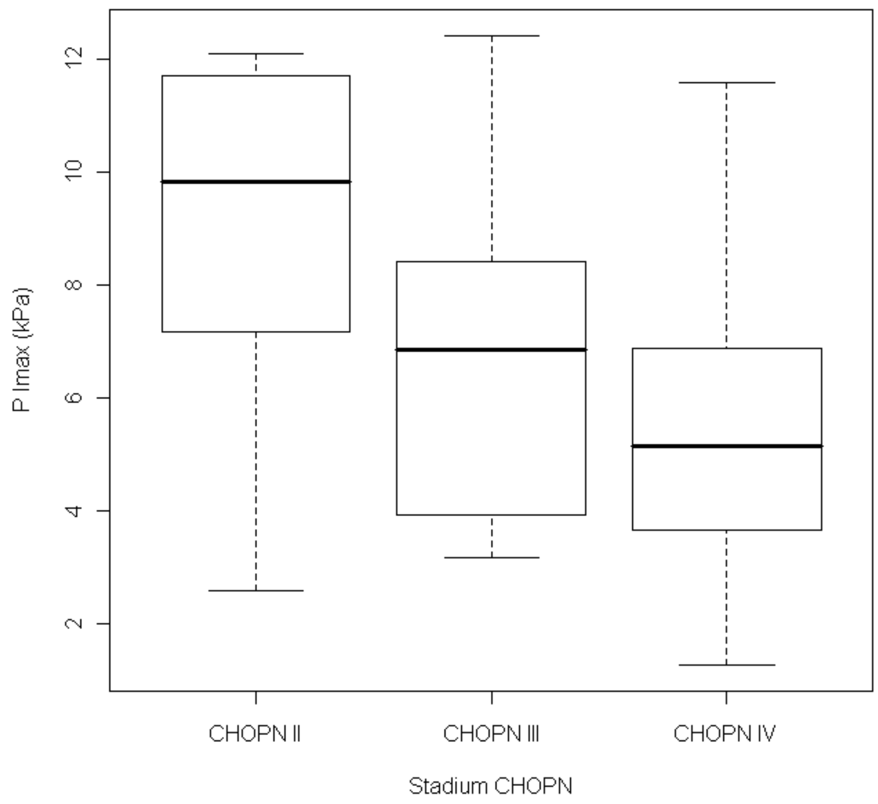
Opakování – parametrické a neparametrické testy

- Jmenujte příklad parametrického a neparametrického testu.
- Znáte jejich předpoklady?

1. Motivace

Příklad – CHOPN

- Sledujeme plicní funkce u pacientů s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) ve stadiu II, III a IV. Zajímá nás, jestli se u pacientů v jednotlivých stadiích liší maximální inspirační tlak (PImax).



Příklad – CHOPN

- Jak můžeme pro CHOPN stadia II, III a IV ověřit rozdíl (resp. rovnost) v maximálním inspiračním tlaku (PImax)?

A. **Můžeme použít vhodný test pro dva výběry (např. *t*-test) a otestovat, jak se liší stadium II od III, II od IV a III od IV – tedy provést 3 testy.**
B. **Musíme použít vhodný test pro více než dvě srovnávané skupiny.**

- V čem je zásadní rozdíl mezi A a B?

Problém násobného testování hypotéz

- **Problém s možností A je v násobném testování hypotéz – pro připomenutí:**
  S narůstajícím počtem testovaných hypotéz nám roste také pravděpodobnost získání falešně pozitivního výsledku, tedy pravděpodobnost toho, že se při našem testování zmýlíme a ukážeme na statisticky významný rozdíl tam, kde ve skutečnosti žádný neexistuje (chyba I. druhu).

- Máme tři testy, v každém 95% pravděpodobnost, že neuděláme chybu I. druhu.
- Pro všechny tři testy to tedy znamená: $0{,}95 \times 0{,}95 \times 0{,}95 = 0{,}857$.
- Pravděpodobnost, že neuděláme chybu I. druhu nám celkově klesla na 0,857.
- Pravděpodobnost, že uděláme chybu I. druhu nám celkově stoupla na 0,143.

Analýza rozptylu

- Lepší volbou je:

B. Musíme použít vhodný test pro více než dvě srovnávané skupiny.

- **Analýza rozptylu (ANOVA = „ANalysis Of VAriance“) je statistickou metodou, která umožňuje testovat rozdíl v průměrech více než dvou skupin. Přitom se jedná o jeden test.**

- Více než dvě skupiny mohou být dány přirozeně (např. sledujeme rozdíl mezi věkovými kategoriemi) nebo uměle (např. sledujeme rozdíl v účinnosti několika typů léčby).

2. Princip výpočtu

Náhodné výběry a hypotéza

- Máme *k* nezávislých realizací náhodného výběru rozsahu: n_1, n_2, … , n_k.

- Předpoklady: $Y_{1j} \sim N(\mu_1, \sigma^2)$

$$Y_{2j} \sim N(\mu_2, \sigma^2)$$

$$\vdots$$

$$Y_{kj} \sim N(\mu_k, \sigma^2)$$

⇒ Normalita hodnot všech *k* výběrů

⇒ Homogenita rozptylů všech *k* výběrů

- Hypotézy: $H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \ldots = \mu_k$

$$H_1 : \text{nejméně jedno } \mu_i \text{ je odlišné od ostatních}$$

Příklady – hypotézy

1. **Liší se účinnost dvou různých dávek léčiva XYZ od placeba?**

   Střední hodnota účinnosti placeba, XYZ v dávce 1 a XYZ v dávce 2: $\mu_P, \mu_{XYZ_1}, \mu_{XYZ_2}$

$$H_0 : \mu_P = \mu_{XYZ_1} = \mu_{XYZ_2}$$

$$H_1 : \text{nejméně jedno } \mu \text{ je odlišné od ostatních}$$

2. **Liší se AML, ALL, CML a CLL v aktivitě vybraných genů?**

   Střední hodnota exprese genu *g* u AML, ALL, CML, CLL: $\theta^g_{AML}, \theta^g_{ALL}, \theta^g_{CML}, \theta^g_{CLL}$

$$H_0 : \theta^g_{AML} = \theta^g_{ALL} = \theta^g_{CML} = \theta^g_{CLL}$$

$$H_1 : \text{nejméně jedno } \theta^g \text{ je odlišné od ostatních}$$

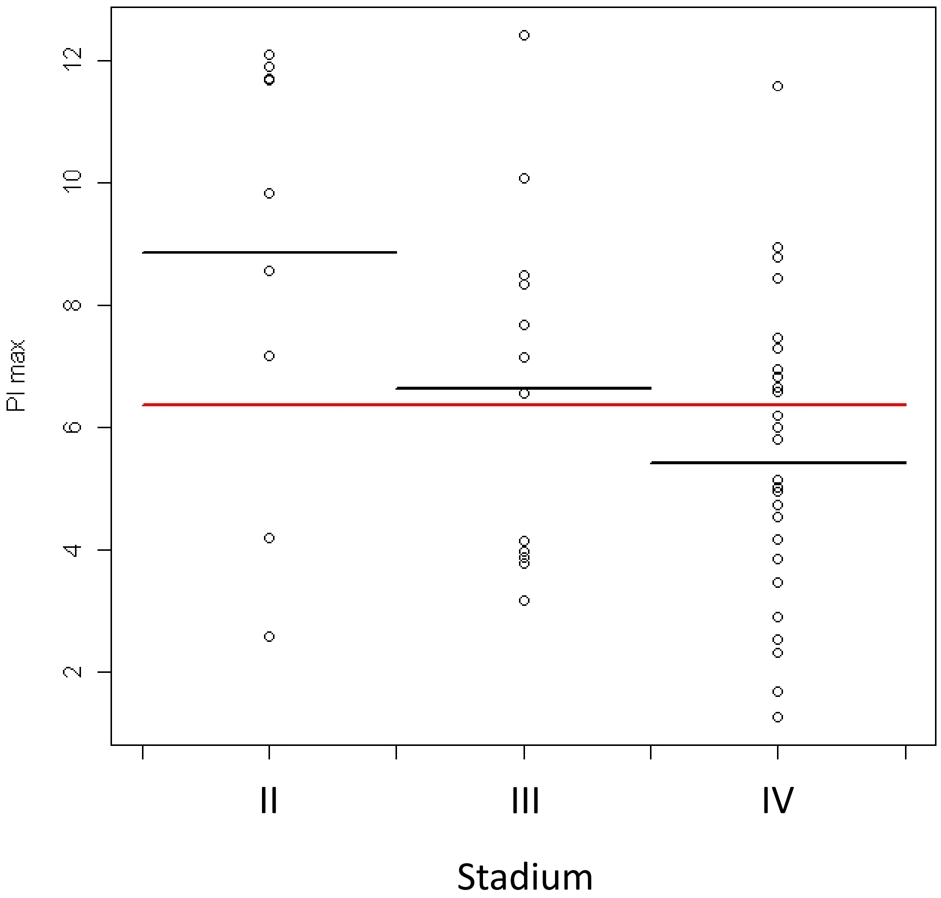
Pozorované hodnoty

Výběr 1	Výběr 2	Výběr 3		Výběr *k*	Všechny výběry
			…		
n_1	n_2	n_3	Rozsah výběru	n_k	n
$\bar{y}_1$	$\bar{y}_2$	$\bar{y}_3$	Výběrový průměr	$\bar{y}_k$	$\bar{y}$
s_1^2	s_2^2	s_3^2	Výběrový rozptyl	s_k^2	s^2

Skupinový průměr
(„population mean“)

Celkový průměr
(„grand mean“)

Příklad – CHOPN



Celkový průměr („grand mean“)

$n_1 = 9$ | $n_2 = 12$ | $n_3 = 27$

$y_1 = 8{,}9\ \text{kPa}$ | $y_2 = 6{,}6\ \text{kPa}$ | $y_3 = 5{,}4\ \text{kPa}$

$s_1 = 3{,}5\ \text{kPa}$ | $s_2 = 2{,}9\ \text{kPa}$ | $s_3 = 2{,}5\ \text{kPa}$

$n = 48$

$y = 6{,}4\ \text{kPa}$

$s = 3{,}0\ \text{kPa}$

Značení

- Součty: $Y_{i\cdot} = \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}$ $\quad Y_{\cdot\cdot} = \sum_{i=1}^{k} \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}$
- Průměry: $\bar{y}_{i\cdot} = Y_{i\cdot} / n_i$ $\quad \bar{y}_{\cdot\cdot} = Y_{\cdot\cdot} / n$

Skupinový průměr („population mean“)

Celkový průměr („grand mean“)

- Celková variabilita v souboru:

$$S_T = \sum_{i=1}^{k} \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{y}_{\cdot\cdot})^2$$

Stupně volnosti: $df_T = n - 1$

- Variabilita v rámci skupin (reziduální součet čtverců):

$$S_e = \sum_{i=1}^{k} \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{y}_{i\cdot})^2$$

Stupně volnosti: $df_e = n - k$

- Variabilita mezi skupinami (příslušná sledovanému vlivu = proměnné):

$$S_A = \sum_{i=1}^{k} n_i (\bar{y}_{i\cdot} - \bar{y}_{\cdot\cdot})^2$$

Stupně volnosti: $df_A = k - 1$

Vztahy mezi odhady variability

- Platí:

$$Y_{ij} - \bar{y}_{..} = (Y_{ij} - \bar{y}_{i.}) + (\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{..})$$

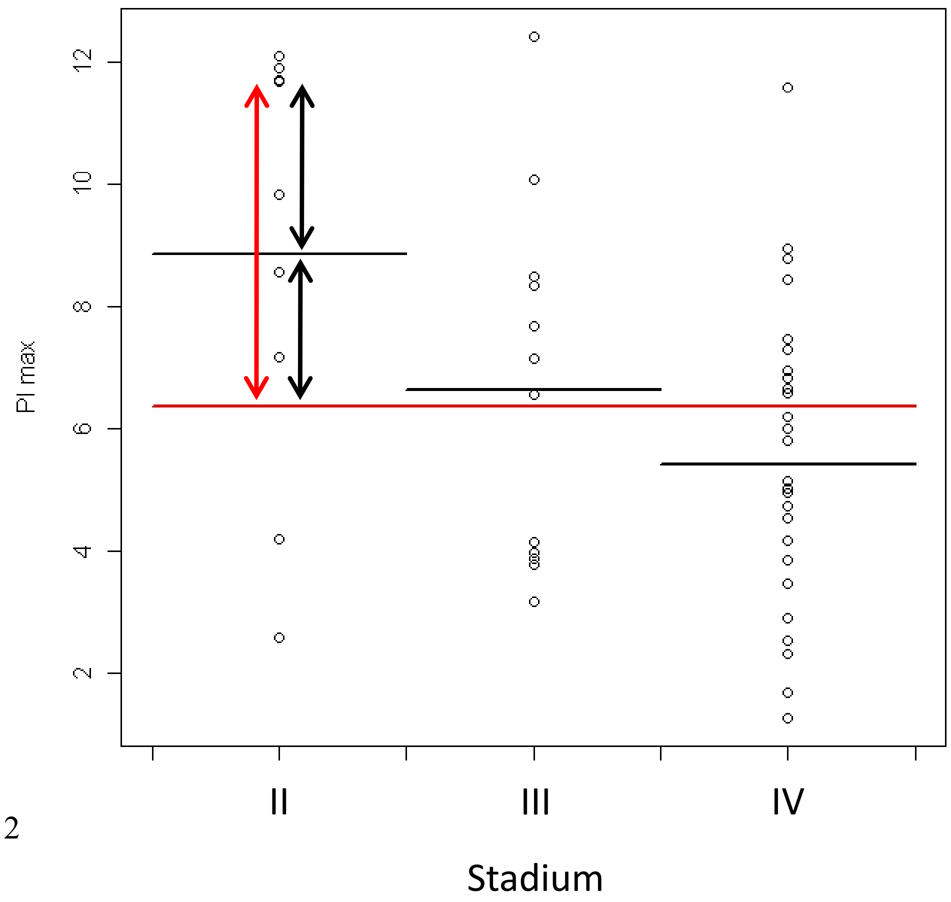
- Dále se dá ukázat, že platí:

$$S_T = S_e + S_A$$

- Tedy platí, že celková variabilita se dá rozložit na variabilitu v rámci skupin a variabilitu mezi skupinami:

$$\sum_{i=1}^{k}\sum_{j=1}^{n_i}(Y_{ij} - \bar{y}_{..})^2 =$$

$$\sum_{i=1}^{k}\sum_{j=1}^{n_i}(Y_{ij} - \bar{y}_{i.})^2 + \sum_{i=1}^{k} n_i(\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{..})^2$$



Umělý příklad

Léčba	Pozorovaná hodnota	Skupinový průměr	Skupinový průměr – celkový průměr	Pozorovaná hodnota – skupinový průměr	Pozorovaná hodnota – celkový průměr
1	10	12	-4	-2	-6
1	12	12	-4	0	-4
1	14	12	-4	2	-2
2	19	20	4	-1	3
2	20	20	4	0	4
2	21	20	4	1	5
3	14	16	0	-2	-2
3	16	16	0	0	0
3	18	16	0	2	2
	Celkový průměr = 16		**Součet čtverců = 96**	**Součet čtverců = 18**	**Součet čtverců = 114**
			Stupně volnosti = 2	**Stupně volnosti = 6**	**Stupně volnosti = 8**

Jak testuje *t*-test pro dva výběry?

- Nulová hypotéza: $H_0 : \mu_1 = \mu_2$
- Testová statistika:

Rozdíl (variabilita) mezi výběry

$$T = \frac{\overline{X} - \overline{Y}}{s_* \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \sim t(n_1 + n_2 - 2)$$

Variabilita uvnitř výběrů

$$\Rightarrow \quad T = \frac{\text{Rozdíl (variabilita) mezi výběry}}{\text{Variabilita uvnitř výběrů}}$$

Princip analýzy rozptylu

- **Princip analýzy rozptylu je stejný, tedy ANOVA srovnává pozorovanou variabilitu mezi výběry s pozorovanou variabilitou uvnitř výběrů.** Na rozdíl od *t*-testu však pracuje s výběrovými rozptyly.

- Testová statistika analýzy rozptylu:

$$F = \frac{\text{Odhad rozptylu založený na výběrových průměrech}}{\text{Odhad rozptylu založený pozorovaných hodnotách}}$$

$$F = \frac{\dfrac{\sum_{i=1}^{k} n_i(\bar{y}_{i\cdot} - \bar{y}_{\cdot\cdot})^2}{k-1}}{\dfrac{\sum_{i=1}^{k}\sum_{j=1}^{n_i}(Y_{ij} - \bar{y}_{i\cdot})^2}{n-k}} = \frac{S_A / df_A}{S_e / df_e}$$

Za platnosti H_0 platí:

$$F \sim F(k-1, n-k)$$

Výsledek dle platnosti nulové hypotézy

- Za předpokladu rovnosti rozptylů jednotlivých výběrů představuje člen ve jmenovateli statistiky *F* výběrový odhad σ^2.
- Za platnosti H_0 představuje i člen v čitateli statistiky *F* výběrový odhad σ^2.

- **Platí-li nulová hypotéza**, **čitatel statistiky *F*** (počítaný na základě výběrových průměrů) **bude zhruba stejný jako její jmenovatel** (počítaný na základě pozorovaných hodnot).
- **Neplatí-li nulová hypotéza, čitatel statistiky *F* bude větší než jmenovatel.**

- Samotné rozhodnutí o platnosti H_0 je tak založeno na srovnání průměrných čtverců S_A / df_A a S_e / df_e.

Výsledek analýzy rozptylu

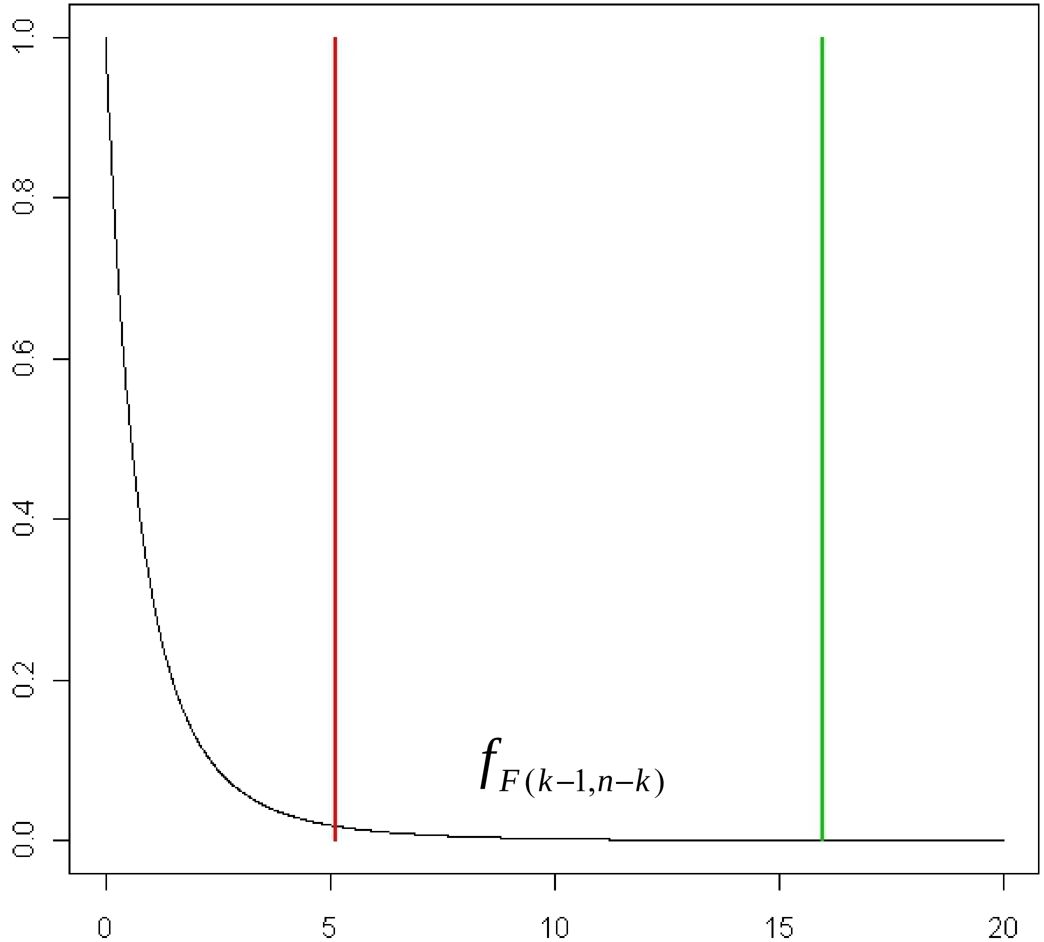
- Výsledné počty se standardně zaznamenávají do tzv. tabulky analýzy rozptylu:

Variabilita	Součet čtverců	Počet stupňů volnosti	Průměrný čtverec	*F* statistika	*p*-hodnota
Mezi skupinami	$S_A = 96$	$df_A = k - 1 = 2$	$MS_A = 48$	$\boldsymbol{F = 16}$	**0,004**
Uvnitř skupin	$S_e = 18$	$df_e = n - k = 6$	$MS_e = 3$		
Celkem	$S_T = 114$	$df_T = n - 1 = 8$			

- Nulovou hypotézu zamítneme/nezamítneme buď na základě srovnání výsledné *p*-hodnoty se zvolenou hladinou významnosti testu α, nebo srovnáním výsledné *F* statistiky s kritickou hodnotou (kvantilem) rozdělení $F(k - 1, n - k)$ příslušnou zvolené hladině významnosti testu α.

Výsledek umělého příkladu

$$F_{1-\alpha}^{(k-1,n-k)} = F_{0,95}^{(2,6)} = 5{,}14 \qquad F = 16$$



Na hladině významnosti α =0,05 zamítáme H_0 o rovnosti středních hodnot.

3. Předpoklady analýzy rozptylu a jejich ověření

Předpoklady analýzy rozptylu

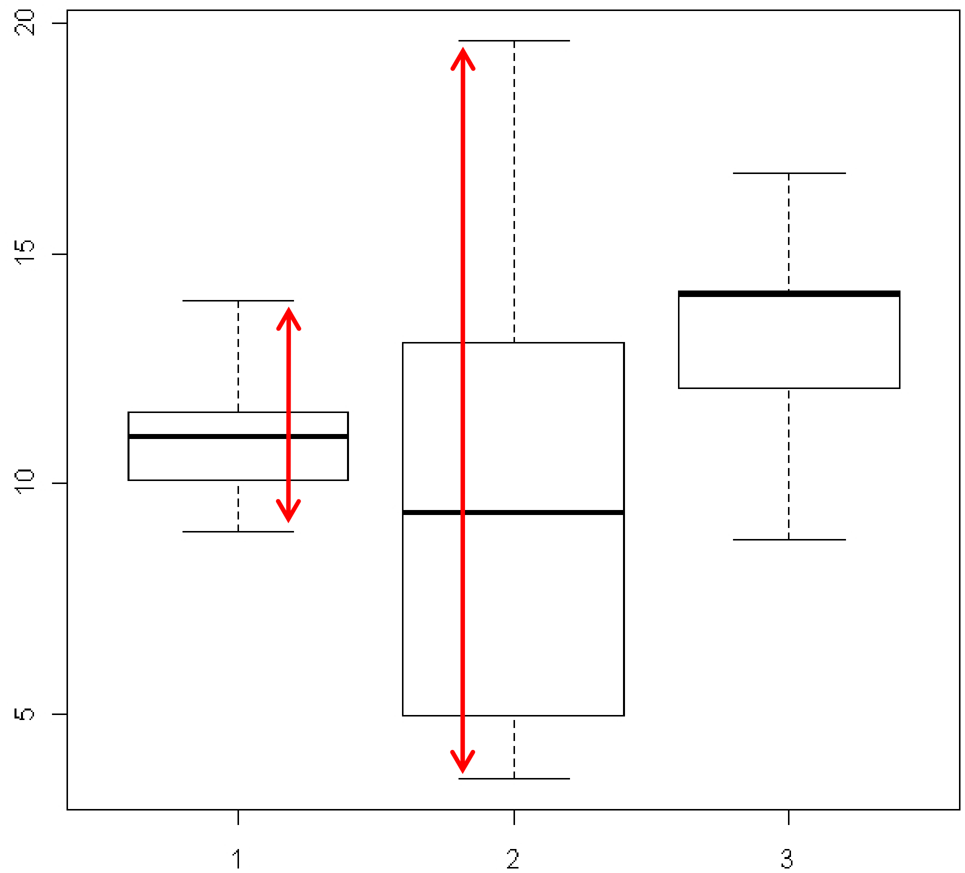
- **Nezávislost jednotlivých pozorování** – sice téměř automatický předpoklad, nicméně je třeba se nad ním alespoň zamyslet.

- **Normalita pozorovaných hodnot obou náhodných výběrů** – velmi silný předpoklad. **Nutno otestovat nebo alespoň graficky ověřit** (histogram, box plot).

- **Stejný rozptyl náhodné veličiny v obou srovnávaných skupinách** – také silný předpoklad. Opět **nutno otestovat nebo alespoň graficky ověřit** (histogram, box plot).

Testování shody rozptylů

- **Grafické ověření** – histogram, box plot.
- **Levenův test** – často používaný, nevyžaduje předpoklad normality původních hodnot.
- **Bartlettův test** – velkou nevýhodou je předpoklad normality původních hodnot.



Levenův test

- Jeho výhoda je, že **nevyžaduje předpoklad normality původních hodnot**.
- Jedná se o analýzu rozptylu na hodnotách $Z_{ij} = |Y_{ij} - \bar{y}_{i\cdot}|$
- Označme $z_{i\cdot} = \frac{1}{n_i}\sum_{j=1}^{n_i} Z_{ij}$ a $z_{\cdot\cdot} = \sum_{i=1}^{k}\sum_{j=1}^{n_i} Z_{ij}$
- Testová statistika: $W = \dfrac{\dfrac{\sum_{i=1}^{k} n_i (z_{i\cdot} - z_{\cdot\cdot})^2}{k-1}}{\dfrac{\sum_{i=1}^{k}\sum_{j=1}^{n_i}(Z_{ij} - z_{i\cdot})^2}{n-k}}$

Při rovnosti rozptylů opět platí:

$$F \sim F(k-1, n-k)$$

- Používá se také jeho robustní varianta s použitím absolutních odchylek od mediánu místo od průměru: $Z_{ij} = |Y_{ij} - \tilde{y}_{i\cdot}|$

Příklad – Levenův test u CHOPN dat

- Sledujeme plicní funkce u pacientů s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) ve stadiu II, III a IV.
- **Levenův test probíhá stejně jako jednoduchá ANOVA** – opět srovnáváme průměrné čtverce – reziduální a příslušné sledovaným faktorům.

Variabilita	Součet čtverců	Počet stupňů volnosti	Průměrný čtverec	*F* statistika	*p*-hodnota
Mezi skupinami	$S_A = 5{,}30$	$df_A = k - 1 = 2$	$MS_A = 2{,}65$	$F = 1{,}13$	0,331
Uvnitř skupin	$S_e = 105{,}35$	$df_e = n - k = 45$	$MS_e = 2{,}34$		
Celkem	$S_T = 110{,}65$	$df_T = n - 1 = 47$			

- Na hladině významnosti α =0,05 nezamítáme H_0 o rovnosti rozptylů.

Hodnocení normality dat

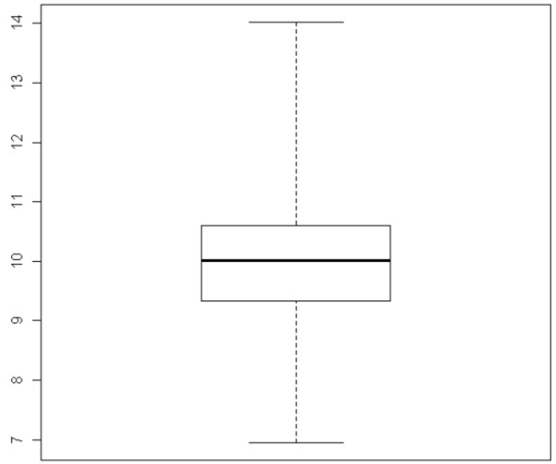
- **Hodnocení normality je klíčovým postupem v biostatistice. Testy nejsou vždy nejlepším nástrojem! Vždy je důležité se podívat i očima!**

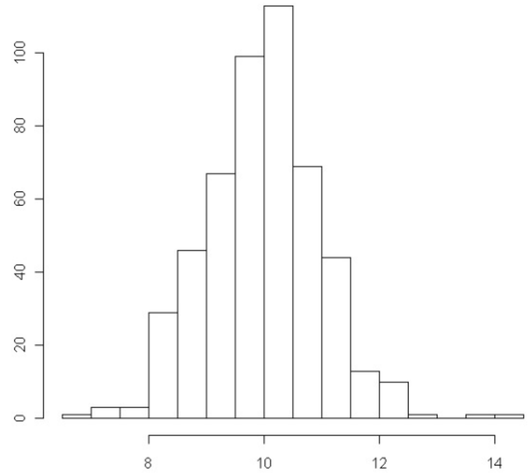
- **Zamítnutí normality rozdělení** neznamená jenom výběr příslušného testu, ALE **může indikovat odlehlé a nelogické hodnoty v souboru dat**.

- Pokud o sledované veličině prokazatelně víme, že v cílové populaci nabývá normální rozdělení (např. výška lidské postavy), ale v daném souboru normální rozdělení nepotvrdíme, pak s naším náhodným výběrem není něco v pořádku – např. není reprezentativní.

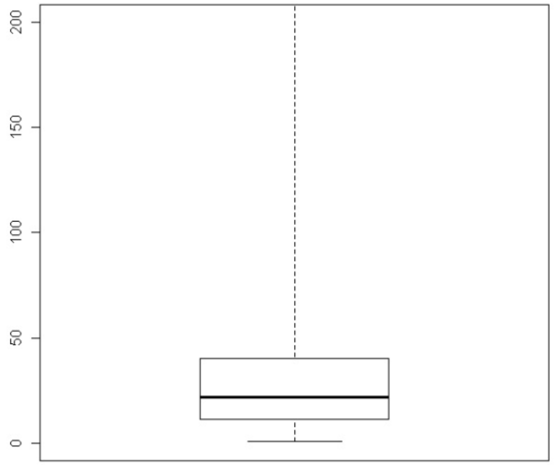
Grafické metody – box plot a histogram

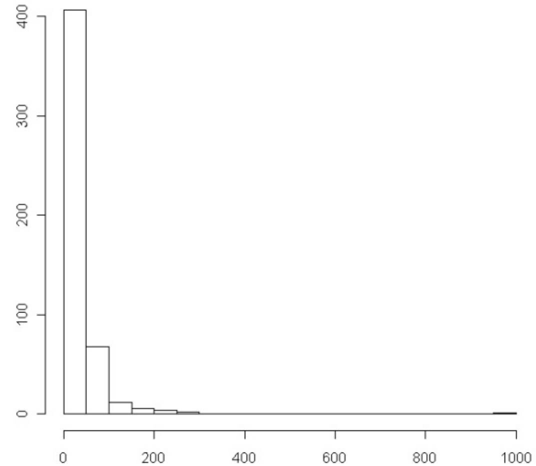
- Normální rozdělení





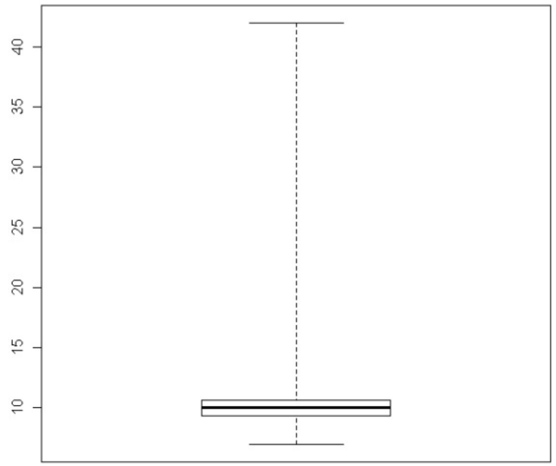
- Log-normální rozdělení

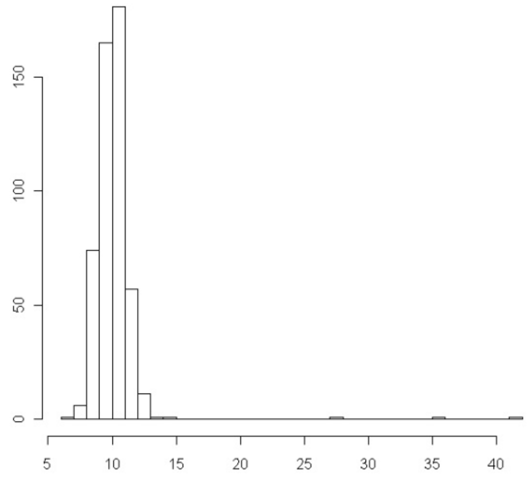




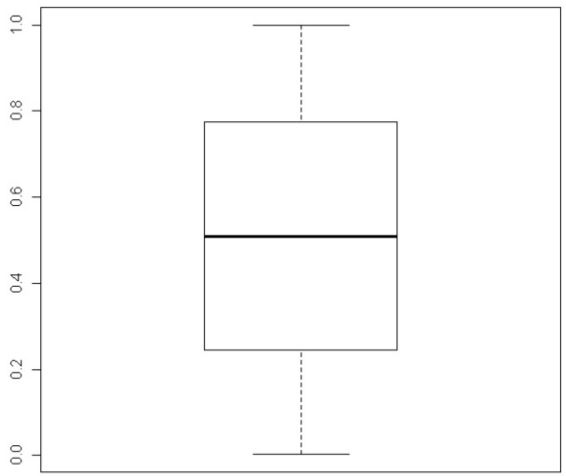
Grafické metody – box plot a histogram

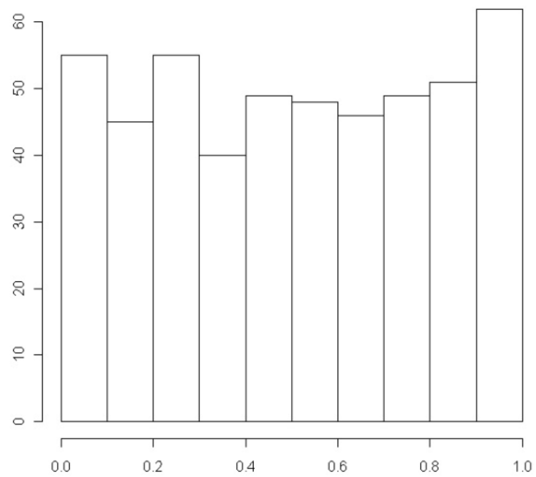
- Normální rozdělení s odlehlými hodnotami





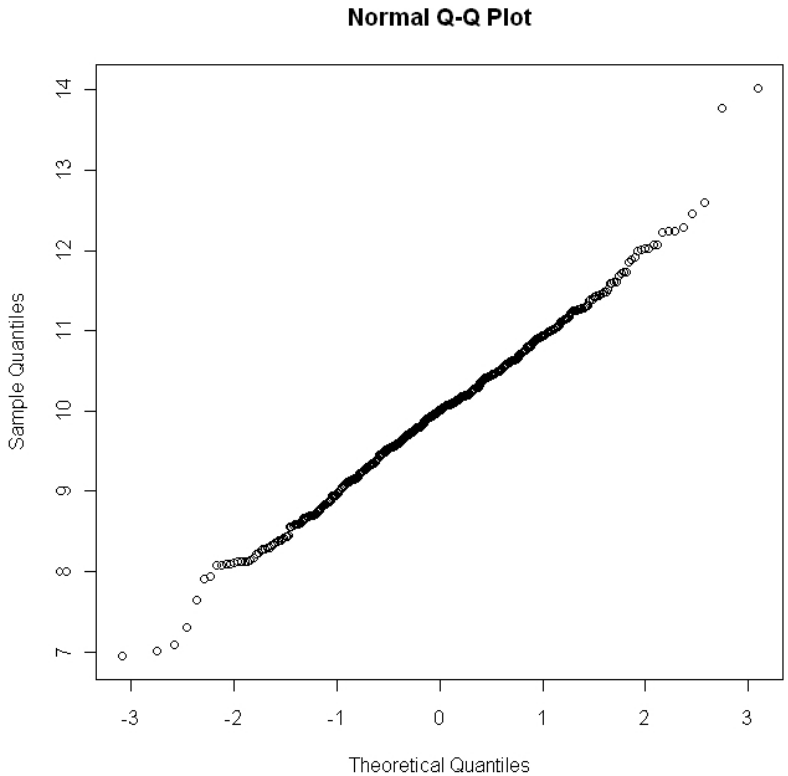
- Rovnoměrně spojité rozdělení





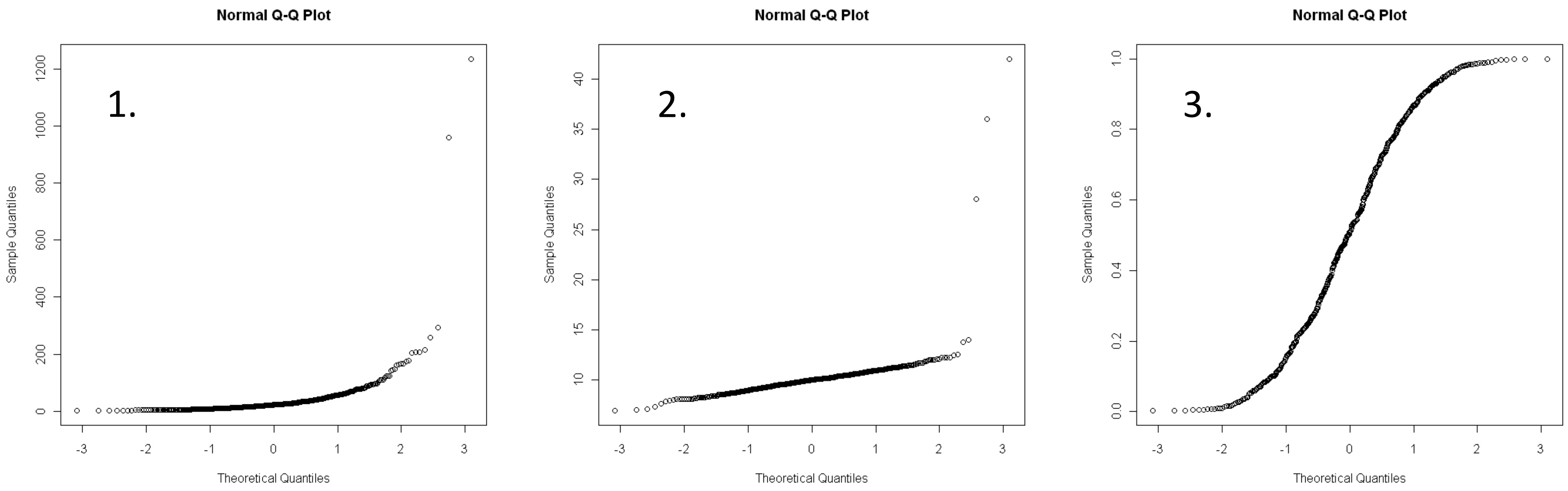
Grafické metody – Q-Q plot

- Q-Q plot proti sobě zobrazuje kvantily pozorovaných hodnot a kvantily teoretického rozdělení pravděpodobnosti (zde normálního rozdělení).
- V případě shody leží všechny body na přímce.
- Normální rozdělení:



Grafické metody – Q-Q plot

1. Log-normální rozdělení:
2. Normální rozdělení s odlehlými hodnotami:
3. Rovnoměrně spojité rozdělení



Testy pro ověření normality dat

- **Shapirův-Wilkův test** – v podstatě se jedná o proložení seřazených hodnot regresní přímkou vzhledem k očekávaným hodnotám normálního rozdělení. Má tedy přímý vztah k Q-Q plotu – vyhodnocuje, jak moc se Q-Q plot liší od ideální přímky. Doporučován pro menší vzorky, může být „moc“ přísný pro velké vzorky.

- **Kolmogorovův-Smirnovovův test** – založen na srovnání výběrové distribuční funkce s teoretickou distribuční funkcí odpovídající normálnímu rozdělení. K-S test hodnotí maximální vzdálenost mezi těmito dvěma distribučními funkcemi. V praxi se používá korekce dle Lillieforse.

Příklad – Shapirův-Wilkův test u CHOPN dat

- Sledujeme plicní funkce u pacientů s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) ve stadiu II, III a IV.

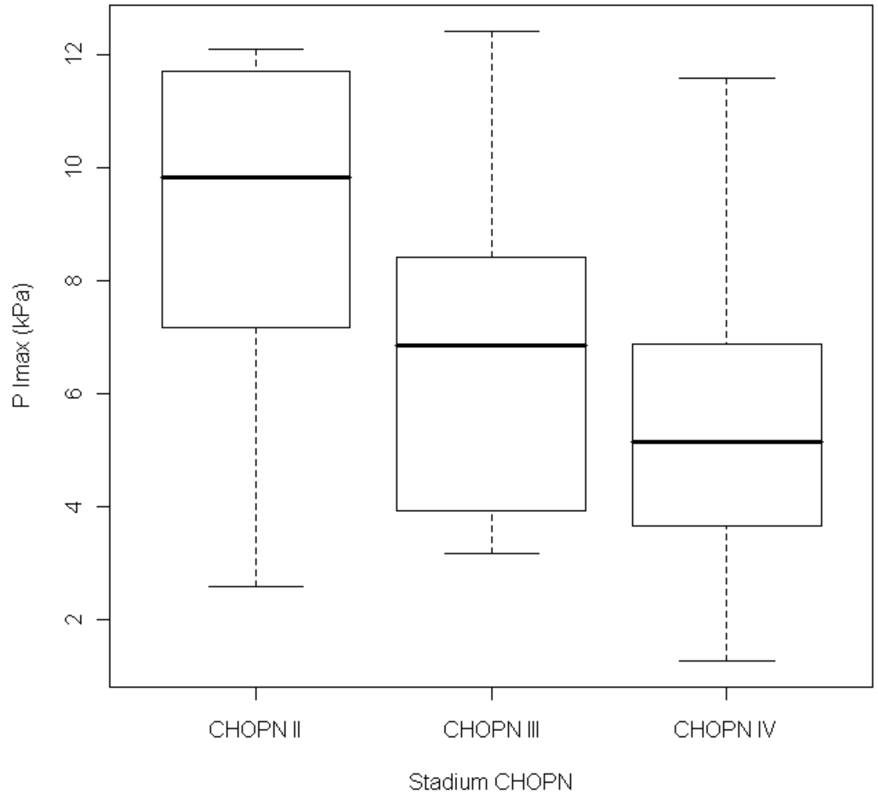
- Test pro všechna stadia:

  p = 0,073 (to nás nezajímá)

- **Stadium II**: p = 0,090
- **Stadium III**: p = 0,247
- **Stadium IV**: p = 0,815

- H_0 o normalitě dat nezamítáme na hladině α =0,05.

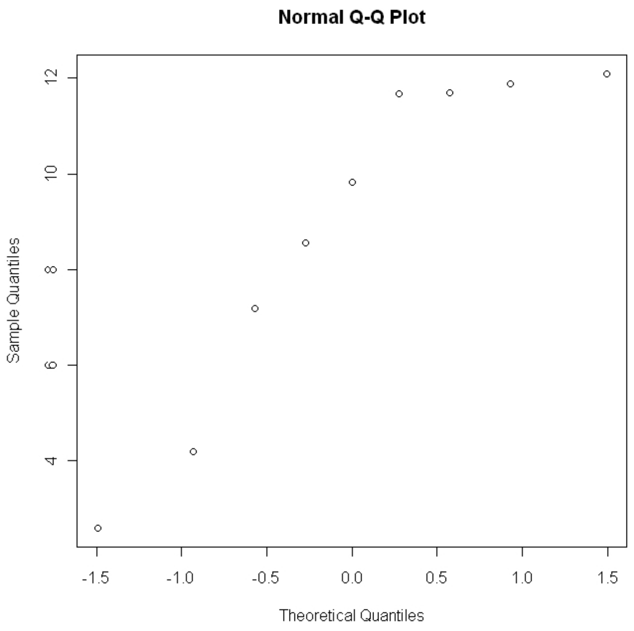
n = 9 *n* = 12 *n* = 27



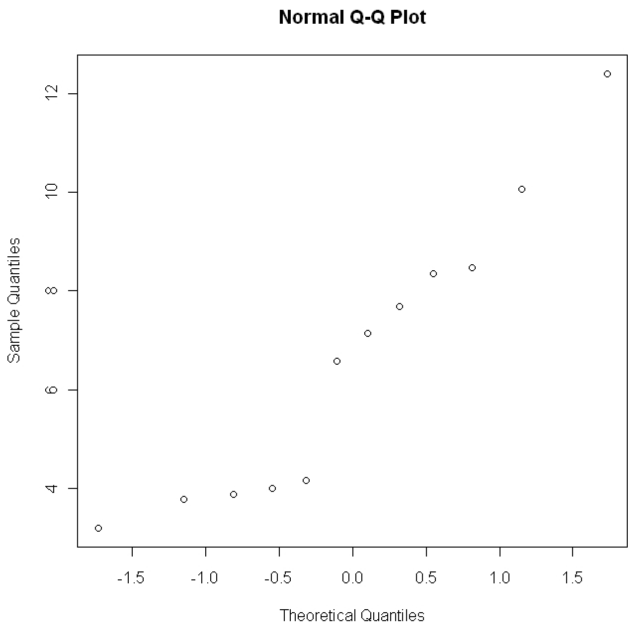
Příklad – Shapirův-Wilkův test u CHOPN dat

- Srovnáme výsledky S-W testu s Q-Q ploty pro jednotlivé kategorie.
- Vzhledem k malým velikostem souborů lze odchylky od normality dat tolerovat.

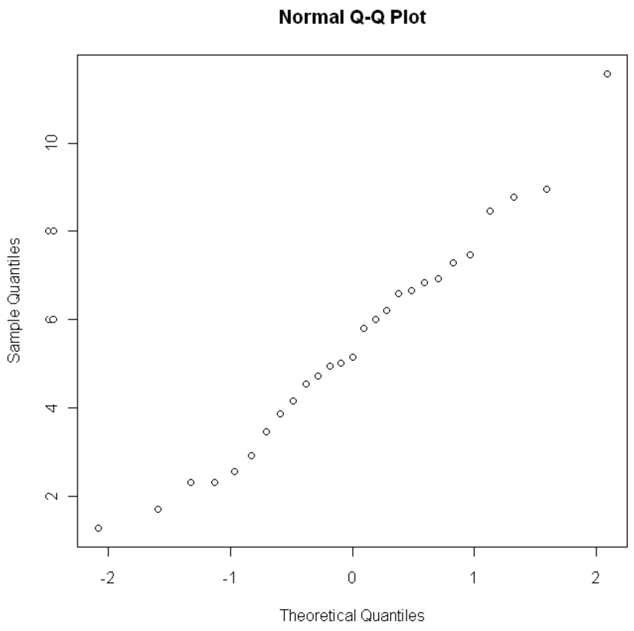
Stadium II (*n* = 9)
***p* = 0,090**



Stadium III (*n* = 12)
***p* = 0,247**



Stadium IV (*n* = 27)
***p* = 0,815**



Příklad – analýza rozptylu u CHOPN dat

- Liší se pacienti s CHOPN (stadium II, III, IV) v maximálním inspiračním tlaku (PImax)?
- **Máme ověřenu homogenitu rozptylů i přibližnou normalitu dat → ANOVA.**

Variabilita	Součet čtverců	Počet stupňů volnosti	Průměrný čtverec	*F* statistika	*p*-hodnota
Mezi skupinami	$S_A = 80{,}54$	$df_A = k - 1 = 2$	$MS_A = 40{,}27$	$F = 5{,}10$	0,010
Uvnitř skupin	$S_e = 355{,}50$	$df_e = n - k = 45$	$MS_e = 7{,}90$		
Celkem	$S_T = 436{,}04$	$df_T = n - 1 = 47$			

- Kritická hodnota pro α =0,05 $F_{(k-1,\, n-k)} = 3{,}20$.
- **Na hladině významnosti α =0,05 zamítáme H_0 o rovnosti středních hodnot.**

Co dělat, když nejsou splněny předpoklady?

- Máme dvě možnosti:

1. **Zkusit data transformovat** – např. logaritmická transformace by měla pomoci s normalizací rozdělení a stabilizací rozptylu u log-normálních dat.
2. **Použít neparametrické testy** – např. Kruskalův-Wallisův test nevyžaduje předpoklad normality, pracuje stejně jako neparametrický Mannův-Whitneyův test.

Kruskalův – Wallisův test

- Jedná se o zobecnění neparametrického Mannova – Whitneyho testu.
- Netestuje shodu parametrů, ale stejné distribuční funkce srovnávaných souborů (klíčový je zde předpoklad nezávislosti pozorovaných dat).

$$H_0 : F(x) = F(y) = F(z) = \ldots$$

- Pro výpočet opět seřadíme všechna pozorování podle velikosti (jako by byly z jednoho vzorku) a přiřadíme jednotlivým hodnotám jejich pořadí.

- **Pointa Kruskalova – Wallisova testu**: za platnosti H_0 jsou spojená data dobře promíchaná a průměrná pořadí v jednotlivých souborech jsou podobná.

Kruskalův – Wallisův test

- Označme T_i součet pořadí v i-té skupině: $T_i = \sum_{j=1}^{n_i} R_{ij}$
- Počet skupin: k, Celkem pozorování: $n = n_1 + n_2 + \ldots + n_k$.
- **Testová statistika**: $$Q = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^{k} \frac{T_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$
- Nulovou hypotézu H_0 zamítáme na hladině významnosti, když je testová statistika větší nebo rovna kritické hodnotě chí-kvadrát rozdělení: $Q \geq \chi^2_{k-1}(\alpha)$
- Pro malé velikosti souboru je třeba srovnat statistiku Q s tabulkami pro Kruskalův-Wallisův test.

4. Násobné testování podskupin

Korekce na násobné srovnání výběrů

- Zamítneme-li analýzou rozptylu nulovou hypotézu o celkové rovnosti středních hodnot, má smysl se ptát, jaké skupiny se od sebe nejvíce liší.
- Toto srovnání lze provést pomocí testů pro dva výběry, ale je nutné korigovat výslednou hladinu významnosti testu, abychom se vyhnuli chybě I. druhu.
- Nejjednodušší metoda: **Bonferroniho procedura -** korekce hladiny významnosti: $\alpha^* = \alpha/m$, kde m je počet provedených testů. Ekvivalentně lze vynásobit p-hodnotu počtem provedených testů. Nevýhodou je, že je konzervativní pro velké m, tedy počet provedených testů.
- Pro analýzu rozptylu: **Tukeyho a Scheffého post hoc testy**.
- Pro neparametrický K-W test: **metoda dle Steela a Dwasse**.

Příklad – korekce u CHOPN dat

- ANOVA na hladině významnosti α =0,05 zamítla H_0 o rovnosti středních hodnot PImax. Jaké skupiny se od sebe nejvíce liší?

- **Bonferroniho procedura**

Stadium	III	IV
II	0,398	0,009
III	-	0,571

- **Tukeyho post hoc test**

Stadium	III	IV
II	0,186	0,008
III	-	0,433

- **Schefféo post hoc test**

Stadium	III	IV
II	0,214	0,011
III	-	0,466

- Zde nám všechny tři analýzy vyšly stejně, ale obecně to neplatí!

Poděkování…

Rozvoj studijního oboru „Matematická biologie“ PřF MU Brno je finančně podporován prostředky projektu ESF č. CZ.1.07/2.2.00/07.0318 „Víceoborová inovace studia Matematické biologie“ a státním rozpočtem České republiky

evropský sociální fond v ČR EVROPSKÁ UNIE MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ