

## ANALIZA WARIANCJI - KLASYFIKACJA WIELOCZYNNIKOWA

Na poprzednich zajęciach omawialiśmy testy dla weryfikacji hipotez, że kilka średnich dla analizowanej zmiennej grupującej mają jednakowe wartości średnie. Co jednak zrobić, gdy tych zmiennych grupujących jest więcej? W wielu eksperymentach medycznych branych jest pod uwagę kilka czynników grupujących. Przypuśćmy, że badając trzy leki w leczeniu pewnej choroby u psów, rozważamy dodatkowy czynnik grupujący płć. Dane do takiego dwuczynnikowego eksperymentu zapisujemy w postaci trzech kolumn. Pierwsza kolumna zawiera pomiary symptomów sygnalizujących natężenie choroby, a pozostałe dwie kolumny zawierają czynniki grupujące związane z rodzajem podawanego leku i płcią pacjenta. Wówczas różnice między średnimi wynikają zarówno z zastosowania różnych środków farmakologicznych jak i różnicy płci. Przy takim eksperymencie całkowitą zmienność (sumę kwadratów odchyłeń) możemy rozdzielić, na co najmniej trzy składniki:

- Zmienność spowodowaną czynnikiem płć
- Zmienność spowodowaną zastosowaniem konkretnego leku
- Zmienność spowodowaną błędem (zmienność wewnątrz grupowa)

Zauważmy, że istnieje jeszcze jedno dodatkowe źródło zmienności - **interakcja**, czyli oddziaływanie łączne. Mówi nam ona, w jakim stopniu wpływ jednego czynnika zależy od poziomu drugiego czynnika. Jeżeli pozostaje on taki sam, to nie ma żadnej interakcji. W przeciwnym wypadku między dwoma czynnikami zachodzi interakcja. Przyjmijmy, że jeden lek daje lepsze terapeutyczne wyniki niż pozostałe. Jeżeli tak jest równocześnie dla samców i samic (niezależnie od płci) to nie ma interakcji. Jeżeli jednak jeden lek daje lepsze wyniki dla samic a inny dla samców, to możemy mówić o wystąpieniu interakcji między tymi dwoma czynnikami (rodzajem leku a płcią). Możliwość wykrywania istotnych interakcji i w związku z tym bardziej złożonych hipotez na temat otaczającej nas rzeczywistości czyni z analizy wariacji wieloczynnikowej bardzo uniwersalne narzędzie. Przy zastosowaniu testu t nie otrzymalibyśmy identycznych rezultatów.

### WIELOCZYNNIKOWA ANALIZA WARIANCJI W PAKIECIE *STATISTICA*

Poniższy przykład pokaże jak w programie *STATISTICA* przeprowadzić dwuczynnikową analizę wariacji. Dane musimy mieć wpisane w postaci trzech zmiennych (kolumn). Pierwsza kolumna zawiera wyniki pomiarów, druga kolumna zawiera kody (wartości) pierwszej zmiennej grupującej a trzecia zawiera kody (wartości) drugiej zmiennej grupującej. Przykładowo analizujemy czas choroby w zależności od rodzaju stosowanego leku i metody leczenia. Chorym zwierzętom podawano 3 różne leki symbolicznie oznaczone przez lek1, lek2 oraz lek3. W trakcie leczenia zastosowano też dwie metody leczenia oznaczone symbolicznie przez a i b. Arkusz danych dla naszego przykładu pokazany jest rysunku 1.

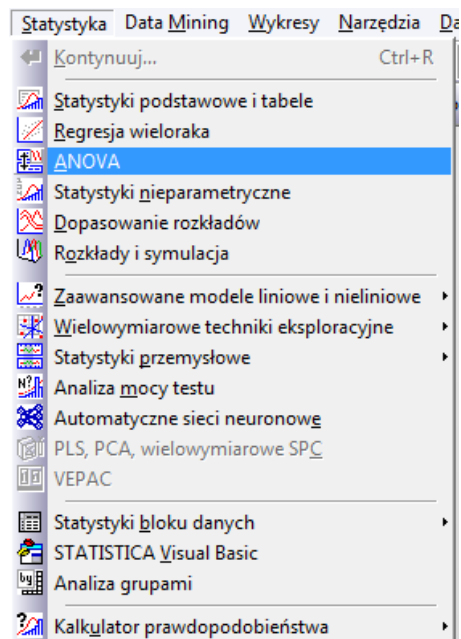
W trakcie analizy chcielibyśmy uzyskać odpowiedź na następujące pytania:

1. Czy występują istotne różnice w przeciętnym czasie leczenia wynikające z zastosowania różnych leków?
2. Czy występują istotne różnice w przeciętnym czasie leczenia wynikające z zastosowania różnych metod leczenia?
3. Czy między czynnikami „rodzaj leku” i „metoda leczenia” występuje pewne wzajemne oddziaływanie zwane interakcją?

	1	2	3
	CZAS_Z	LEK1	METOD
1	25,8	1	a
2	23,5	1	a
3	20,5	1	a
4	25,5	1	a
5	23,8	1	a
6	18,0	1	b
7	16,0	1	b
8	14,0	1	b
9	15,0	1	b
10	15,8	1	b
11	24,0	2	a
12	20,0	2	a
13	16,0	2	a
14	21,0	2	a
15	20,3	2	a
16	18,0	2	b
17	14,0	2	b
18	10,0	2	b
19	15,0	2	b
20	14,3	2	b
21	14,0	3	a
22	12,0	3	a
23	10,0	3	a
24	11,0	3	a
25	11,8	3	a
26	27,0	3	b
27	19,5	3	b
28	16,0	3	b
29	17,0	3	b
30	24,5	3	b

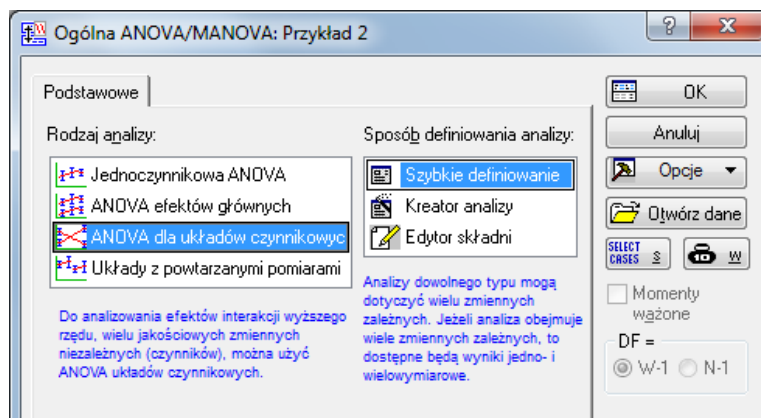
Rys 1 Arkusz danych do analizowanego przykładu

W programie *STATISTICA* do przeprowadzenia wieloczynnikowej analizy wariancji służy bardzo rozbudowany moduł **ANOVA**. W celu przeprowadzenia analizy z menu **Statystyka** wybieramy opcję **ANOVA**.



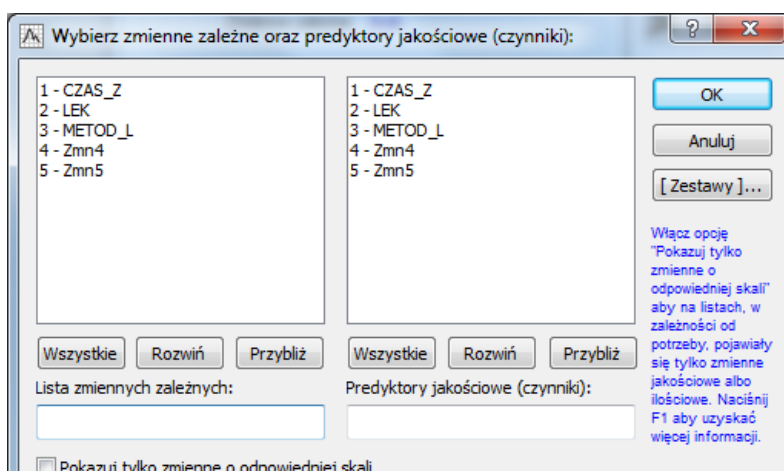
Rys 2 Rozwijalne menu Statystyka

Następnie w otwartym oknie Ogólna ANOVA?MANOVA wybieramy opcję **ANOVA dla układów czynnikowych** (rysunek poniżej) a następnie klikamy **OK**.



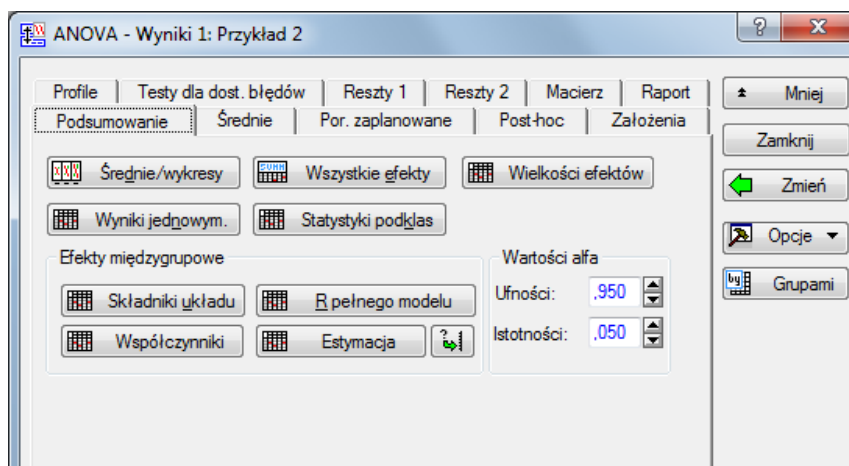
Rys 3 Okno wyboru wieloczynnikowej analizy wariancji

W otwierającym się oknie ANOVA/MANOVA klikamy przycisk **Zmienne** dla określenia odpowiednich zmiennych. Jako zmienną zależną wybieramy zmienną CZAS\_Z, a jako zmienne grupujące zmienne LEK i METODA. Klikając na przycisk **OK** kończymy wybór zmiennych. Opisana sytuacja pokazana jest na poniższym rysunku



Rys 4 Okno wyboru zmiennych do analizy wariancji

Kolejno klikamy przycisk **OK** a następnie **Więcej wyników**, aby otrzymać okno z opcjami umożliwiającym przeprowadzenie różnych analiz. Okno to pokazane jest na poniższym rysunku. W otwartym oknie **Statystyki w grupach** przechodzimy na kartę **Testy ANOVA** zawierająca interesujące nas analizy i opcje.



Rys 5 Okno wyboru opcji dla przeprowadzenia analizy wariancji

Na karcie **Założenia** możemy za pomocą opcji **Test Levene’a** zweryfikować założenie o jednorodności wariancji. Natomiast za pomocą opcji **Normalności** możemy wzrokowo ocenić założenie normalności w każdej grupie.

Po kliknięciu przycisku **Wszystkie efekty** otrzymamy następujący arkusz wyników:

Jednowymiarowe testy istotności dla CZAS_Z (					
Parametryzacja z sigma-ograniczeniami					
Dekompozycja efektywnych hipotez					
Efekt	SS	Stopnie swobody	MS	F	p
Wyraz wolny	9480,296	1	9480,296	1183,952	0,000000
LEK	65,605	2	32,802	4,097	0,029470
METOD_L	21,000	1	21,000	2,623	0,118417
LEK*METOD_L	435,713	2	217,856	27,207	0,000001
Błąd	192,176	24	8,007		

[1] [2] [3] [4] [5] [6]

Rys. 6 Arkusz wyników analizy wariancji

W powyższym oknie wyników mamy następujące wartości liczbowe:

[1] - nazwy analizowanych efektów

[4] – średnia suma kwadratów efektów

[2] - suma kwadratów efektów

[5] - wartość testu F

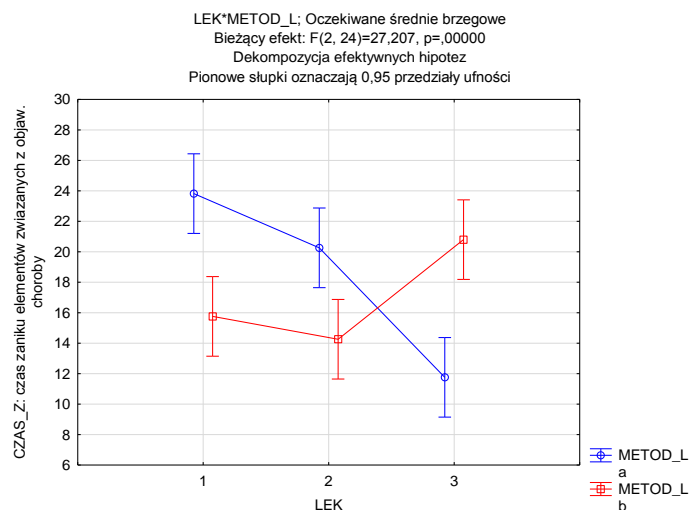
[3] - liczba stopni efektów

[6] - poziom prawdopodobieństwa p

Jak wiemy istotą analizy wariancji jest rozbicie zmienności na addytywne składniki (których liczba wynika z potrzeb eksperymentu). Porównanie poszczególnej wariancji wynikającej z działania danego czynnika oraz tzw. wariancji błędu, czyli wariancji mierzącej losowy błąd daje odpowiedź, czy dany czynnik odgrywa istotną rolę w kształtowaniu się wyników eksperymentu. Porównując testem F wariancję danego efektu z wariancją błędu (wewnątrz grupowa) rozstrzygamy, czy średnie grupowe rozpatrywanego efektu różnią się istotnie od siebie czy nie. Jeśli podział na grupy przebiega ze względu na różne poziomy badanych czynników, to możemy w ten sposób wykryć istotny wpływ poziomu tych czynników na efekt wartości badanej zmiennej. Analizując otrzymany arkusz wyników zauważamy:

- Istotny ( $p = 0,0294$ ) wpływ podawanego leku (2 wiersza w arkuszu). Oznacza to, że rodzaj podawanego leku istotnie różnicuje średnie czasy choroby.
- Nieistotny ( $p = 0,1184$ ) wpływ metody leczenia (3 wiersza w arkuszu). Oznacza to, że stosowane metody leczenia nie różnicują istotnie średnie czasy choroby.
- Istotną ( $p = 0,000001$ ) interakcję (4 wiersz w arkuszu). Oznacza to, że wpływ podawanego leku zależy od zastosowanej metody leczenia.

Dla otrzymania interpretacji graficznej klikamy na przycisku **Średnie/Wykresy** i dla przykładu wywołujemy wykres interakcji (pokazany na rysunku 7). Otrzymany wykres potwierdza istotność interakcji. Jak widzimy efekty leku 3 zależą od zastosowanej metody. Lek 3 daje dobre wyniki tylko z metodą „A” (kolor niebieski). Zastosowanie go z metodą „b” (kolor czerwony) daje gorsze wyniki – istotnie dłuższy czas choroby.



Rys. 7 Interpretacja graficzna efektu interakcji

Jeżeli analiza wariancji nie pokaże istotności różnic między rozpatrywanymi średnimi, nie przeprowadza się już dalszych testów. Natomiast, kiedy hipoteza zerowa zostanie odrzucona powstaje pytanie, które z porównywanych średnich populacji są odpowiedzialne za odrzucenie hipotezy zerowej. Chcemy wiedzieć, które z  $k$  średnich różnią się między sobą, a które nie. Musimy wtedy (jak w jednoczynnikowej analizie) przeprowadzić dokładniejsze badania różnic między średnimi z poszczególnych grup. Wykorzystujemy do tego celu specjalne testy post-hoc zwane też testami wielokrotnych porównań.

Dla danych z naszego przykładu okazało się, że nie wszystkie średnie związane z rodzajem leku są równe. Chcemy wiedzieć, które z analizowanych średnich różnią się istotnie między sobą. Do porównań szczegółowych wykorzystujemy testy post-hoc.

Dla przeprowadzenia testów po fakcie przechodzimy na kartę **Post – hoc** i wybieramy **Test Tukeya (HSD)**. Otrzymany arkusz wyników pokazuje poniższy rysunek.

Test HSD Tukeya; zmienna CZA				
Przybliżone prawdopodobieństw				
Błąd: MS międzygrupowe = 8,00				
Nr podkl.	LEK	{1}	{2}	{3}
1	1	19,790	17,260	0,027582
2	2	0,134172		0,722075
3	3	0,027582	0,722075	

Rys. 8 Arkusz wyników testu Tukeya

Otrzymujemy następujące wyniki:

- Średnia dla leku 1 różni się istotnie od średniej dla leku 3 ( $p = 0,027582$ )
- Średnie dla pozostałych porównań nie różnią się istotnie (wartości  $p$  są większe od 0,05)

Podobnie należy przeprowadzić szczegółowe porównania dla efektów interakcji.

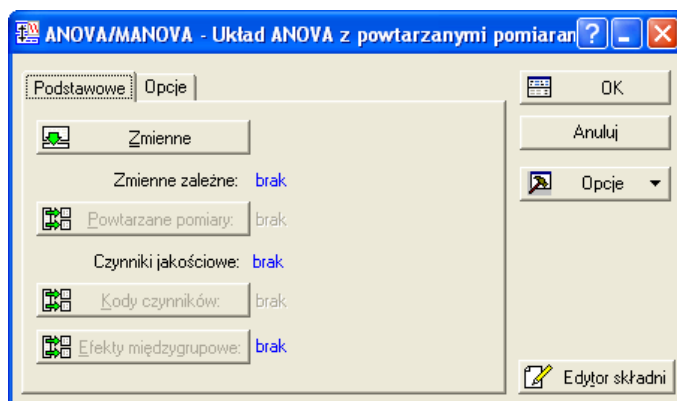
### Analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami

W dotychczas prezentowanych eksperymentach jednemu zwierzęciu przyporządkowaliśmy, losowo wybrany tylko jeden poziom czynnika grupującego lub w przypadku eksperymentu wieloczynnikowego jedną kombinację poziomów czynników. Jednak w wielu badaniach medycznych bardzo często zachodzi potrzeba zastosowania tego samego testu w stosunku do tych samych obiektów (najczęściej zwierząt) po upływie pewnego czasu lub w innych warunkach eksperymentalnych. Interesują nas wtedy różnice występujące w obrębie tych samych zwierząt, np. zmiany poziomu glukozy w czasie lub zmiany cholesterolu pod wpływem działania leku. W eksperymentach tych dokonujemy pomiaru reakcji jednego zwierzęcia na  $k$

poziomach pewnego czynnika. Eksperymenty tego typu nazywamy eksperymentami z powtarzanymi pomiarami. Mogą one być jednoczynnikowe lub wieloczynnikowe. Najprostszy eksperyment tego typu to badanie tego samego zwierzaka w dwóch różnych warunkach eksperymentalnych. Przykładowo możemy badać cholesterol przed i po zażyciu leku obniżającego poziom cholesterolu we krwi. Poniższe przykład pokaże jak w programie *STATISTICA* przeprowadzić analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami.

Prezentowane w poniższym przykładzie dane pochodzą z badań nad efektami nowej antynowotworowej. Redukcję poziomu leukocytów oceniano w czterech różnych punktach czasowych: w momencie rekrutacji do eksperymentu, na początku terapii, po przebytej terapii oraz 3 miesiące po terapii. Dane powinny być tak wprowadzone, aby każdy z powtarzanych pomiarów był umieszczony w odrębnej zmiennej.

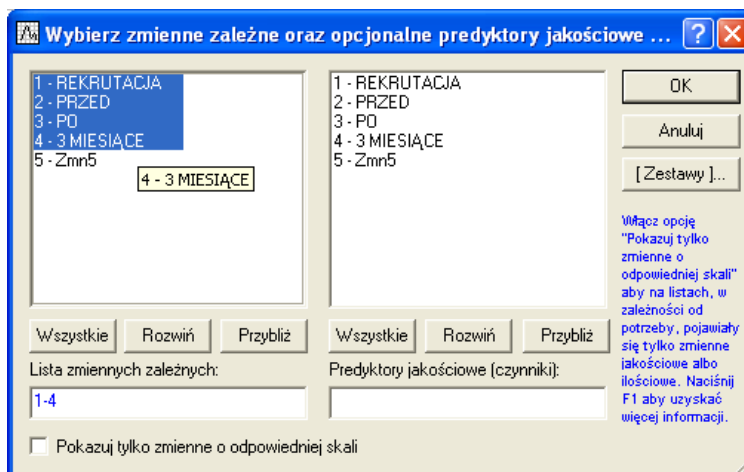
W programie *STATISTICA* analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami możemy wywołać za pomocą opcji **ANOVA** z menu **Statystyka**. Po ojej wybraniu otwiera się okno **Ogólna ANOVA/MANOVA** wspomiane w poprzednim przykładzie. W oknie tym wybieramy opcję **Układy z powtarzanymi pomiarami** a następnie klikamy przycisk **OK**, aby przejść do okna **ANOVA/MANOVA - Układy z powtarzanymi pomiarami** rozpoczynającego analizę powtarzanych pomiarów. Okno to pokazane jest na poniższym rysunku.



Rys. 9 Okno wyboru opcji w analizie powtarzanych pomiarów

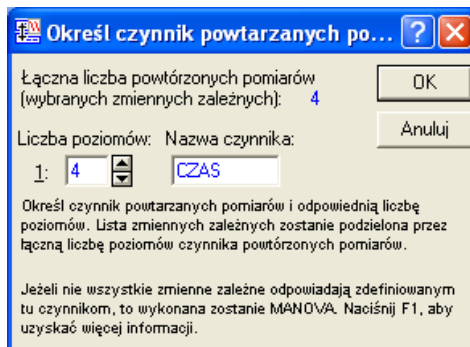
Okno to umożliwia wybranie zmiennych, definiowanie czynników powtarzanych pomiarów oraz ustawienie specjalistycznych opcji związanych z analizą powtarzanych pomiarów.

Klikając przycisk **Zmienne** otwieramy okno **Wybierz zmienne zależne oraz opcjonalne predyktory jakościowe**, w którym wybieramy zmienne zależne (powtarzane pomiary) oraz jeden lub kilku predyktorów jakościowych. W naszym przykładzie wybieramy tylko w lewym oknie cztery powtarzane pomiary. Właściwy wybór danych dla naszego przykładu pokazuje okno na rysunku 10.



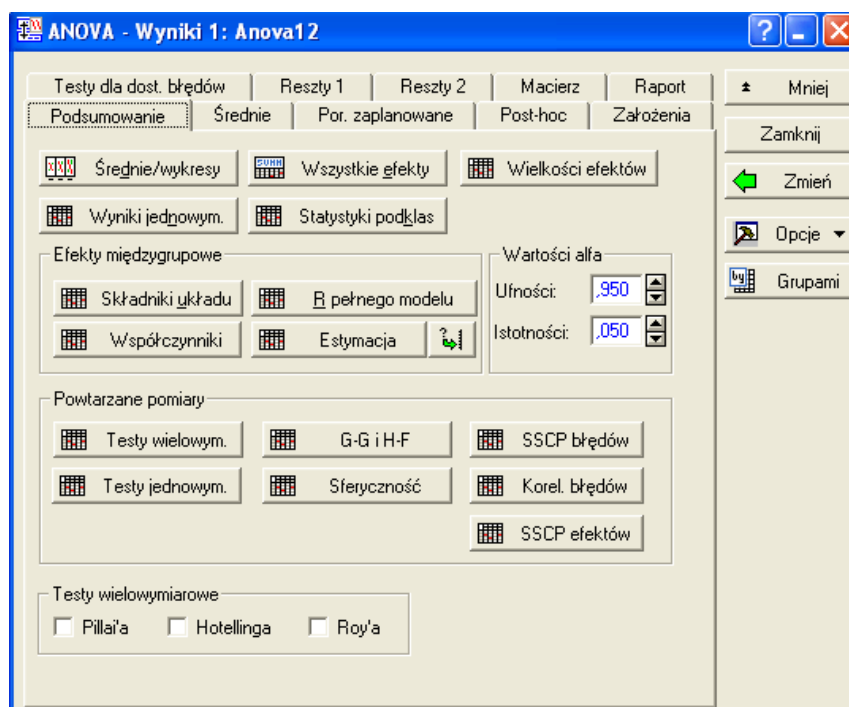
Rys.10. Okno wyboru zmiennych

Klikając przycisk **Powtarzane pomiary** otwieramy okno **Określ czynniki powtarzanych pomiarów**, w którym dla określenia czynnika powtarzanych pomiarów, wprowadzamy etykietę oraz liczbę poziomów czynnika. Zmienne wybrane na liście zmiennej zależnej (lewe okno) program potraktuje jako poziomy czynników powtarzanych pomiarów. Wynika stąd, że liczba zmiennych zależnych musi być podzielna przez liczbę czynników powtarzanych pomiarów. W naszym przykładzie wprowadzamy 4 jako liczbę poziomów oraz CZAS w charakterze nazwy czynnika powtarzanych pomiarów. Sytuacja ta przedstawiona jest na poniższym rysunku.



Rys. 11. Okno umożliwiające określenie czynników powtarzanych pomiarów

Po wybraniu zmiennych i określeniu czynników powtarzanych pomiarów klikamy OK, aby rozpocząć analizę. Na ekranie pojawi się okno dialogowe ANOVA - Wyniki 1. Klikamy następnie przycisk Więcej wyników w celu uzyskania dostępu do większej liczby opcji i statystyk związanych z bieżącą analizą. Otrzymane okno dialogowe widoczne jest na poniższym rysunku.



Rys. 12 Okno ANOVA - Wyniki

Zacniemy od sprawdzenia nowego założenia sferyczności. Przycisk **Sferyczność** przywołuje na ekran arkusz wyników z rezultatami testu sferyczności Mauchleya. Test ten, jak wspomniano we wstępie, służy do oceny hipotezy mówiącej, że założenie sferyczności jest spełnione. Jeśli test okaże się istotny wtedy odrzucamy hipotezę zerową i stwierdzamy, że podejście jednowymiarowe do ANOVA z powtarzaniem pomiarów może generować niepoprawne rezultaty. Wówczas obliczamy wielowymiarowe statystyki dla powtarzanych

pomiarów. Arkusz wyników testu sferyczności dla naszych danych widoczny jest na poniższym rysunku.

Test sferyczności Mauchleya (Parametryzacja z sigma-ograniczeniami, Dekompozycja efektywnych hipotez)				
Efekt	W	Chi-kw.	df	p
CZAS	0,456996	9,962527	5	0,076304

Rys. 13. Arkusz wyników testu Mauchleya

Jak pokazuje arkusz wartość testu W jest równa 0,70 a związany z nią poziom prawdopodobieństwa  $p = 0,531362$ . Tym samym możemy przyjąć, że dla danych z naszego przykładu spełnione jest założenie sferyczności. Pokazaliśmy tu szczegółowo jak sprawdzić dodatkowe założenie o sferyczności wymagane przy analizie powtarzanych pomiarów. Pozostałe poznane już wcześniej założenia (normalność, jednorodność wariancji) możemy sprawdzić wykorzystując opcje dostępne na karcie **Założenia**.

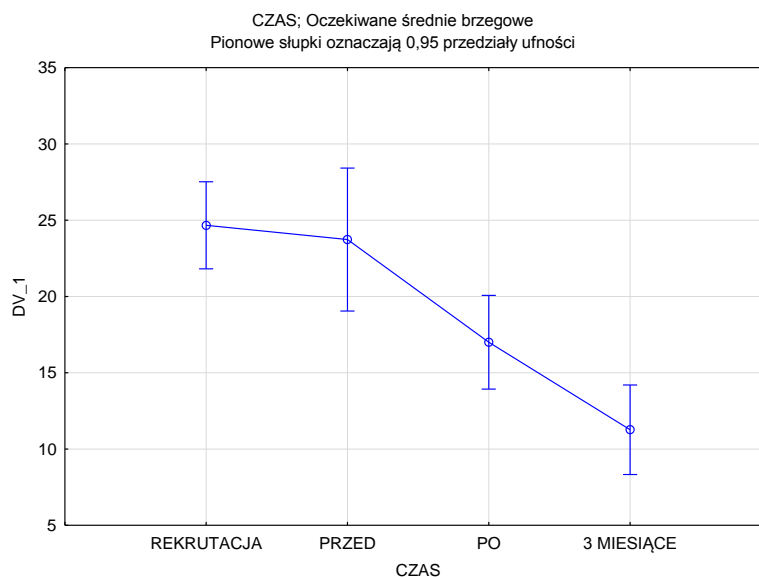
Ponieważ założenia są spełnione możemy więc zastosować podejście jednowymiarowe. Klikamy w tym celu przycisk **Testy jednowymiarowe**, który przywołuje na ekran arkusz wyników zawierający wyniki jednowymiarowej analizy wariancji dla efektów powtarzanych pomiarów. Arkusz ten pokazany jest na poniższym rysunku.

Jednowymiarowe testy dla powtarzanych pomiarów (Parametryzacja z sigma-ograniczeniami, Dekompozycja efektywnych hipotez)					
Efekt	SS	Stopnie swobody	MS	F	p
CZAS	1773,133	3	591,0444	32,77655	0,000000
Błąd	757,367	42	18,0325		

Rys. 14 Arkusz wyników testów jednowymiarowych

Jak widzimy efekt główny czynnika czas okazuje się wysoce istotny ( $p = 0,0000001$ ). Oznacza to istotnie statystyczną zmianę kolejnych średnich pomiarów w czasie.

Wykres tych średnich wywołany tradycyjnie przyciskiem **Średnie /wykresy** wskazuje na wystąpienie liniowej tendencji spadkowej w kolejnych pomiarach w czasie. Tym samym możemy wnioskować o skuteczności zastosowanej terapii.



Rys. 15 Oczekiwane średnie brzegowe dla czynnika Czas

Rysunek wskazuje na liniową redukcję poziomu leukocytów w kolejnych pomiarach w czasie. Możemy tym samym powiedzieć, że skuteczność terapii zwiększa się istotnie wraz z upływem czasu.