



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ INF- γ ΜΕ
ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ: ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

ΑΒΡΑΑΜ Α. ΝΙΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπουσα

Μπράλιου Γεωργία
Επίκουρη Καθηγήτρια

Λαμία, 2022



UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF SCIENCE

INFORMATICS AND COMPUTATIONAL BIOMEDICINE

**GENETIC ASSOCIATION OF INF- γ POLYMORPHISMS WITH
MULTIPLE SCLEROSIS: A SYSTEMATIC REVIEW AND
META-ANALYSIS**

AVRAAM A. NIKOPOULOS

Master thesis

**Braliou Georgia,
Assistant Professor**

Lamia, 2022



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ»

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ INF- γ ΜΕ
ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ: ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ**

ΑΒΡΑΑΜ Α. ΝΙΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπουσα
Μπράλιου Γεωργία,
Επίκουρη Καθηγήτρια

Λαμία, 2022

Με ατομική μου ευθύνη και γνωρίζοντας τις κυρώσεις ⁽¹⁾, που προβλέπονται από της διατάξεις της παρ. 6 του άρθρου 22 του Ν. 1599/1986, δηλώνω ότι:

1. Δεν παραθέτω κομμάτια βιβλίων ή άρθρων ή εργασιών άλλων αυτολεξεί **χωρίς να τα περικλείω σε εισαγωγικά** και χωρίς να αναφέρω το συγγραφέα, τη χρονολογία, τη σελίδα. Η αυτολεξεί παράθεση χωρίς εισαγωγικά χωρίς αναφορά στην πηγή, είναι λογοκλοπή. Πέραν της αυτολεξεί παράθεσης, λογοκλοπή θεωρείται και η παράθεση εδαφίων από έργα άλλων, συμπεριλαμβανομένων και έργων συμφοιτητών μου, καθώς και η παράθεση στοιχείων που άλλοι συνέλεξαν ή επεξεργάστηκαν, χωρίς αναφορά στην πηγή. Αναφέρω πάντοτε με πληρότητα την πηγή κάτω από τον πίνακα ή σχέδιο, όπως στα παραθέματα.
2. Δέχομαι ότι η αυτολεξεί **παράθεση χωρίς εισαγωγικά**, ακόμα κι αν συνοδεύεται από αναφορά στην πηγή σε κάποιο άλλο σημείο του κειμένου ή στο τέλος του, είναι αντιγραφή. Η αναφορά στην πηγή στο τέλος π.χ. μιας παραγράφου ή μιας σελίδας, δεν δικαιολογεί συρραφή εδαφίων έργου άλλου συγγραφέα, έστω και παραφρασμένων, και παρουσίασή τους ως δική μου εργασία.
3. Δέχομαι ότι υπάρχει επίσης περιορισμός στο μέγεθος και στη συχνότητα των παραθεμάτων που μπορώ να εντάξω στην εργασία μου εντός εισαγωγικών. Κάθε μεγάλο παράθεμα (π.χ. σε πίνακα ή πλαίσιο, κλπ), προϋποθέτει ειδικές ρυθμίσεις, και όταν δημοσιεύεται προϋποθέτει την άδεια του συγγραφέα ή του εκδότη. Το ίδιο και οι πίνακες και τα σχέδια
4. Δέχομαι όλες τις συνέπειες σε περίπτωση λογοκλοπής ή αντιγραφής.

Ημερομηνία: 15/12/2022

Ο Δηλών

(Υπογραφή)

(1) «Όποιος εν γνώσει του δηλώνει ψευδή γεγονότα ή αρνείται ή αποκρύπτει τα αληθινά με έγγραφη υπεύθυνη δήλωση του άρθρου 8 παρ. 4 Ν. 1599/1986 τιμωρείται με φυλάκιση τουλάχιστον τριών μηνών. Εάν ο υπαίτιος αυτών των πράξεων σκόπευε να προσπορίσει στον εαυτόν του ή σε άλλον περιουσιακό όφελος βλάπτοντας τρίτον ή σκόπευε να βλάψει άλλον, τιμωρείται με κάθειρξη μέχρι 10 ετών.

«Υπεύθυνη Δήλωση μη λογοκλοπής και ανάληψης προσωπικής ευθύνης»

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, και γνωρίζοντας τις συνέπειες της λογοκλοπής, δηλώνω υπεύθυνα και ενυπογράφως ότι η παρούσα εργασία με τίτλο **«Γενετική συσχέτιση πολυμορφισμών INFγ με σκλήρυνση κατά πλάκας: Συστηματική αναθεώρηση και μετα-ανάλυση»** αποτελεί προϊόν αυστηρά προσωπικής εργασίας και όλες οι πηγές από τις οποίες χρησιμοποίησα δεδομένα, ιδέες, φράσεις, προτάσεις ή λέξεις, είτε επακριβώς (όπως υπάρχουν στο πρωτότυπο ή μεταφρασμένες) είτε με παράφραση, έχουν δηλωθεί κατάλληλα και ευδιάκριτα στο κείμενο με την κατάλληλη παραπομπή και η σχετική αναφορά περιλαμβάνεται στο τμήμα των βιβλιογραφικών αναφορών με πλήρη περιγραφή. Αναλαμβάνω πλήρως, ατομικά και προσωπικά, όλες τις νομικές και διοικητικές συνέπειες που δύναται να προκύψουν στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής.

Ο ΔΗΛΩΝ

Αβραάμ Α. Νικόπουλος

Ημερομηνία

15/12/2022

Υπογραφή



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ INF- γ ΜΕ
ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ: ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ**

ΑΒΡΑΑΜ Α. ΝΙΚΟΠΟΥΛΟΣ

Τριμελής Επιτροπή:

Μπράλιου Γεωργία, Επίκουρος Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Μπάγκος Παντελεήμων, Καθηγητής

Κοντού Παναγιώτα, Επίκουρος καθηγήτρια

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Γεωργία Μπράλιου για την ευκαιρία που μου έδωσε αναθέτοντας μου αυτή την διπλωματική διατριβή, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επίσης για την καθοδήγηση και την κατάλληλη μεθοδολογία που μου παρείχε κατά το σχεδιασμό και την εκτέλεση της μελέτης. Η συνεισφορά της στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης ήταν ανεκτίμητη.

Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στον καθηγητή Παντελή Μπάγκο, για την αμέριστη βοήθεια που μου πρόσφερε κατά την διάρκεια της εκτέλεσης της διπλωματικής διατριβής.

Θα ήταν παράλειψη μου αν δεν ευχαριστούσα την καθηγήτριά μου Παναγιώτα Κοντού που με τις τεχνικές γνώσεις της εγκατέστησε το Stata στον υπολογιστή μου, εξηγώντας την λειτουργία του και μου έδωσε την ευκαιρία να κάνω στατιστική ανάλυση, επίσης μου παρείχε πολύτιμες συμβουλές στην βιοπληροφορική και εμπύχωση.

Ευχαριστώ την σύζυγό μου Ελένη και τα παιδιά μου Αναστάσιο και Ευθυμία για την υπομονή και κατανόηση και την δύναμη που μου δώσανε να ολοκληρώσω την διατριβή αυτή.

Περίληψη

Η φλεγμονώδης νόσος που ονομάζεται σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μια νόσος που προσβάλλει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Υπάρχουν τέσσερις υποτύποι για την σκλήρυνση κατά πλάκας: που περιέχουν την υποτροπιάζουσα διαλείπουσα σκλήρυνση κατά πλάκας (RRMS), έπειτα την πρωτοπαθή προϊούσα σκλήρυνση κατά πλάκας (PPMS), στην συνέχεια υπάρχει η δευτερογενή προϊούσα σκλήρυνση κατά πλάκας (SPMS) και τέλος η προοδευτική υποτροπιάζουσα σκλήρυνση κατά πλάκας (PRMS). Είναι δυσνόητη η παθοφυσιολογία της σκλήρυνσης κατά πλάκας επειδή είναι ιδιαίτερα σύνθετη και περίπλοκη. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ευρήματα που υποδεικνύουν γενετική προδιάθεση ή περιβαλλοντικούς παράγοντες ως αιτία για την εμφάνιση ή την επιδείνωση της νόσου. Υφίστανται έρευνες που δείχνουν πως τα γονίδια που εμπλέκονται στην έμφυτη ανοσοαπόκριση συμβάλουν στην ανάπτυξη της ΣκΠ. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση με σκοπό να αξιολογηθεί η γενετική συσχέτιση πολυμορφισμών της INF γ , ιδιαίτερα δε των rs2430561 και rs34079299, με την σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ). Οι τρεις μελέτες οι οποίες βρέθηκαν για τον πολυμορφισμό rs2430561 έδειξαν συσχέτισή του με την εμφάνιση της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Οι δύο μελέτες οι οποίες βρέθηκαν για τον πολυμορφισμό rs34079299 της ιντερφερόνης- γ και χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας δεν έδειξαν συσχέτιση με την σκλήρυνση κατά πλάκας. Καταλήξαμε στο συμπέρασμα από την έρευνα πως υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην INF γ και MS σύμφωνα με τον επικρατή τρόπο κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό rs2430561, συμπέρασμα το οποίο μπορεί να βοηθήσει σημαντικά μελλοντικές έρευνες για την κατανόηση αλλά και την αντιμετώπιση της νόσου.

Abstract

The inflammatory disease called multiple sclerosis is a disease that affects the Central Nervous System (CNS). There are four subtypes for multiple sclerosis: containing relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS), then primary progressive multiple sclerosis (PPMS), then there is secondary progressive multiple sclerosis (SPMS) and finally relapsing-remitting multiple sclerosis (PRMS). The pathophysiology of multiple sclerosis is difficult to understand because it is highly complex and complicated. However, there are findings that indicate genetic predisposition or environmental factors as a cause for the onset or worsening of the disease. There is research showing that genes involved in the innate immune response contribute to the development of MS. In the present study, a systematic review and meta-analysis was performed to evaluate the genetic association of $\text{INF}\gamma$ polymorphisms, particularly rs2430561 and rs34079299, with multiple sclerosis (MS). The three studies found for the rs2430561 polymorphism showed its association with the occurrence of multiple sclerosis. The two studies found for the interferon- γ rs34079299 polymorphism used in our study did not show an association with multiple sclerosis. We concluded from the research that there is a statistically significant correlation between $\text{INF}\gamma$ and MS according to the dominant mode of inheritance for the rs2430561 polymorphism, a conclusion that can significantly help future research to understand and treat the disease.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	11
Περίληψη	13
Πίνακας Συντομογραφιών	16
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή – Σκλήρυνση κατά Πλάκας	17
1.1 Ορισμός	17
1.2 Επιδημιολογία	19
1.3 Παθοφυσιολογία	20
1.4 Διάγνωση	21
1.5 Αιτιολογικοί Παράγοντες	21
1.6.1 Ανοσοποιητικοί Παράγοντες	21
1.6.2 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες	21
1.6.3 Γενετικοί Παράγοντες	22
1.7 Η Συσχέτιση της Ιντερφερόνης γ (INFγ) με τη Σκλήρυνση κατά Πλάκας	23
1.8 Σκοπός	24
Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι	25
2.1 Συλλογή Δεδομένων	25
2.2 Στατιστικό Πακέτο Stata	25
2.3 Στατιστική Ανάλυση	26
2.3.1 Μοντέλο σταθερών επιδράσεων	26
2.3.2 Μοντέλο Τυχαίων Επιδράσεων	27
2.4 Μέγεθος Επίδρασης (Effect Size)	28
2.5 Έλεγχος Ετερογένειας	28
2.6 Οι Σημαντικότερες Εντολές του Stata	30
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα	33
3.1 Πολυμορφισμοί Γονιδίων	35
Κεφάλαιο 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	67
Κεφάλαιο 5: ΕΠΙΛΟΓΟΣ	69
Κεφάλαιο 6: Βιβλιογραφία	71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	75
ΚΡΙΣΙΜΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ	75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	79
ΕΞΑΓΟΜΕΝΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΥΝΕΠΙΚΡΑΤΕΣ, ΥΠΟΛΟΙΠΟΜΕΝΟ ΚΑΙ ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs2430561	79

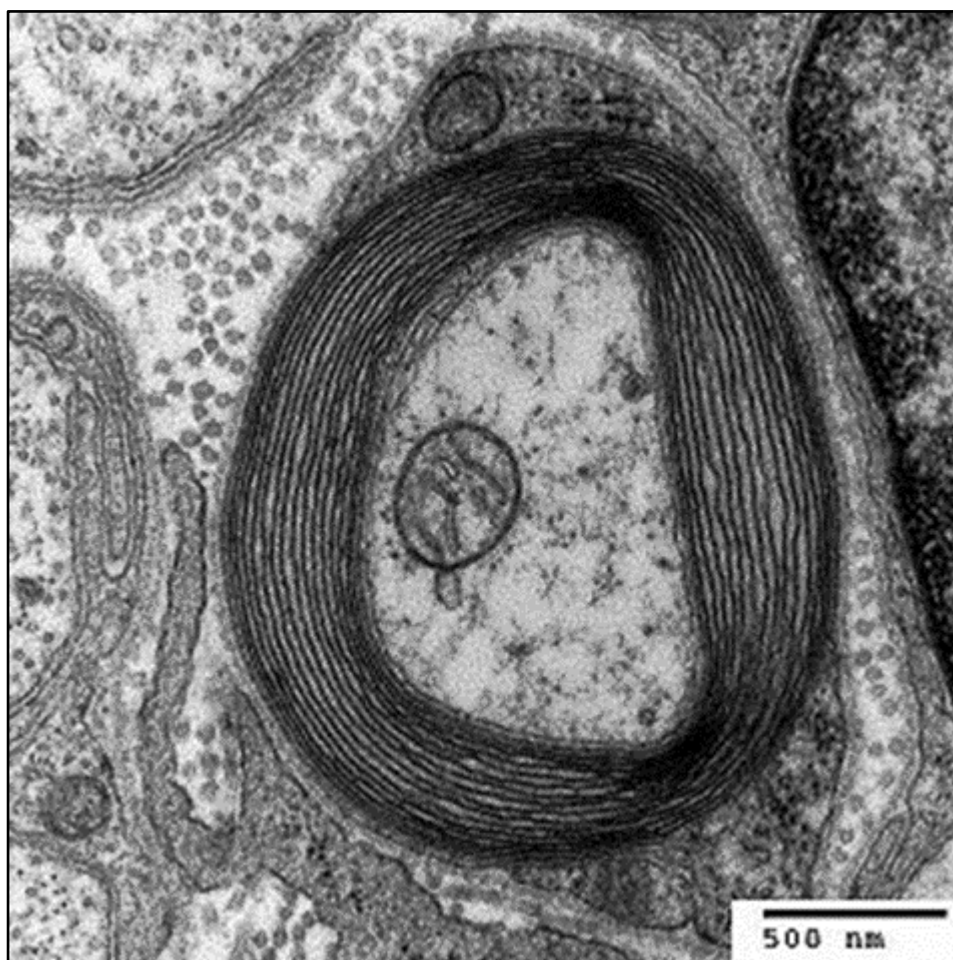
Πίνακας Συντομογραφιών

ΣκΠ	Σκλήρυνση κατά Πλάκας
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
DIS	Διασπορά στο χώρο
DIT	Διασπορά στο χρόνο
MHC	Μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
IFN γ	Ιντερφερόνη- γ
IFNGRs	Υποδοχείς IFN- γ

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή – Σκλήρυνση κατά Πλάκας

1.1 Ορισμός

Η σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ), μια από τις πιο διαδεδομένες νευρολογικές αναπηρίες, είναι μια αυτοάνοση διαταραχή που επηρεάζει το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και συχνά οδηγεί σε σοβαρή σωματική ή γνωστική ανικανότητα, καθώς και στην εμφάνιση νευρολογικών συμπτωμάτων σε νεαρούς ενήλικες (Compston & Coles, 2008). Οι πολυεστιακές ζώνες φλεγμονής λόγω εστιακών διεισδύσεων Τ-λεμφοκυττάρων και μακροφάγων και ο θάνατος των ολιγοδενδροκυττάρων είναι οι πρωταρχικές αιτίες της αποδόμησης του ελύτρου της μυελίνης (Loma & Heyman, 2011).

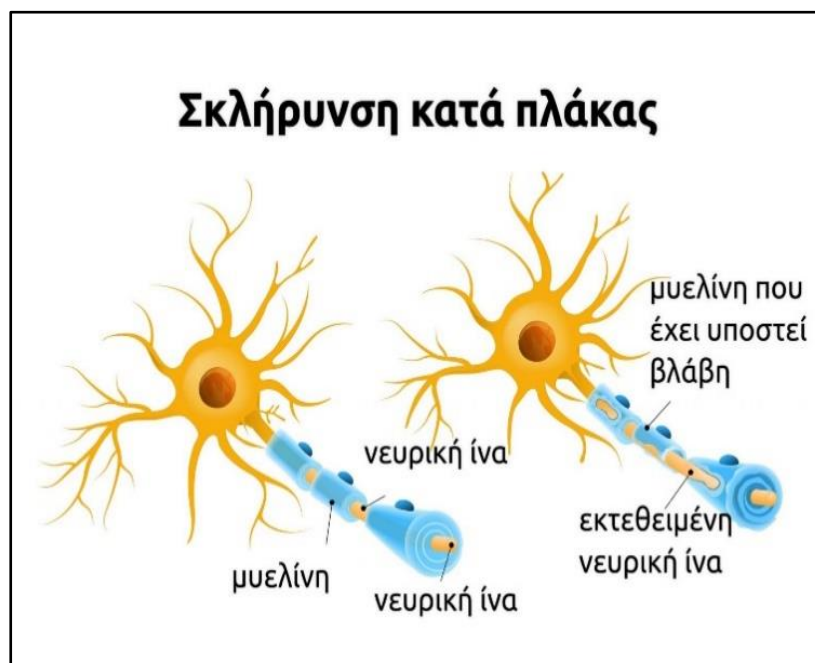


Εικόνα 1. Φωτογραφία διατομής από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης που εμφανίζεται ένας μυελινωμένος νευράξονας με κάλυμμα μυελίνης. Trinity College, Hartford.

(Πηγή:

https://el.m.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%BF:Myelinated_neuron.jpg)

Η λιποειδής ουσία που εμπεριέχει τον νευράξονα των εμμύελων νευρικών ινών, ονομάζεται μυελίνη. Η μυελίνη βελτιώνει την αποδοτικότητα με την οποία οι άξονες επιτρέπουν την δίοδο και μεταφέρουν τα δυναμικά ενέργειας, ανάμεσα στον εγκέφαλο και στα άκρα.



Εικόνα 2. Σκλήρυνση κατά Πλάκας

(Πηγή: <https://argonafplia.gr/wp-content/uploads/2018/05/sklirinsh-kata-plakas.jpg>)

Η απομυελίνωση οδηγεί σε παθολογική κατάσταση. Αυτό στη συνέχεια οδηγεί στο σχηματισμό πλακών στο ΚΝΣ που αποτελούνται από φλεγμονώδη κύτταρα και τα προϊόντα τους, απομυελινωμένους και τραυματισμένους άξονες, και αστρογλίωση τόσο στη λευκή όσο και στη φαιά ουσία. Αυτές οι βλάβες μπορούν να οδηγήσουν σε παρεμπόδιση της σωστής μετάδοσης των νευρικών σημάτων και να οδηγήσουν σε νευρωνική δυσλειτουργία που εκφράζεται ως αυτόνομα και αισθητικά κινητικά ελαττώματα, διαταραχές της όρασης, αταξία, κόπωση, δυσκολίες στη σκέψη και συναισθηματικά προβλήματα (Compston & Coles, 2008).

Λόγω της σημαντικής ετερογένειας που παρουσιάζει η ασθένεια, έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις υπότυποι. Η κατηγοριοποίηση των περιστατικών θεωρείται σημαντική, όχι μόνο για την πρόγνωση, αλλά και για τη λήψη των αποφάσεων σχετικά με τη θεραπεία που θα ακολουθήσει ο ασθενής. Οι τύποι περιλαμβάνουν: α. υποτροπιάζουσα μορφή πολλαπλής σκλήρυνσης (relapsing remitting MS-RRMS), β. πρωτοπαθή προϊούσα μορφή πολλαπλής σκλήρυνσης (primary progressive MS-PPMS), γ. δευτερογενή προϊούσα μορφή πολλαπλής σκλήρυνσης (secondary progressive MS-SPMS) και δ. προοδευτική μορφή πολλαπλής σκλήρυνσης (progressive relapsing MS-PRMS) (Ghasemi, Razavi & Nikzad, 2017):

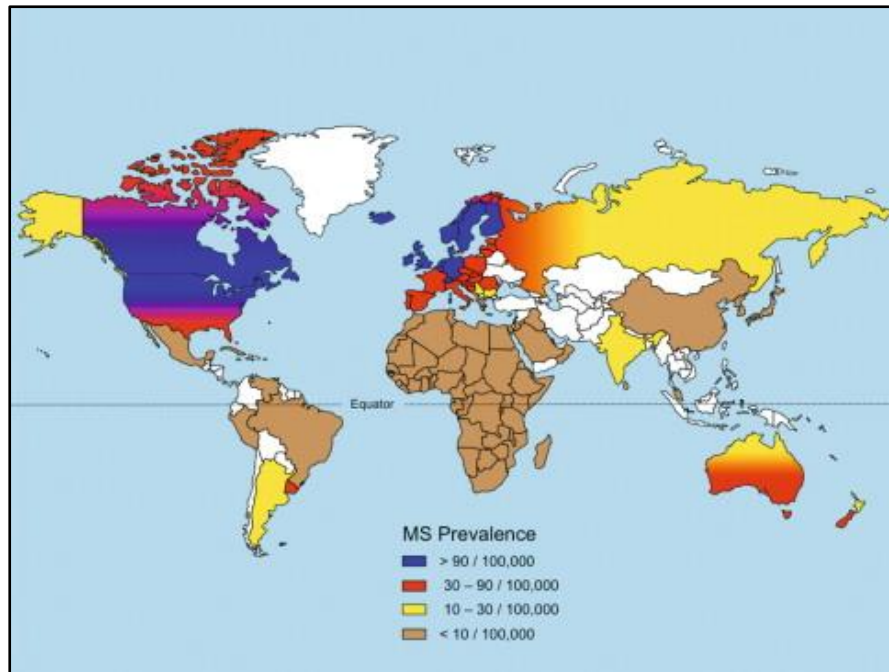
- Α. Υποτροπιάζουσα ΣκΠ: Αποτελεί την πιο κοινή μορφή, επηρεάζοντας περίπου το 85% των ασθενών με ΣκΠ. Χαρακτηρίζεται από εξάρσεις (υποτροπές ή παροξύνσεις) συμπτωμάτων που ακολουθούνται από περιόδους ύφεσης, όπου τα συμπτώματα βελτιώνονται ή εξαφανίζονται. Στην υποτροπιάζουσα ΣκΠ, εμφανίζονται φλεγμονώδεις καταστάσεις στη μυελίνη και τις νευρικές ίνες. Τα ενεργοποιημένα ανοσοκύτταρα προκαλούν αλλοιώσεις στο ΚΝΣ προκαλώντας συμπτώματα διαταραχών της όρασης, μυρμήγκιασμα και μούδιασμα, επεισοδιακές περιόδους

κόπωσης, διαταραχές του εντερικού και ουροποιητικού συστήματος, σπαστικότητα και διαταραχή της μνήμης και της μάθησης (Weiner, 2008).

- B. Πρωτοπαθή προϊούσα ΣκΠ: Επηρεάζει περίπου το 10% των ασθενών με ΣκΠ. Τα συμπτώματα συνεχίζουν να επιδεινώνονται σταδιακά από τη στιγμή της αρχικής εμφάνισής τους. Δεν υπάρχουν περίοδοι έξαρσης ή ύφεσης, αλλά μπορεί να υπάρχουν περιστασιακές περίοδοι σταθερότητας. Αυτή η μορφή ΣκΠ είναι πιο ανθεκτική στα φάρμακα που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία της νόσου. Οι ασθενείς με πρωτοπαθή προϊούσα μορφή τείνουν να έχουν λιγότερες εγκεφαλικές αλλοιώσεις. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν προβλήματα με το περπάτημα, αδυναμία, δυσκαμψία και προβλήματα ισορροπίας (Gadoth, 2003; Boiko et al, 2002).
- C. Δευτερογενώς προϊούσα ΣκΠ: Σχεδόν το 65% των ασθενών με υποτροπιάζουσα νόσο θα αναπτύξουν στη συνέχεια δευτερογενώς προϊούσα ΣκΠ. Για πολλούς ασθενείς, η θεραπεία με παράγοντες τροποποίησης της νόσου βοηθά στην καθυστέρηση αυτής της εξέλιξης. Η πορεία της νόσου συνεχίζει να επιδεινώνεται με ή χωρίς περιόδους ύφεσης ή σταθεροποίησης της σοβαρότητας των συμπτωμάτων. Πολλά άτομα αντιμετωπίζουν αυξημένη αδυναμία, διαταραχές του εντερικού και ουροποιητικού συστήματος, κόπωση, δυσκαμψία, ψυχικές διαταραχές και ψυχολογική εξασθένηση (Gadoth, 2003; Boiko et al, 2002).
- D. Προοδευτική ΣκΠ: Μια σπάνια μορφή, που επηρεάζει λιγότερο από το 5% των ασθενών και σχετίζεται με συμπτώματα όπως πόνος στα μάτια και διπλωπία, μαζί με σεξουαλική, εντερική και ουροποιητική δυσλειτουργία, ζάλη και κατάθλιψη. Η ασθένεια αρχικά είναι προοδευτική, στην πορεία όμως εμφανίζονται και διαλείπουσες εξάρσεις με τα συμπτώματα να επιδεινώνονται. Περίοδοι παντελούς ύφεσης δεν υπάρχουν (Gadoth, 2003; Boiko et al, 2002).

1.2 Επιδημιολογία

Ο επιπολασμός της ΣκΠ αυξάνεται όλο και περισσότερο παγκοσμίως (Browne et al, 2014). Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης της νόσου σε διάφορες χώρες του κόσμου. Τα τελευταία χρόνια η ΣκΠ είναι συχνότερη στις γυναίκες, σε αντίθεση με ό,τι συνέβαινε παλιότερα. Στις αρχές του 1900, η αναλογία των περιστατικών στα δύο φύλα ήταν σχεδόν ίση. Από τότε, η αναλογία φύλου αυξάνεται σταθερά και σήμερα πλησιάζει το 3:1 (γυναίκες:άντρες) στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες (Orton et al, 2006). Πιθανόν, το κάπνισμα, το οποίο αυξάνει τον κίνδυνο ΣκΠ κατά περίπου 50%, μπορεί να εξηγήσει έως και το 40% της αυξημένης συχνότητα εμφάνισης ΣκΠ στις γυναίκες. Πριν από το Β' Παγκόσμιο Πόλεμο, λίγες γυναίκες κάπνιζαν, αλλά ο αριθμός των γυναικών που καπνίζουν αυξήθηκε γρήγορα μετά τον πόλεμο, αντικατοπτρίζοντας την αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης ΣκΠ στις γυναίκες (Palacios et al, 2011).



Εικόνα 3. Ο παγκόσμιος χάρτης όπου παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης της ΣκΠ ανά χώρα.

(Πηγή: Goodin, 2014)

Το ενδομήτριο περιβάλλον πολύ πιθανόν να συνδέεται επίσης με την ΣκΠ. Ο μήνας γέννησης και η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στα διζυγωτικά δίδυμα σε σύγκριση με τα αδέλφια δείχνουν ότι το ενδομήτριο περιβάλλον είναι σημαντικό για τον καθορισμό του κινδύνου εμφάνισης ΣκΠ, χωρίς να είναι σαφές εάν αυτό οφείλεται σε έκθεση σε κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες ή σε επιγενετικούς μηχανισμούς ή και στα δύο (Ramagopalan et al, 2010). Επίσης, υπάρχει γενετική επίδραση στην προδιάθεση, αφού περίπου ένας στους οκτώ ασθενείς έχει οικογενειακό ιστορικό ΣκΠ (Harirchian et al, 2017). Η αντιστοιχία σε θηλυκά μονοζυγωτικά δίδυμα πλησιάζει το 30% στο Ηνωμένο Βασίλειο και τον Καναδά, αλλά μόλις ~ 8,5% στη νότια Ευρώπη (Ristori et al, 2006).

1.3 Παθοφυσιολογία

Η ιντερφερόνη ανήκει στις φυσικές ουσίες που δημιουργούνται στο άνθρωπο σε περίπτωση λοίμωξης από ιούς. Η ιντερφερόνη γάμμα (IFN γ) ή ιντερφερόνη τύπου II και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα (TNF- α) είναι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες κρίσιμες για τη φυσική και μη φυσική ανοσία. Αυτές οι κυτοκίνες παράγονται από κύτταρα Th1 (Schoenborn & Wilson, 2007) και έχουν την ικανότητα να προάγουν τη φλεγμονή καταστέλλοντας τη διαφοροποίηση σε Th2. Τα κύτταρα Th2 εκκρίνουν τις αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, IL-4 και IL-13 (Zhu & Paul, 2008; Minty et al, 1993). Η IL-4 μειώνει την παθολογική φλεγμονή μέσω αύξησης των μακροφάγων M2 (ή επιδιόρθωσης των μακροφάγων) και εναλλακτικής ενεργοποίησης των μακροφάγων M1 που προάγουν τη φλεγμονή.

1.4 Διάγνωση

Η διάγνωση της ασθένειας ξεκινάει με τη φυσική εξέταση, κατά την οποία γίνεται αξιολόγηση του ιστορικού της παρούσας ασθένειας του ασθενούς και περιλαμβάνει (Tafti, Ehsan & Xixis, 2020):

Αξιολόγηση της οπτικής νευρίτιδας, απώλεια κεντρικής όρασης. Συνήθως παρατηρείται πόνος κατά την κίνηση των ματιών. Επίσης δυσκολία στην πλευρική όραση που υποδηλώνει εσωτερική πυρηνική οφθαλμοπληγία. Ακόμη εμφανίζεται νυσταγμός, διπλωπία απώλεια ακοής, πόνος στο πρόσωπο.

1.5 Αιτιολογικοί Παράγοντες

Η ακριβής αιτιολογία της ΣκΠ είναι άγνωστη. Ως πολυπαραγοντική ασθένεια υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την πιθανότητα εμφάνισής της. Οι παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεση της ΣκΠ ομαδοποιούνται γενικά σε τρεις κατηγορίες:

Καταρχάς ανοσοποιητικοί παράγοντες. Δεύτερον περιβαλλοντικοί παράγοντες και τελικά γενετικοί παράγοντες.

1.6.1 Ανοσοποιητικοί Παράγοντες

Η κύρια αιτιολογία, όπως πιστεύεται σήμερα, είναι η αυτοάνοση επίθεση στο ΚΝΣ. Στις περιπτώσεις αυτές ένα άγνωστο αντιγόνο ερεθίζει και ενεργοποιεί τόσο το Th1 όσο και το Th17, οδηγώντας σε προσκόλληση στο ενδοθήλιο του ΚΝΣ, τη διέλευση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και την επακόλουθη ανοσολογική επίθεση μέσω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας (Tsunoda & Fujinami, 2002).

1.6.2 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Περιβαλλοντικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης σε ιογενείς και βακτηριακούς παράγοντες όπως ο ιός Epstein Barr, ο ιός του ανθρώπινου έρπητα τύπου 6 και η πνευμονία του μυκοπλάσματος (Fujinami et al, 2006), το κάπνισμα (O'Gorman et al, 2014), η ανεπάρκεια βιταμινών (Speer, 2013), διατροφή (Zhang et al, 2000; Bäärnhielm, Olsson & Alfredsson, 2014) και η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Sloka et al, 2011) συνδέονται με την εμφάνιση ΣκΠ.

Οι μικροβιακοί παράγοντες μπορεί να έχουν ένα πυρηνικό αντιγόνο που είναι δομικά ομόλογο με συστατικά της μυελίνης όπως πρωτεϊνολιπιδική πρωτεΐνη, βασική πρωτεΐνη μυελίνης και γλυκοπρωτεΐνη της μυελίνης. Έτσι, όταν τα ανοσοκύτταρα ενεργοποιούνται από αυτά τα παθογόνα, θα σχηματιστούν αλλοιώσεις και της θήκης μυελίνης (Weiner, Razavi & Nikzad, 2017).

Έχει βρεθεί ότι το κάπνισμα, λόγω της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO) και μονοξειδίου του άνθρακα (CO), παίζει σημαντικό ρόλο στη ΣκΠ. Το NO είναι ένα τοξικό διαλυτό

αέριο που σε παθολογικές συγκεντρώσεις μπορεί να βλάψει τους νευρώνες και τα ολιγοδενδροκύτταρα (Dawson et al, 1993; Merrill et al, 1993).

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων και η μιτοχονδριακή βλάβη που προκύπτουν από το ΝΟ μπορούν να οδηγήσουν σε απόπτωση ολιγοδενδροκυττάρων, εκφυλισμό των νευραξόνων και απομυελίνωση (Mitrovic et al, 1995). Μια προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η έκθεση σε CO οδηγεί σε απόφραξη της οξυγόνωσης των ιστών (Somogyi et al, 1981), της αποικοδόμησης της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης και του τραυματισμού των νευραξόνων, καθώς και σε επακόλουθη φλεγμονώδη απόκριση, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης μικρογλοίας και της εισβολής λεμφοκυττάρων CD4+ στο ΚΝΣ, η οποία οδηγεί σε απομυελίνωση (Thom et al, 2004).

Η ανεπάρκεια βιταμινών (ειδικά οι βιταμίνες D και B12) θεωρούνται παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ΣκΠ. Η βιταμίνη D αποτελείται από μια οικογενεια λιποδιαλυτών στεροστεροειδών που περιλαμβάνουν βιταμίνη D3 (χοληκαλσιφερόλη) και βιταμίνη D2 (εργοκαλσιφερόλη). Η χοληκαλσιφερόλη παράγεται στο δέρμα μέσω της δράσης της υπεριώδους ακτινοβολίας B στην 7-δεϋδροχολστερόλη που είναι ο πρόδρομος της χοληκαλσιφερόλης. Στο ήπαρ, μέσω της ηπατικής υδροξυλίωσης, η χοληκαλσιφερόλη μετατρέπεται σε προορμόνη καλσιδιόλη [25(OH)D3]. Στα νεφρά, με ένα στάδιο νεφρικής υδροξυλίωσης, ένα μέρος της καλσιδιόλης μετατρέπεται σε καλσιτριόλη που είναι η βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης D. Στο κυκλοφορικό σύστημα η καλσιτριόλη συνδέεται με μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται με βιταμίνη D και μεταφέρεται σε διάφορους ιστούς στόχους, όπου συνδέεται με συγκεκριμένους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς και έχει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων (Prosser & Jones, 2004). Επιπλέον, αυτή η βιταμίνη έχει ρόλο στην γονιδιακή έκφραση και ρύθμιση της ανοσίας (VanAmerongen et al, 2004), καθώς και στην επαγωγή απόπτωσης B λεμφοκυττάρων (Chen et al, 2007), στη σύνθεση IL-10 (Mowry et al, 2010) και στην καταστολή των προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) (Banwell et al, 2011) και IL-2 (Disanto, Morahan & Ramagopalan, 2012). Η βιταμίνη B12 παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία συστατικών της θήκης μυελίνης. Έτσι, η ανεπάρκεια αυτής της βιταμίνης μπορεί να είναι μια σημαντική αιτία για νευρολογικές ασθένειες όπως η ΣκΠ. Τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης σε ασθενείς με ΣκΠ έδειξαν ότι η λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης B12 οδηγεί σε βελτίωση της κλινικής πορείας της ασθένειας (Wade et al, 2002).

Εκτός από την ανεπάρκεια βιταμινών ως πιθανός παράγοντας κινδύνου για τη ΣκΠ, έχει επίσης αναγνωριστεί και η χαμηλής διάρκειας έκθεση στο φως του ήλιου. Τα αποτελέσματα μιας προηγούμενης μελέτης έχουν δείξει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία και της συχνότητας εμφάνισης ΣκΠ (Sloka et al, 2011). Αυτή η σχέση μπορεί να οφείλεται στο ότι το φως του ήλιου είναι η κύρια πηγή βιταμίνης D3 και μέσω της επαγωγής ρυθμιστικών κυττάρων T (Treg) και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών όπως IL-10 και TNF-α, μπορεί να έχει ανοσορρυθμιστικές δράσεις (Bäårnhelm et al, 2012).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η διατροφή θα μπορούσε να είναι ένας περιβαλλοντικός παράγοντας που εμπλέκεται στη ΣκΠ (Bates et al, 1989). Μελέτες αναφέρουν μια σημαντική αρνητική σχέση μεταξύ της πιθανότητας εμφάνισης ΣκΠ και της υψηλής πρόσληψης ψαριών (Swank et al, 1952), μια θετική σημαντική συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης θερμίδων με υψηλή περιεκτικότητα σε ζωικά λιπαρά και του κινδύνου εμφάνισης ΣκΠ (Alter, Yamoore & Harshe, 1974) και μια σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της παχυσαρκίας σε έφηβα κορίτσια και του κινδύνου εμφάνισης ΣκΠ (Langer-Gould et al, 2013).

1.6.3 Γενετικοί Παράγοντες

Σε σύγκριση με την πιθανότητα εμφάνισης ΣκΠ στο γενικό πληθυσμό που αγγίζει το 0,2%, τα αδέλφια των προσβεβλημένων ατόμων έχουν 10 έως 20 φορές υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (2-4%), με τα μονοζυγωτικά δίδυμα να έχουν ακόμη μεγαλύτερο κίνδυνο (30%) (Sadovnick & Baird, 1988; Willer et al, 2003). Αντίθετα, οι σύζυγοι και τα υιοθετημένα παιδιά διατρέχουν κίνδυνο συγκρίσιμο με αυτόν του γενικού πληθυσμού (Robertson et al, 1996).

Ένας άλλος παράγοντας που υποστηρίζει την κληρονομικότητα της ΣκΠ συνίσταται στο διακριτό παγκόσμιο επιπολασμό της νόσου. Οι άνθρωποι που ζουν στη Βόρεια Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά ασθένειας (1-2 στα 1000) σε σύγκριση με τους νότιους Ευρωπαίους. Επιπλέον, η ΣκΠ εμφανίζεται σπάνια σε ορισμένες εθνικές ομάδες, όπως Ουζμπεκιστάν, Σάμι, Τουρκμενιστάν, Κιργιζία, Καζακστάν, ιθαγενείς Σιβηριανοί, Βόρειοι και Νότιοι Αμερικανοί, Ιάπωνες, Κινέζοι, μαύροι Αφρικανοί και Νεοζηλανδοί Maori (Rosati, 2001). Αν και αυτές οι διαφορές θα μπορούσαν να εξηγηθούν εν μέρει από τη διαφορική έκθεση σε συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως ορισμένα παθογόνα), η ύπαρξη φυλών ανθεκτικών στη ΣκΠ ή χαμηλής συχνότητας εμφάνισης υποδηλώνει ότι η ιστορία και η γενετική αρχιτεκτονική ενός πληθυσμού επηρεάζουν τον δικό της κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου (Didonna & Oksenberg, 2017).

Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, ο συνολικός κίνδυνος ΣκΠ είναι το αποτέλεσμα της συνεισφοράς πολλαπλών πολυμορφικών γονιδίων με κοινά αλληλόμορφα κινδύνου στον πληθυσμό, καθένα από τα οποία συμβάλλει σε μέτριο βαθμό στο συνολικό κίνδυνο εμφάνισης (Sawcer, Franklin & Ban, 2014; Didonna & Oksenberg, 2015). Αυτό το μη-Μεντελιανό μοτίβο κληρονομής δεν είναι αποκλειστικό της ΣκΠ, αλλά είναι κοινό με άλλες αυτοάνοσες ασθένειες και χρόνιες διαταραχές, όπως ο διαβήτης τύπου II και η παχυσαρκία. Αυτές οι ασθένειες χαρακτηρίζονται ως σύνθετες γενετικές διαταραχές, που επηρεάζονται από πολλαπλά γονίδια και πολύπλευρες αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβάλλοντος.

1.7 Η Συσχέτιση της Ιντερφερόνης γ (INFγ) με τη Σκλήρυνση κατά Πλάκας

Το γονίδιο *IFNG* ανήκει στις κυτταροκίνες και έχει την ευθύνη για τις φλεγμονές που προκαλεί στον ανθρώπινο οργανισμό, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 του ανθρώπου, στην περιοχή 12q15, περιέχει τέσσερα εξόνια και τρία ιντρόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μήκους 166 αμινοξέων (Gray & Goeddel, 1982). Η IFN-γ είναι μια πλειοτροπική κυτοκίνη με ισχυρή ανοσορρυθμιστική ικανότητα, με θετικές ή αρνητικές επιδράσεις στην έκφραση διαφόρων γονιδίων και πρωτεϊνών. Αρχικά ανακαλύφθηκε ως αντιικός παράγοντας (Wheelock, 1965), ωστόσο η IFN-γ έχει μια σειρά ρόλων, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης της έκφρασης του MHC σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ρυθμιστικές επιδράσεις στα T κύτταρα και αυξημένη έκφραση του μορίου ενδοκυτταρικής προσκόλλησης (ICAM)-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Billiau, 1996). Τα κύρια κύτταρα που παράγουν IFN-γ είναι τα φυσικά κύτταρα φονιάδες (NK), T κύτταρα και μακροφάγα (Gessani & Belardelli, 1998). Υποδοχείς IFN-γ (IFNGRs) υπάρχουν σε όλα σχεδόν τα κύτταρα, και αποτελούνται από δύο υπομονάδες (διαμεμβρανικές αλυσίδες), που απαιτούνται για ενεργοποίηση. Η IFN-γ R1 δεσμεύει τον προσδέτη IFN-γ, ενώ η IFN-γ R2 απαιτείται για τη μεταγωγή του σήματος (Pestka, 1997).

Ο ρόλος της IFN-γ στην ανάπτυξη ασθενειών είναι διφορούμενος. Σε μολυσματικές ασθένειες η IFN-γ ενισχύει τους κυτταρικούς μηχανισμούς άμυνας και ευνοεί την ανάπτυξη ειδικής ανοσίας. Σε μη μολυσματικές ασθένειες, ωστόσο, τα περισσότερα από τα περιγραφόμενα αποτελέσματα οδηγούν σε νόσο (Billiau, 1996). Επιπλέον, ο ρόλος της στη ΣκΠ είναι αμφιλεγόμενος, αφού η θεραπεία με IFN-γ οδηγεί σε υποτροπή της ασθένειας (Panitch et al, 1987), ενώ στο ζωικό μοντέλο, πειραματικής αλλεργικής εγκεφαλομυελίτιδας, πολλές μελέτες

υποστηρίζουν έναν περιοριστικό ρόλο της IFN-γ στη νόσο (Billiau et al, 1988; Krakowski & Owens, 1996).

Σε ασθενείς με ΣκΠ παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα του mRNA της IFN-γ στο περιφερικό αίμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Link, 1998), ενώ IFN-γ εντοπίζεται και στις περιοχές των πλακών της ΣκΠ (Woodrooffe & Cuzner, 1993; Brosnan et al, 1995). Στην υποτροπιάζουσα ΣκΠ, έχει παρατηρηθεί αύξηση της παραγωγής IFN-γ πριν από την υποτροπή (Dettke et al, 1997), καθώς και μια μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής IFN-γ και της δυσλειτουργίας των ασθενών (Petereit et al, 2000).

Ο πολυμορφισμός της Ιντερφερόνης γ (INFγ) συσχετίζεται και με άλλες ασθένειες όπως η απλαστική αναιμία ¹.

Τροποποιημένη παραγωγή IFN-g έχει παρατηρηθεί σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Swaak et al., 1997), μυασθένεια gravis (Link et al., 1994) και η σκλήρυνση κατά πλάκας (Navikas & Link, 1996; Dettke et al., 1997).

1.8 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ταυτοποίηση και η ανάλυση πολυμορφισμών του γονιδίου INFγ, που σχετίζονται με τη ΣκΠ με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Προχωρώντας με την μέθοδο της μετα-ανάλυσης, έγινε ένας συνδυασμός των αποτελεσμάτων από τις μελέτες που γίνανε σε διεθνές επίπεδο και, προκειμένου να έχουμε την γενετική συσχέτιση των πολυμορφισμών των γονιδίων με τη ΣκΠ σε μία προσπάθεια για δημιουργία καινούργιων θεραπειών για τους ασθενείς και νέα φαρμακολογία για την καταπολέμηση της ΣκΠ.

Κλείνοντας θα αναφέρουμε συμπεράσματα και σκέψεις που θα προκύψουν από τα αποτελέσματα της αναλυτικής διερεύνησης των πολυμορφισμών των γονιδίων INFγ με την ΣκΠ.

¹ <https://www.omim.org/entry/147570?search=INTERFERON%20GAMA%20147570&highlight=147570%20gama%20interferon>

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Συλλογή Δεδομένων

Για τη συλλογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στη βάση δεδομένων Pubmed την 02/10/2018 χρησιμοποιώντας τις λέξεις κλειδιά :

(INFG OR INTERFERON GAMMA OR IFG OR IFI) AND (Multiple sclerosis OR MS OR “disseminated sclerosis” OR “encephalomyelitis disseminata”) AND (GENE OR MUTANT OR MUTATION OR VARIANT OR ALLELE OR POLYMORPHISM OR SNP)

Επιπλέον, έγινε αναζήτηση με:

(INFG OR INTERFERON GAMMA OR IFG OR IFI) AND (Multiple sclerosis OR MS OR “disseminated sclerosis” OR “encephalomyelitis disseminata”) AND (GENE OR MUTANT OR MUTATION OR VARIANT OR ALLELE OR POLYMORPHISM OR SNP) AND META-ANALYSIS

για να διαπιστωθεί αν έχουν πραγματοποιηθεί άλλες αντίστοιχες μελέτες μετα-ανάλυσης .

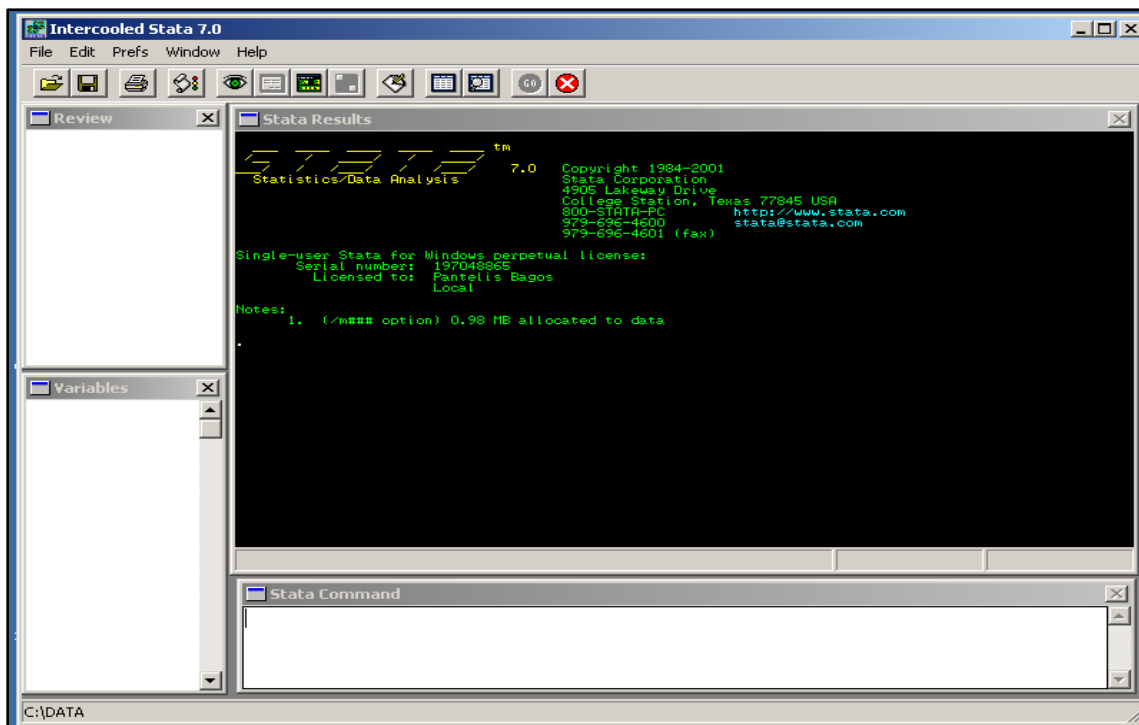
Από τις μελέτες που προέκυψαν από την αναζήτηση αποκλείστηκαν οι εξής:

Μη πρωτογενείς μελέτες. Επίσης μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ζωικά μοντέλα, ακόμη μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρικές σειρές. Ακόμη αποκλείστηκαν οι «In vitro» μελέτες. Επιπλέον μελέτες που δεν περιλάμβαναν πολυμορφισμούς στο IFN γ . Επιπρόσθετα αποβάλαμε μελέτες που δεν αφορούσαν τη ΣκΠ. Έπειτα δεν προσμέτρησαν στην έρευνα, μελέτες που αφορούσαν τη συσχέτιση της έκφραση της ιντερφερόνης- γ με τη ΣκΠ. Τέλος αποκλείστηκαν μελέτες που αφορούσαν την επίδραση φαρμάκων.

Από τις μελέτες που έμειναν έγινε καταγραφή του PMID «PubMed ID» (κωδικοποιημένος αριθμός της βάσης δεδομένων), του συγγραφέα (Author), της χρονολογίας δημοσίευσης της μελέτης (Year), τη χώρα όπου πραγματοποιήθηκε η μελέτη (Country), τη φυλή των πληθυσμών που μελετήθηκαν (Race), τον συνολικό αριθμό των ασθενών (Patients) και των υγιών (Controls) ατόμων κάθε μελέτης. Επιπλέον, έγινε καταγραφή των γονοτύπων όλων των ασθενών και των μαρτύρων. Τα δεδομένα αυτά καταγράφηκαν αρχικά σε φύλλα εργασίας Excel, και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν στο στατιστικό πακέτο Stata.

2.2 Στατιστικό Πακέτο Stata

Όλες οι μετα-αναλύσεις που παρουσιάζονται στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό πακέτο Stata. Το στατιστικό πακέτο Stata είναι ένα λογισμικό που δημιουργήθηκε το 1985 από τη StataCorp στο College Station του Τέξας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής. Το λογισμικό αυτό επιλέχθηκε αρχικά γιατί το περιβάλλον του είναι φιλικό προς το χρήστη, είναι γρήγορο, εύκολο και με καλή ποιότητα γραφικών, ενώ επιπλέον διαθέτει έτοιμες εντολές για διαδικασίες που εφαρμόζονται στις μετα-αναλύσεις, όπως την «metan», «metatrend» και «metaninf».



Εικόνα 4. Η διεπαφή του στατιστικού πακέτου stata.

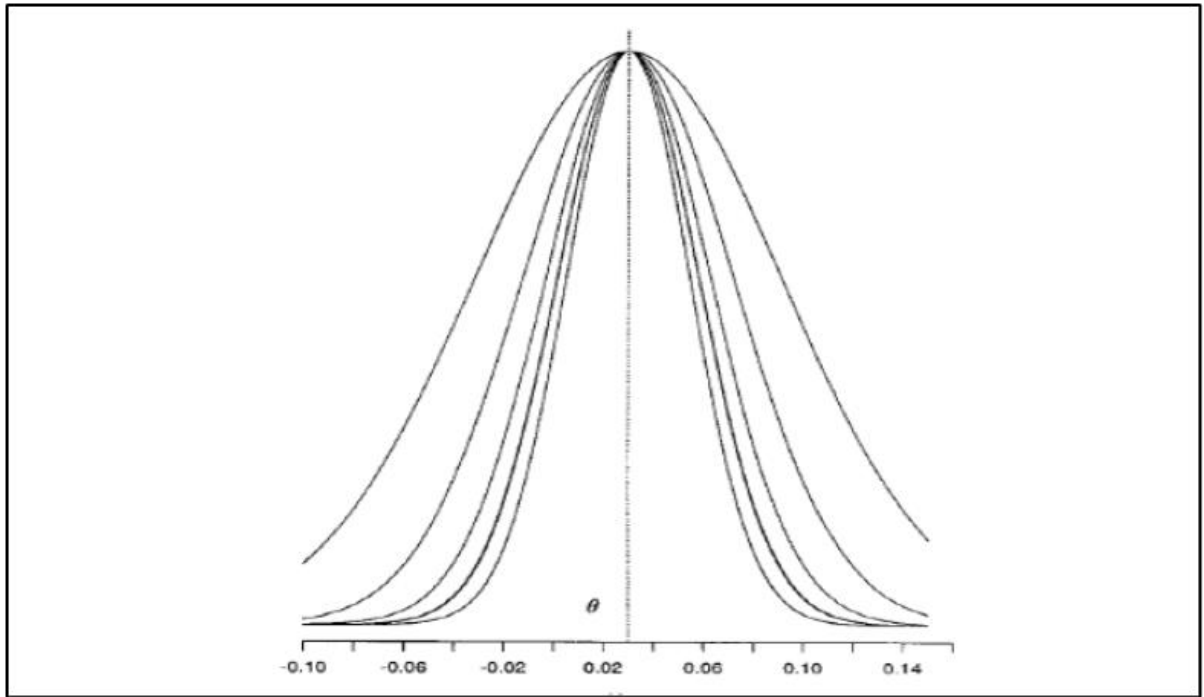
2.3 Στατιστική Ανάλυση

Αρχικά πραγματοποιήθηκε συλλογή και έπειτα ομαδοποίηση των δεδομένων των μελετών που θεωρήθηκαν αξιόπιστες και επιλέχθηκαν προς συμπερίληψη. Ανάλογα με το είδος των δεδομένων, αυτά αναλύθηκαν σύμφωνα με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων (fixed effect model) ή το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (random effect model).

2.3.1 Μοντέλο σταθερών επιδράσεων

Για να εφαρμοστεί το μοντέλο σταθερών επιδράσεων θα πρέπει τα δείγματα (Y_i) να παρουσιάζουν ομοιογένεια, δηλαδή να προέρχονται από έναν κοινό πληθυσμό που χαρακτηρίζεται από κοινό μέγεθος επίδρασης θ . Αν θ , η κεντρική παράμετρος και s_i^2 η διακύμανση όπου $i=1,2,3,\dots,k$ οι ανεξάρτητες μελέτες τότε ο τύπος της στατιστικής ανάλυσης του μοντέλου σταθερών επιδράσεων διαμορφώνεται ως ακολούθως:

$Y_i \sim N(\theta, s_i^2)$ για $i=1, 2, 3,\dots, k$ με διακύμανση γνωστή και θ να είναι το κοινό μέγεθος επίδρασης.



Εικόνα 5: Ένα μοντέλο σταθερών επιδράσεων με τη διανομή πέντε υποθετικών μελετών. Κάθε δείγμα, Y_i , παρέχει τον υπολογισμό μιας κοινής παραμέτρου θ . Η διαφορά μεταξύ των 5 μελετών στηρίζεται στο s_i^2 , δηλαδή πόσο καλά το κάθε δείγμα από κάθε μελέτη υπολογίζει το θ (Carlin, 2000).

2.3.2 Μοντέλο Τυχαίων Επιδράσεων

Σε περιπτώσεις που δεν ισχύει η παραπάνω προϋπόθεση, στα δείγματα εφαρμόζεται το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων. Αν θ_i το μέγεθος επίδρασης κάθε ανεξάρτητης μελέτης και s_i η διακύμανση τότε ο τύπος είναι:

$$Y_i | \theta, s_i^2 \sim N(\theta, s_i^2)$$

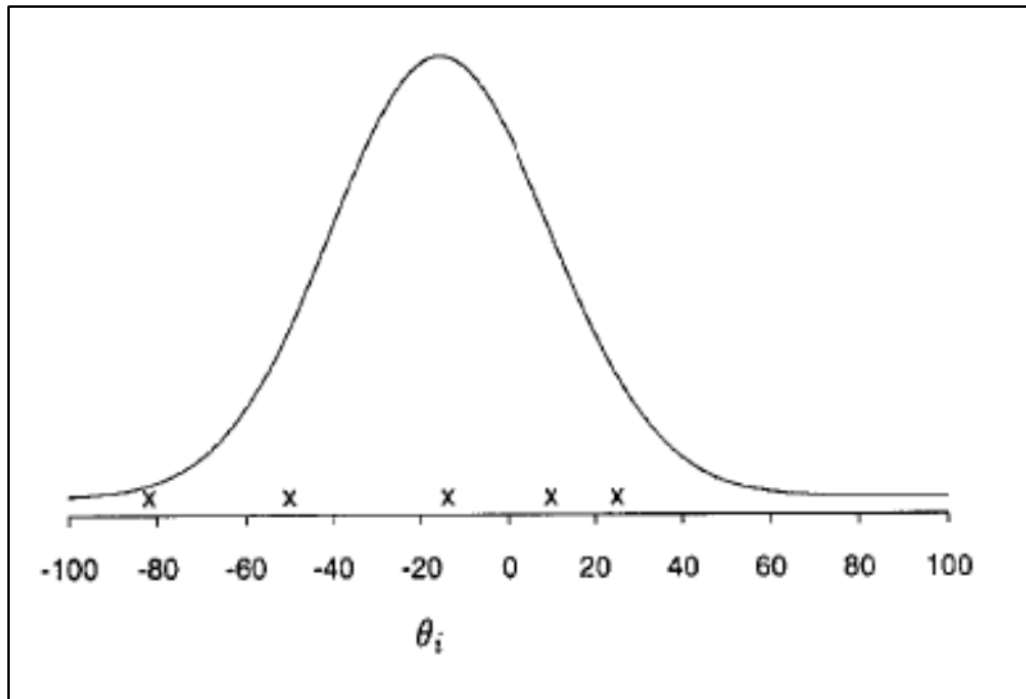
Αν στις μελέτες της μετα-ανάλυσης συμπεριλαμβάνονται πολλοί πληθυσμοί με θ μέση τιμή των μεγεθών επίδρασης όλων των πληθυσμών και τ^2 διακύμανση τότε:

$$\theta_i | \theta, \tau^2 \sim N(\theta, \tau^2)$$

όπου θ και τ^2 έχουν ονομαστεί ως υπερπαραμέτροι, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το κοινό μέγεθος επίδρασης και τη διακύμανση. Επομένως, ο τελικός τύπος της ανάλυσης όλων των πληθυσμών διαμορφώνεται ως εξής:

$$\theta_i | y, \theta, \tau^2 \sim N(B_i \theta + (1-B_i) Y_i, s_i^2 (1-B_i))$$

όπου $y=(Y_1, Y_2, \dots, Y_k)$ και B_i ορίζεται ως $s_i^2 / (s_i^2 + \tau^2)$ με B_i να κυμαίνεται από 0 έως 1, δηλαδή όταν το B_i λαμβάνει τη μέγιστη τιμή, δηλαδή 1 τότε το τ^2 είναι 0 και $\theta_1 = \theta_2 = \dots = \theta_k = \theta$. Επομένως, όταν το τ^2 είναι μηδέν, τότε το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων είναι ίσο με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων (Normand, 1999).



Εικόνα 6: Μοντέλο τυχαίων επιδράσεων με την κατανομή πέντε υποθετικών στατιστικών μελετών (χ). Κάθε μέγεθος επίδρασης θ_i αντιστοιχεί σε έναν υπερπληθυσμό με μέγεθος επίδραση θ και διακύμανση τ^2 (Carlin, 2000).

2.4 Μέγεθος Επίδρασης (Effect Size)

Το μέγεθος επίδρασης αφορά την ένταση της σχέσης δύο μεταβλητών ή αλλιώς το μέγεθος της επίδρασης της έκθεσης στο αποτέλεσμα. Όταν πρόκειται για διερεύνηση συσχέτισης μιας ασθένειας με έναν παράγοντα χρησιμοποιείται συνήθως το odds ratio, το οποίο ορίζεται ως η πιθανότητα να συμβεί ένα γεγονός προς την πιθανότητα να μην συμβεί δηλαδή:

$$\frac{p}{1-p}, \text{ όπου } p \text{ πιθανότητα επιτυχίας}$$

Αν ο λόγος είναι ίσος με μονάδα, τότε ο παράγοντας που μελετάται δε σχετίζεται με την ασθένεια. Αν ο λόγος είναι μεγαλύτερος της μονάδας, τότε ο παράγοντας πιθανότατα σχετίζεται σημαντικά με την ασθένεια. Ωστόσο, θα πρέπει να προσδιοριστεί περαιτέρω αν η συσχέτιση αυτή είναι στατιστικώς σημαντική, μέσω του διαστήματος εμπιστοσύνης.

2.5 Έλεγχος Ετερογένειας

Ο έλεγχος της ετερογένειας πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη στατιστική ανάλυση Q Cochran. Το Q Cochran είναι το άθροισμα των τετραγώνων των διαφορών μεταξύ της εκτίμησης του αποτελέσματος κάθε μελέτης και της συνολικής εκτίμησης του αποτελέσματος, σταθμισμένη για τις πληροφορίες που παρέχονται από την συγκεκριμένη μελέτη (Egger et al, 1997). Ο τύπος που εκφράζει το Q Cochran είναι (DerSimonian & Laird 1986; Villanueva & Zavarsek 2004):

$$Q = \sum w_i (y_i - y_w)^2$$

y_i είναι η εκτίμηση του αποτελέσματος για την κάθε μελέτη,

$$y_w = \frac{\sum w_i y_i}{\sum w_i}$$

είναι η συνολική εκτίμηση του αποτελέσματος και

$$w_i = \frac{1}{s^2}$$

είναι το αντίστροφο της διακύμανσης, s^{-2} για $i=1, \dots, n$

Η στατιστική Q χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ύπαρξης της ετερογένειας, αλλά δεν μπορεί να υπολογίσει την έκταση αυτής.

Η ποσοτικοποίηση των επιπτώσεων της ετερογένειας στη μετα-ανάλυση μπορεί να γίνει μέσω του H^2 που είναι ο λόγος του Q προς τους βαθμούς ελευθερίας μείον ένα ή τον αριθμό των μελετών μείον μία ($k-1$), που εκφράζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$H^2 = \frac{Q}{k-1}$$

ή μέσω του I^2 που περιγράφει το ποσοστό της ετερογένειας μεταξύ των μελετών σε σχέση με τη συνολική μεταβλητότητα (τ^2) μεταξύ των εκτιμήσεων των αποτελεσμάτων. Το τ^2 και το I^2 εκφράζονται από τους παρακάτω τύπους αντίστοιχα:

$$\tau^2 = \frac{Q - (k-1)}{\sum w_i - \frac{\sum w_i^2}{\sum w_i}} \quad I^2 = \frac{\tau^2}{\tau^2 + s^2}$$

Το I^2 παίρνει τιμές από 0-100%. Όταν το I^2 είναι μικρότερο από 25% υπάρχει πολύ μικρή ή καθόλου ετερογένεια. Ένα $I^2 > 50\%$ αντιστοιχεί σε μεγάλη ετερογένεια στις μελέτες για τις οποίες πραγματοποιείται μετα-ανάλυση. Τα I^2 και H^2 συνδέονται με τον παρακάτω τύπο:

$$I^2 = \frac{H^2 - 1}{H^2}$$

Ενώ συνδέοντας το I^2 με το Q έχουμε τον εξής τύπο:

$$I^2 = \frac{Q - k + 1}{Q} * 100\%$$

2.6 Οι Σημαντικότερες Εντολές του Stata

Έχουμε την εντολή `metan` της συγκεντρωτικής μετα-ανάλυσης για όλες τις επιμέρους μελέτες, με την εντολή αυτή εμφανίζεται συγκεντρωτικό το αποτέλεσμα σε πίνακες και με τρόπους απεικονιστικούς. Βασικά χαρακτηριστικά με την συγκεκριμένη εντολή είναι ότι έχουμε τις γραφικές αναπαραστάσεις στα αποτελέσματα που προέκυψαν σε μορφή διαγραμμάτων σε μορφή δέντρου (`forest plot`) συγκεντρωτικά. Στην γραφική παράσταση της εντολής `metan`, έχουμε το αποτέλεσμα από κάθε έρευνα το οποίο αναπαριστάνεται σαν τετράγωνο βαίνοντας την ευθεία γραμμή. Επίσης βλέπουμε την βαρύτητα επίδρασης της κάθε έρευνας, να αντιπροσωπεύεται από το τετράγωνο και το διάστημα εμπιστοσύνης με την ευθεία γραμμή. Τέλος σαν ρόμβο αναπαρίσταται η ολική επίδραση από όλες τις έρευνες συνδυασμένα με το συνολικό διάστημα εμπιστοσύνης.

Η προκατάληψη σε μια μετα-ανάλυση μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο κατηγορίες:

μοντέλα ακριβείας και επιλογής. Θα επικεντρωθούμε στην πρώτη ομάδα των μεθόδων, που έχουν εφαρμοστεί στο Stata μέσω των εντολών, `confunnel`, `metatrim` και `metabias`. Ωστόσο, πρέπει πάντοτε να θυμόμαστε ότι αυτή η προσέγγιση δίνει πληροφορίες σχετικά με την παρουσία προσωρινών αποτελεσμάτων της μελέτης, με τα οποία μπορεί να σχετίζεται ή όχι η πραγματική προκατάληψη της δημοσίευσης.

Η εντολή που σχεδιάζει την τυπική χοάνη `plot22` και απαιτεί δύο μεταβλητές εισόδου. Το `logRR` και το `selogRR` είναι οι δύο μεταβλητές που περιέχουν το παρατηρούμενο αποτέλεσμα στις μελέτες και τα Standard Error τους.

Η `metabias` μπορεί να προστεθεί για την εμφάνιση των μελετών σε υποομάδες (χρησιμοποιώντας διαφορετικά σχήματα και χρώματα) σύμφωνα με μια μεταβλητή ομαδοποίησης. Ένας περιορισμός του τυπικού σχεδίου χοάνης δεν εξηγεί εάν η φαινομενική ασυμμετρία οφείλεται σε προκατάληψη δημοσίευσης ή άλλους λόγους, όπως γνήσια ετερογένεια μεταξύ μικρών και μεγάλων μελετών ή διαφορών στη βασική γραμμή των συμμετεχόντων. Μπορούν να γίνουν σχέδια χοάνης με ενισχυμένο περίγραμμα αντί για σκιασμένες περιοχές που έχουν προστεθεί στο γράφημα για να υποδείξει εάν οι μελέτες που λείπουν βρίσκονται στους τομείς όπου υπάρχει στατιστική σημαντικότητα (π.χ., τιμή $p < 0,05$). Εάν μη σημαντικές μελέτες έχουν δημοσιευτεί, είναι απίθανο να οφείλεται η ασυμμετρία στην προκατάληψη δημοσίευσης.

Η εντολή `metabias` μπορεί να χωρέσει τέσσερα διαφορετικά μοντέλα παλινδρόμησης. Αυτές είναι οι δοκιμές Egger (επιλογή `egger`), το Harbord's test (επιλογή `harbord`), το Peter's test (επιλογή `peter`) και το τεστ συσχέτισης κατάταξης από τον Begg και τον Mazumdar (εναλλακτική επιλογή). Για μια γενική προσέγγιση όπου τα μεγέθη των αποτελεσμάτων της μελέτης (αποτέλεσμα) υποχωρούν στα τυπικά τους σφάλματα (`se`) τότε παίρνουμε `metabias se`, μοντέλο ή για διχοτομικά δεδομένα. Η γραμμή παλινδρόμησης που εκτιμάται από τη δοκιμή του Egger μπορεί επίσης να προστεθεί στο διάγραμμα διοχέτευσης προσθέτοντας την επιλογή `egger` στην εντολή `metafunnel`. Η μέθοδος περικοπής και πλήρωσης στοχεύει στην εκτίμηση της συνοπτικής επίδρασης σαν να ήταν συμμετρική η γραφίδα, υποθέτοντας ότι η προκατάληψη δημοσίευσης είναι η μόνη εξήγηση της ασυμμετρίας.

Οι εντολές στο STATA

Ο υπολογισμός του odds ratio και του standard error μέσω του στατιστικού πακέτου Stata γίνεται με τις εξής εντολές:

```
generate odaa=log(( bb1* nobb0)/( bb0* nobb1))
```

Η εντολή «generate» δημιουργεί την μεταβλητή odaa όπου αντιπροσωπεύει το odds ratio σε λογαριθμική κλίμακα.

```
replace odaa=log(((0.5+ bb1)*(0.5+ nobb0))/((0.5+ bb0)*(0.5+ nobb1))) if bb1==0| nobb0==0|  
bb0==0| nobb1 ==0
```

Σε περίπτωση μηδενικού κελιού, προστίθενται ο αριθμός 0.5 σε όλα τα κελιά.

```
generate stdaa=sqrt(1/ bb1+1/ nobb1+1/ bb0+1/ nobb0)
```

Η εντολή «generate» δημιουργεί την μεταβλητή που αντιπροσωπεύει το Standard error του odds ratio.

```
replace          stdaa=sqrt(1/(bb1+0.5)+1/(nobb1+0.5)+1/(bb0+0.5)+1/(nobb0+0.5))          if  
bb1==0|nobb0==0| bb0==0| nobb1==0
```

Σε περίπτωση μηδενικού SE, προστίθενται ο αριθμός 0.5 σε όλα τα κελιά α

Αν υπάρχει κάπου μηδέν το κάνει αντικατάσταση με 0.5, γιατί δεν θέλουμε μηδέν στον παρονομαστή.

```
replace stdor=sqrt(1/( b1+0.5)+1/( a1+0.5)+1/( b0+0.5)+1/( a0+0.5)) if b1==0| a1==0| b0==0|  
a0==0
```

Έγινε μετα-ανάλυση σύμφωνα με το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων

```
metan oral stdor, eform random label(namevar=author, yearvar=year) xlab(0.1,1,3)
```

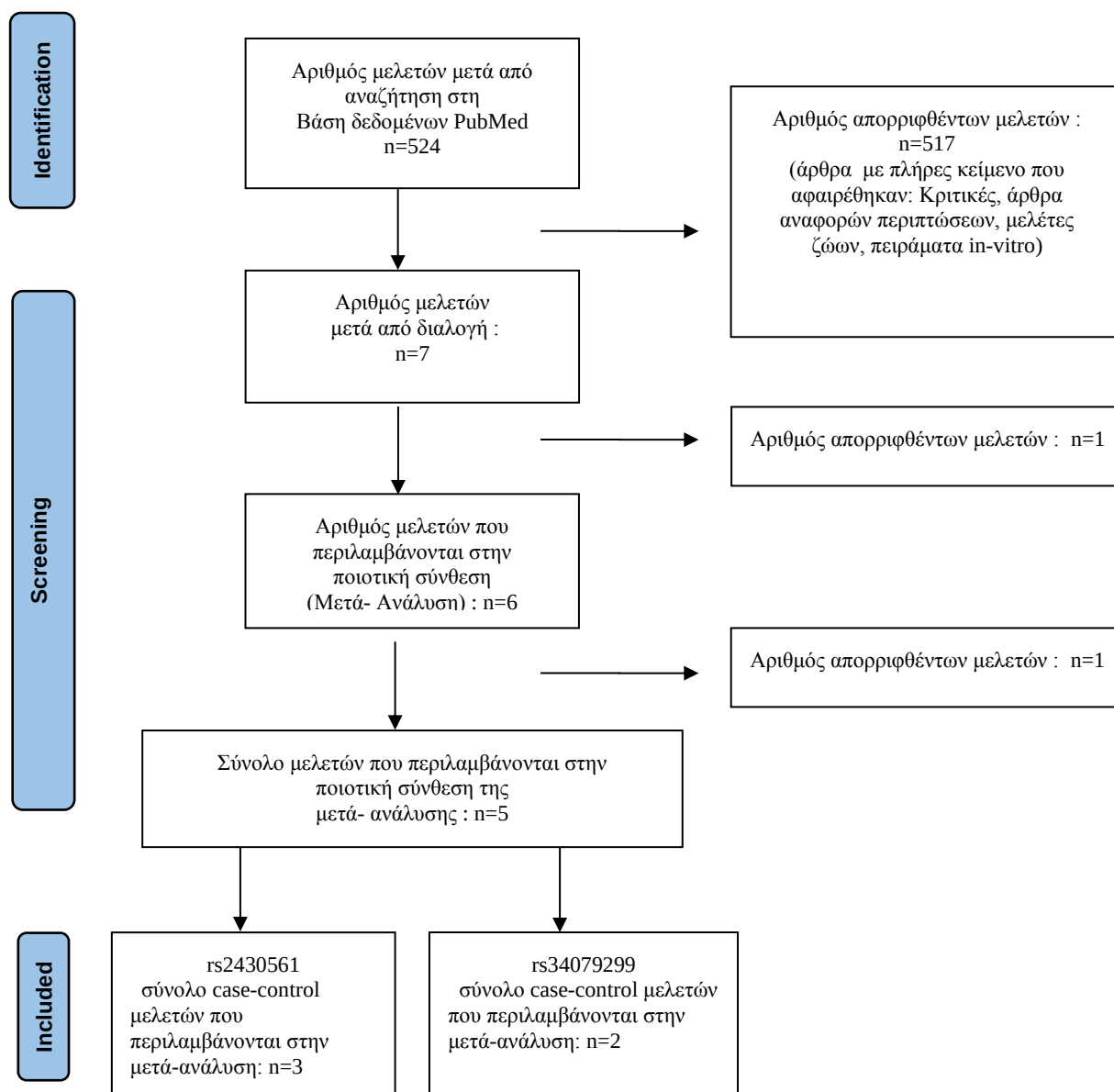
αντίστοιχα.

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

Στη συγκεκριμένη μελέτη κάναμε συστηματική ανασκόπηση για την διερεύνηση γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμών κυτταροκινών (όπως INF- γ) με Σκλήρυνση κατά Πλάκας. Μετά από αναζήτηση στη διεθνή βιβλιογραφία με τις σχετικές λέξεις κλειδιά και συγκεκριμένα στη βάση δεδομένων PubMed, βρήκαμε 524 μελέτες.- στις 02/10/2018. -Ελέγξαμε τους τίτλους, τις περιλήψεις αυτών ή και ολόκληρα άρθρα και καταλήξαμε να χρησιμοποιήσουμε οκτώ μελέτες. Αυτές χρησιμοποιήθηκαν στην ποιοτική σύνθεση και περιείχαν πληροφορίες για πολυμορφισμούς της ιντερφερόνης γάμα που συσχετίζονται με την σκλήρυνση κατά πλάκας. Για τον πολυμορφισμό rs2430561 βρέθηκαν 3 μελέτες, ο δεύτερος πολυμορφισμός, που ήταν ο rs34079299, βρέθηκε σε δύο άρθρα, για τον τρίτο πολυμορφισμό rs2069727 βρέθηκαν μόλις μία μελέτη και για τον τέταρτο πολυμορφισμό C >T στη θέση -333, ανοδικά της έναρξης μεταγραφής και μέσα στον υποκινητή, μόλις μία μελέτη.

Σε όλα τα σημεία της έρευνα ήταν συμβατή με τους κανόνες στα εγχειρίδια της Cochrane library για συστηματικές ανασκοπήσεις, ακόμα και στην μετα-ανάλυση. Επιπλέον ακολουθήσαμε όλες τις οδηγίες του πρωτοκόλλου PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyse) (Page et al., 2021) με σκοπό η διασφάλιση μία σαφούς παρουσίας και τυποποίησης στα βήματα που χρειάζονται για να διενεργηθούν η συστηματική ανασκόπηση καθώς επίσης και η μετα-ανάλυση. Οι προκαθορισμένες λίστες με τα απαιτούμενα στοιχεία και τα διαγράμματα ροής τεσσάρων φάσεων ώστε να διασφαλιστεί η ακεραιότητα της έρευνας φαίνονται στο διάγραμμα ροής PRISMA (εικόνα 7).

Μετά από αναζήτηση και έλεγχο των μελετών συμπεριληφθήκαν στην μετά-ανάλυση μόνο οι μελέτες που πληρούσαν τα κριτήρια επιλογής. Απορρίψαμε δηλαδή τις μελέτες που δεν ήταν αποδεκτές επειδή αναφέρονταν σε άλλους πολυμορφισμούς, σε έρευνες που είχαν γίνει σε ζώα (ποντίκια, κλπ), κριτικές, άρθρα αναφορών περιπτώσεων, ενώ τέλος απορρίψαμε τα πειράματα in-vitro.



Εικόνα 7. Πρωτόκολλο PRISMA διάγραμμα ροής, που μας δείχνει πόσα άρθρα κρατήθηκαν για μελέτη και πόσα απορρίφθηκαν στις διαφορετικές φάσεις, της συστηματικής ανασκόπησης και μετα-ανάλυσης.

3.1 Πολυμορφισμοί Γονιδίων

Οι επτά μελέτες ανέφεραν δεδομένα από τέσσερις πολυμορφισμούς. Οι τρεις περιείχαν δεδομένα για τον **rs2430561** και οι δυο για τον **rs34079299**. Για τους πολυμορφισμούς rs2069727 και για την αντικατάσταση C σε T στην θέση –333 υπήρχε από μια μελέτη μόνο, οπότε και δεν μπορούσε να διενεργηθεί μετα-ανάλυση **Πίνακας 1**.

Πίνακας 1. Πολυμορφισμοί του γονιδίου της INFγ και ο αριθμός των μελετών που βρέθηκαν να παρουσιάζουν σχετικά δεδομένα.	
Είδη πολυμορφισμού (SNP)	Αριθμός μελετών
rs2069727	1
rs34079299	2
rs2430561	3
C σε T στην θέση 333	1

Οι μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν για την μετα-ανάλυση της συσχέτισης των δυο πολυμορφισμών με τη σκλήρυνση κατά πλάκας φαίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Εύρεση πολυμορφισμών IFN-γ σε σχετικές μελέτες που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.					
A/A	PubMed ID Studies /articles	AUTHOR	YEAR	IFN-γ (+874) rs2430561	IFNG rs34079299
1	20228669	Izad et.al.	2010	X	-
2	19543959	Shokrgozar	2009	X	-
3	17301401	Izad	2004	X	-
4	11475438	Dai	2001	-	X
5	10505747	Goris	1999	-	X

3.2 Γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561 INF - γ (+874) T/A με τη νόσο Σκλήρυνσης κατά πλάκας

Όπως αναφέρθηκε στα προηγούμενα επιλέχθηκαν τρεις χαρακτηριστικές μελέτες/άρθρα για τις ανάγκες της μετα-ανάλυσης της παρούσας εργασίας. Τα εν λόγω άρθρα χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την ανάλυση του πολυμορφισμού rs2430561 του γονιδίου της IFN-γ (+874) T/A, η οποία ευρέθη σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας. Οι ασθενείς που μελετήθηκαν ανήκαν στην γεωγραφική περιοχή της νότιας Ασίας.

Παρακάτω στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά των μελετών που αφορούν το πολυμορφισμό rs2430561(πχ. PMID, γεωγραφική περιοχή, έτος έρευνας, αριθμός ασθενών, αριθμοί γονοτύπων και αλληλόμορφων της κάθε μελέτης που χρησιμοποιήθηκε στην μετα-ανάλυση).

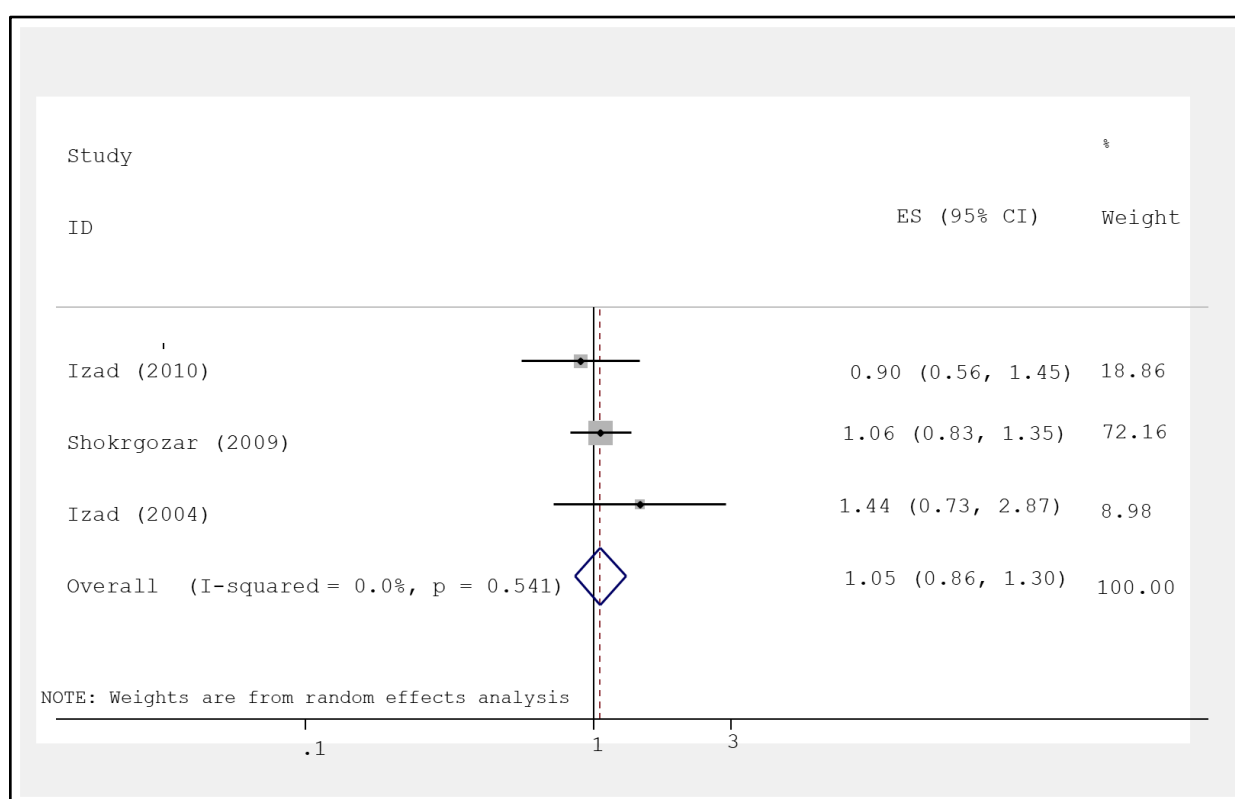
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Χαρακτηριστικά των μελετών για τον πολυμορφισμό rs2430561 [INF - γ (+874)T/A]

									Ασθενείς		Υγιείς		Ασθενείς			Υγιείς			Ασθενείς		Υγιείς	
A/A	PMID	AUTHOR	YEAR	COUNTRY	RACE	total individuals	CASES	CONTROLS	A	T	A	T	AA	AT	TT	AA	AT	TT	noAT1	noTT1	noAT0	noTT0
1	20228669	Izad	2010	Iran	South Asians	151	98	53	104	92	59	47	24	56	18	15	29	9	80	74	44	38
2	19543959	Shokrgozar	2009	Iran	South Asians	563	209	354	230	188	380	328	58	114	37	123	134	97	172	151	257	231
3	17301401	Izad	2004	Iran	South Asians	66	33	33	33	33	27	39	7	19	7	4	19	10	26	26	23	29

3.3 Έλεγχος Συσχέτισης του πολυμορφισμού rs2430561 [INF - γ (+874) T/A] με την Σκλήρυνση κατά Πλάκας, σύμφωνα με το Συνεπικρατές Μοντέλο Κληρονομικότητας

Αρχικά, επιτελέστηκε έλεγχος της γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού INF-γ “rs2430561” με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας. Πραγματοποιήθηκε μετά-ανάλυση και έγινε ο υπολογισμός εκτιμητών για τις συγκρίσεις. Ως εκτιμητής μεγέθους επίδρασης στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Odds Ratio (OR), ενώ η μετά-ανάλυση (metan) έγινε σύμφωνα με το μοντέλο των σταθερών επιδράσεων. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

metan oral stdor, eform fixed label (namevar=author, yearvar=year) xlab (0.1,1,3)



Εικόνα «8» Διάγραμμα Forest plot της εντολής metan. Στα αριστερά παρουσιάζεται το όνομα του συγγραφέα της κάθε μελέτης μαζί με την χρονολογία. Στα δεξιά παρουσιάζεται το Odds Ratio (OR), τα διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) και το βάρος (Weight) της κάθε μελέτης. Η σταθερή κατακόρυφη γραμμή αντιστοιχεί σε OR=1, η διακεκομμένη κατακόρυφη γραμμή διέρχεται από το συνολικό OR της μετά-ανάλυσης. Οι μελέτες είναι ταξινομημένες σύμφωνα με το έτος που δημοσιεύτηκαν.

Από το διάγραμμα του Forest Plot προκύπτει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561[INF - γ (+874) T/A] με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) για τον συνεπικρατή μοντέλο κληρονομικότητας, διότι το συνολικό OR είναι 1.05 (95% CI: 0.86, 1.30) και το διάστημα εμπιστοσύνης περιλαμβάνει το 1.

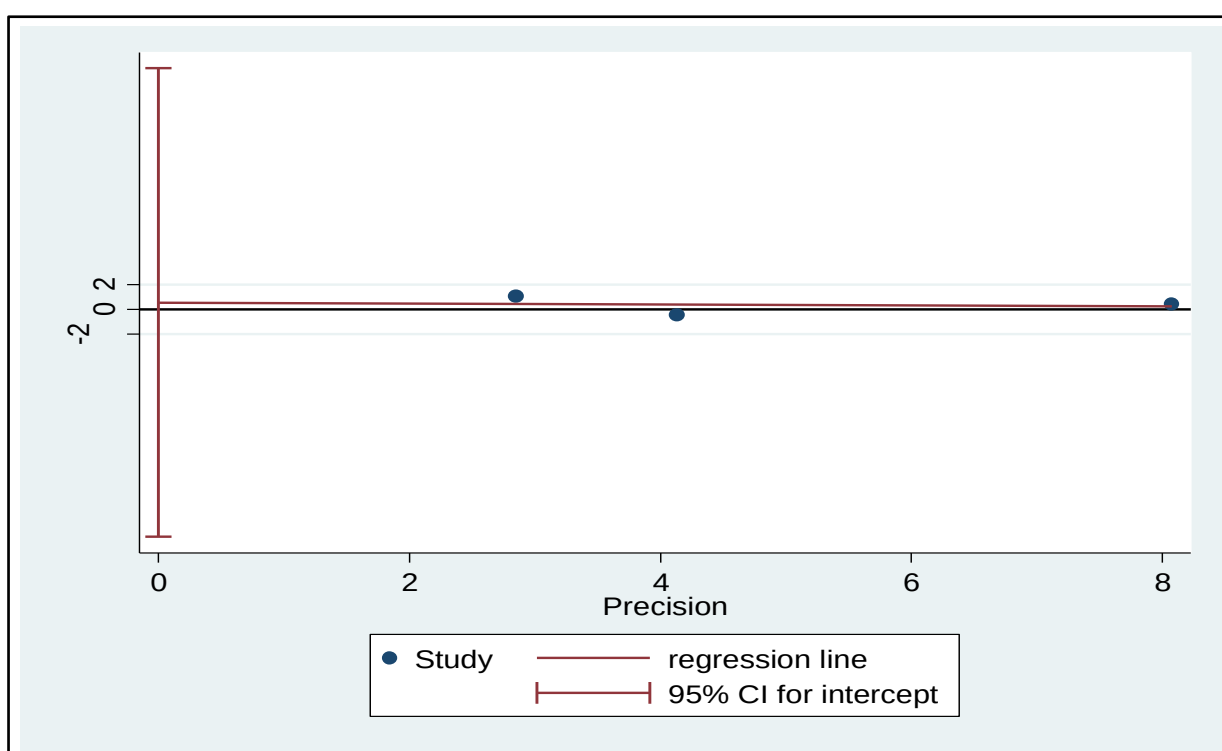
Το p-value της ετερογένειας είναι 0, 541.

Επειδή το p-value της ετερογένειας είναι $=0,541 > 0.05$ και I^2 (Inconsistency Index)=0 (δείκτης ασυνέπειας) δεν υπάρχει ετερογένεια.

Οι 3 μελέτες αφορούν πληθυσμούς από την νότια Ασία (συγκεκριμένα από το Ιράν),

Εν συνεχεία, έγινε έλεγχος της ύπαρξης ή μη τυχόν σφάλματος δημοσίευσης με το Test του Begg. Μέσω της γραφικής απεικόνισης Funnel plot επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των ανωμαλιών των ακραίων τιμών, καθώς και ανίχνευση εάν υπάρχει συμμετρία ως προς την κατανομή των μελετών ώστε να μην υπάρχει μεροληψία (bias). Υπάρχουν περιπτώσεις να εμφανίζεται ασυμμετρία στη γραφική απεικόνιση, πλην όμως μπορεί να μην οφείλονται σε σφάλμα δημοσίευσης αλλά σε άλλους παράγοντες όπως η ύπαρξη ετερογένειας μεταξύ των πληθυσμών των μελετών. Σε περίπτωση μη συμμετρικής κατανομής τότε υπάρχει μεροληψία (bias). Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, επειδή το $p\text{-value}=0,780 > 0.05$ δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

metabias oral stdor, egger graph



Εικόνα «9» Διάγραμμα ελέγχου της ύπαρξης ή μη Συστηματικού Σφάλματος Δημοσίευσης κατά τους Egger και συνεργατών. Έγινε ένα τεστ γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ των σταθερών εκτιμήσεων των αποτελεσμάτων (logOR) και της ακρίβειας ($1/SE_{\log OR}$). Το αποτέλεσμα είναι η ευθεία παλινδρόμησης τέμνει τον άξονα των y και υπάρχει συμμετρία στην κατανομή των μελετών ως προς αυτήν την ευθεία. Έτσι δεν υπάρχει ένδειξη ύπαρξης συστηματικού σφάλματος.

Επειδή το p-value είναι 0.780 (Test of H_0 : no small-study effects) και το CI=95% και επειδή είναι συμμετρικά κατανομημένες και οι δύο κουκίδες των μελετών δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης ή προκατάληψη για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας, για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561 [INF-γ (+874) T/A] με τη Σκλήρυνση κατά Πλάκας.

Οι εμπειρισττωμένες συστηματικές ανασκοπήσεις σύμφωνα μιλώντας την γλώσσα της εγκυρότητας και της αξιοπιστίας με επιστημονικές υποθέσεις, μας οδηγεί σε ανεύρεση μεγάλο

φάσμα από μελέτες. Κατά την διάρκεια της έρευνας για βιβλιογραφικές αναφορές θα έχουμε τα παρακάτω προβλήματα που θα συναντήσουμε:

1. Έχουμε τις γκρίζες βιβλιογραφίες με έρευνες που δεν θα τις δημοσιεύσουν διότι έχουν σημαντικές ελλείψεις σε στατιστικά αποτελέσματα.
2. Ξενόγλωσσες βιβλιογραφίες με έρευνες από χώρες με απουσία χρήσης αγγλικής γλώσσας παραδείγματος χάρη χρησιμοποιούν κινέζικα και ρωσικά. Επίσης κάνουν δημοσίευση σε τοπικές καταχωρήσεις περιοδικών ανεπίσημων βάσεων δεδομένων. Συνεπώς οι μελετητές να έχουν απώλεια πολύτιμων δεδομένων.
3. Όταν ακούμε για το <<Φαινόμενο του Πρωτέα>> η μελέτη θα παρουσιάζει σφάλματα στατιστικά, θα έχει γρήγορο επισφαλές αποτέλεσμα με πιθανότητα κινδύνου υπερεκτίμησης γενετικού παράγοντα.

Πολλές φορές για να καταλάβουμε αν υφίσταται ή όχι σφάλμα χρησιμοποιούμε γράφημα <<funnelplot>> και με την χρήση τους βρίσκουμε πιθανά σφάλματα ή συστηματική ανομοιομορφία ανάμεσα στις μελέτες στην μετα-ανάλυση.

Όποτε συνολικά οι μελέτες μας κατανέμονται στα διαγράμματα σε αυτές τις περιπτώσεις να υπάρχει σφάλμα είναι περίπου αδύνατες οι περιπτώσεις, όμως σε περίπτωση που τα διαγράμματα συμβαίνουν έχουν ανομοιόμορφες κατανομές στις μελέτες άρα ενδέχεται να έχουμε σφάλματα που πιθανότατα να οφείλονται σε πολλές διαφορετικές αιτίες.

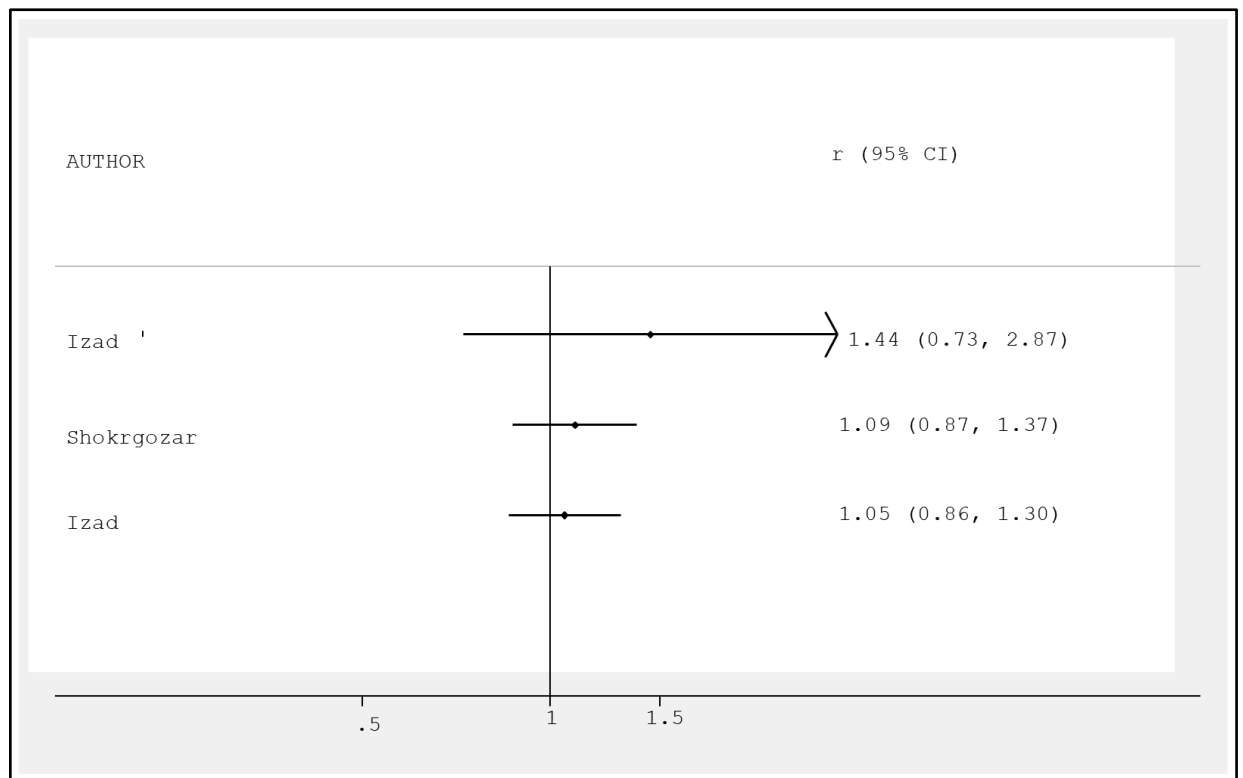
Τότε ο ερευνητής ελέγχει προσεκτικά τις πιθανές αιτίες στην ασυμμετρία. Ακόμη τα <<funnel plots>> σε περίπτωση που υφίσταται συμμετρία δεν θα πραγματοποιούνται μεροληψίες (bias), αλλά στις ασυμμετρίες θα παρουσιάζονται μεροληψίες.

Υπάρχει ενδεχόμενο να μην υπάρχουν σφάλματα συστηματικά που όμως να οφείλονται στις ετερογένειες των πληθυσμών που παρουσιάζονται σε όλες τις μελέτες. Η χρησιμοποίηση σε στατιστικές δοκιμασίες είναι απαραίτητες για να βρούμε την ασυμμετρία του <<funnel plot>>

(παραδείγματος χάριν η δοκιμασίες στην γραμμική παλινδρόμηση Egger και οι δοκιμασίες των βαθμών συσχέτισης Begg).

Κατόπιν, υλοποιήθηκε αθροιστική μετα-ανάλυση. Η αθροιστική μετα-ανάλυση πραγματοποιείται αρχικά με μία μελέτη, έπειτα προστίθεται η δεύτερη μελέτη και πραγματοποιείται μία δεύτερη μετα-ανάλυση. Η διαδικασία συνεχίζεται έως ότου να συμπεριληφθεί το σύνολο των μελετών. Αυτό δεν σημαίνει πως πρόκειται για μία διαφορετική ανάλυση από την τυπική αλλά για ένα μηχανισμό αποτύπωσης μίας σειράς αναλύσεων σε μία γραφική παράσταση ή πίνακα. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

```
metacum oral stdor,effect(r)graph xlab(0.5,1,1.5) eform lcols(author)
```

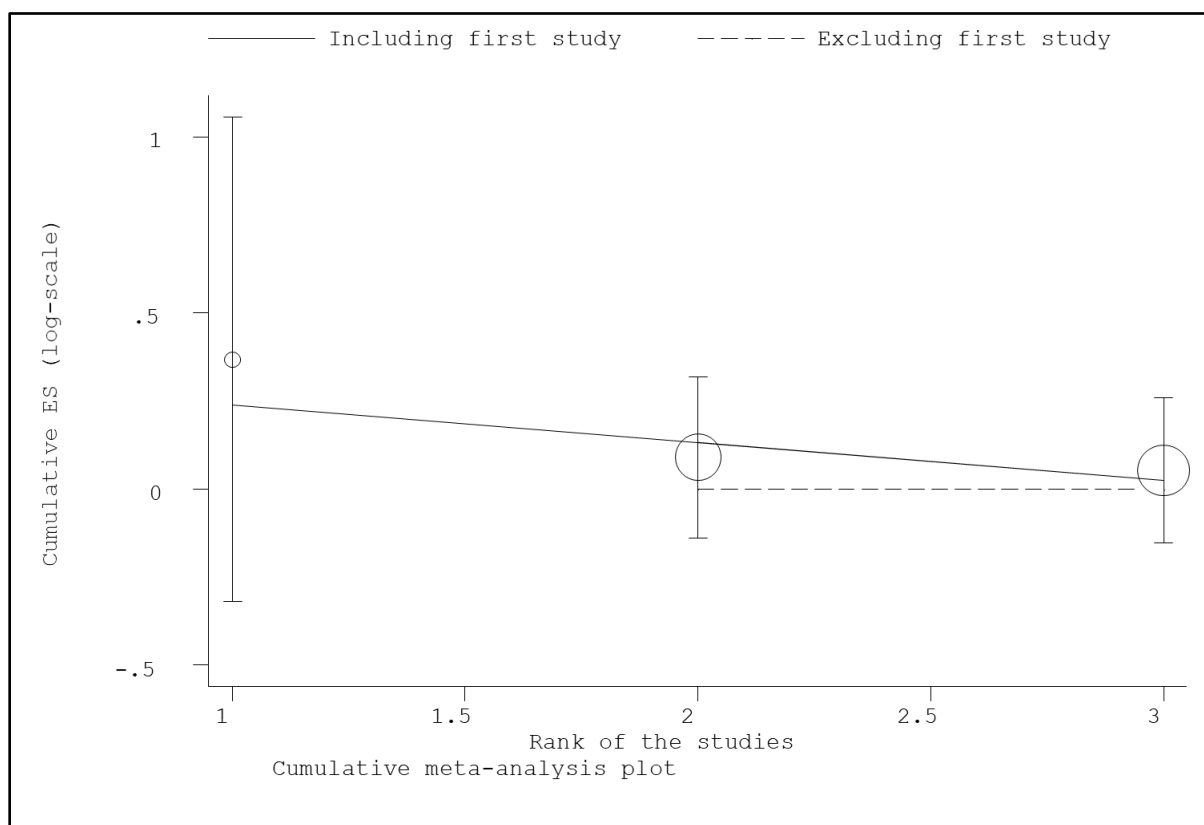


Εικόνα «10» Με την εντολή *metacum* εκτελείται αθροιστική μετα-ανάλυση. Παρέχονται αθροιστικές συνολικές εκτιμήσεις, όρια εμπιστοσύνης καθώς και μία δοκιμή που επιβεβαιώνει ότι η πραγματική συνολική επίδραση είναι μηδενική.

Δεν φαίνεται να υπάρχει μελέτη στην οποία ο πολυμορφισμός να συσχετίζεται με διαφορετικό τρόπο από ότι στο σύνολο των μελετών. Μετά από την εκτέλεση της αθροιστικής μετα-ανάλυσης δεν υπάρχει διαχρονική τάση για την συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561 [INF-γ (+874) T/A] με τη Σκλήρυνση κατά Πλάκας σύμφωνα με το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.

Μετέπειτα, υλοποιήθηκε αθροιστική μετα-ανάλυση με τη Μέθοδο των Τυχαίων Επιδράσεων. Πιο συγκεκριμένα, όταν τα αποτελέσματα μιας μελέτης είναι πολύ στατιστικά σημαντικά τότε μπορεί να επηρεάσει και τις υπόλοιπες μελέτες που θα ακολουθήσουν (Φαινόμενο του Πρωτέα). Για να λυθεί το πρόβλημα αυτό πραγματοποιείται η «metatrend» ανάλυση, δηλαδή η διαδικασία κατά την οποία αφαιρείται η πρώτη μελέτη από το σύνολο των μελετών και έτσι μπορούν να συγκριθούν τα αποτελέσματα με ή χωρίς την πρώτη μελέτη. Εκτελέστηκαν δύο δοκιμές, προκειμένου να ελεγχθεί το «Φαινόμενο του Πρωτέα». Η πρώτη δοκιμή είναι η αποκαλούμενη «first vs subsequent». Στη δεύτερη δοκιμή εκτελείται η μέθοδος παλινδρόμησης με χρήση γενικευμένων ελαχίστων τετραγώνων. Κατά την εκτέλεση της αθροιστικής μετα-ανάλυσης μπορεί να προκύψει ένα πρόβλημα το οποίο σχετίζεται με την πρώτη μελέτη. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

metatrend oral stdor

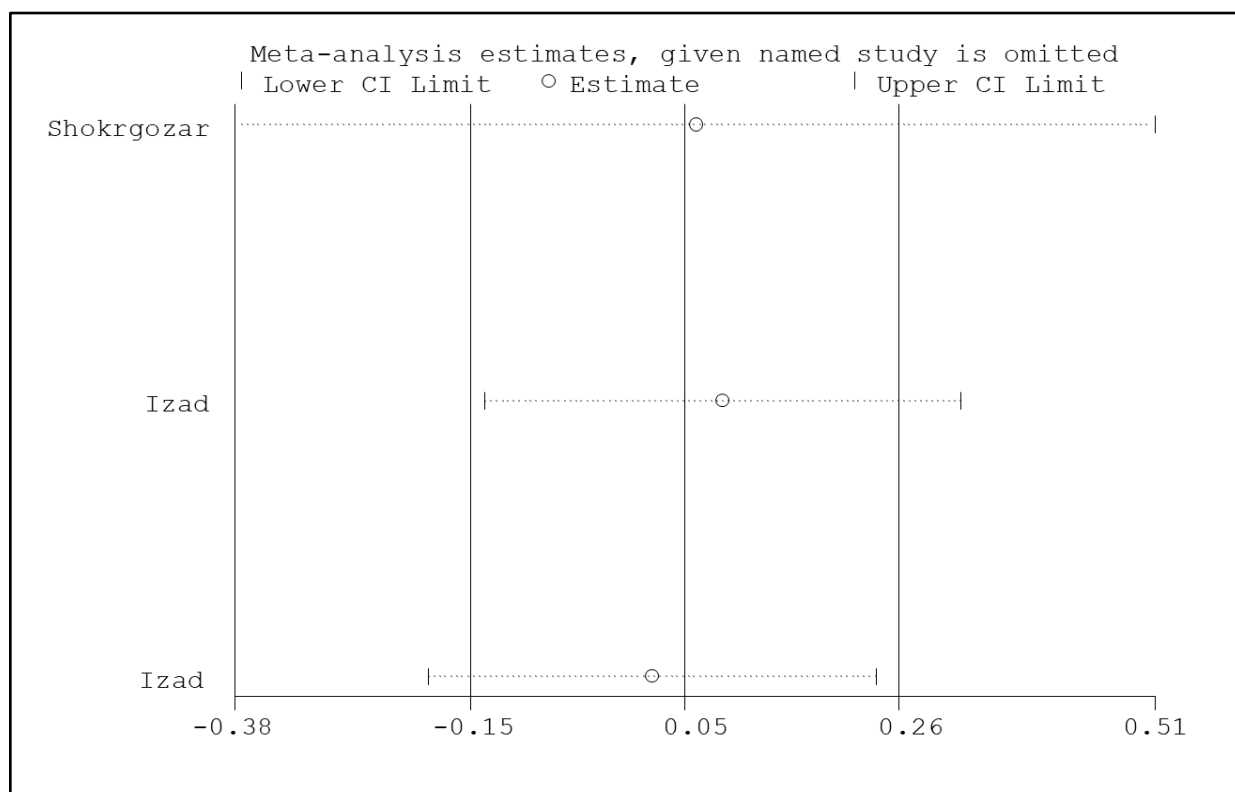


Εικόνα «11» Δεν υπάρχει διαχρονική τάση από το φαινόμενο του Πρωτέα όπως προκύπτει από την εντολή «metatrend» για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561 με τη ΣκΠ για το συνεπικρατή μοντέλο κληρονομικότητας.

Επειδή $p\text{-value}=0,347>0.05$, εάν αποκλειστεί η πρώτη μελέτη, πρακτικά σημαίνει ότι το $p\text{-value}$ δεν επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από την αφαίρεση, κατά περίπτωση, μιας μελέτης και άρα δεν υπάρχει το φαινόμενο του Πρωτέα.

Τέλος, υλοποιείται ένα ακόμα βήμα αυτό της αφαιρετικής μετά-ανάλυσης προσδιορισμού του βαθμού επιρροής της κάθε μελέτης. Πραγματοποιήθηκε αφαιρετική μετα-ανάλυση, σε περίπτωση που απομακρύνουμε μία μελέτη από το σύνολο επομένως όποτε μειώνουμε μία μελέτη θα υπολογίσουμε το OR όσων θα απομείνουν, με άλλα λόγια επιτυγχάνουμε με την αφαίρεση μίας μελέτης κάθε φορά και τη διεξαγωγή μετα-ανάλυσης, με σκοπό τον προσδιορισμό του βαθμού επιρροής της κάθε μελέτης. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

```
metaninf oral stdor,random eform label(namevar=author) [5]
```



Εικόνα «12» Το forest plot της αφαιρετικής μετά-ανάλυσης με την εντολή «metaninf» της για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού RS2430561 [INF-γ (+874) T/A] με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) για τον συνεπικρατή μοντέλο κληρονομικότητας έδειξε ότι δεν υπάρχει επιδραστική μελέτη, δεν φαίνεται να υπάρχει μελέτη στην οποία ο πολυμορφισμός να συσχετίζεται με διαφορετικό τρόπο από ότι στο σύνολο των μελετών.

Με το διάγραμμα αφαιρετικής μετά-ανάλυσης «metaninf» φαίνονται στα αριστερά ο συγγραφέας της κάθε μελέτης που αφαιρείται από το συνολικό OR και προκύπτει η τιμή που δείχνει ο μικρός κύκλος. Η μεσαία κάθετος γραμμή δείχνει το συνολικό OR και οι άλλες δυο κάθετες γραμμές (αριστερή και δεξιά) το συνολικό διάστημα εμπιστοσύνης. Η διαδικασία πραγματοποιείται με την απομόνωση και αφαίρεση μίας μελέτης κάθε φορά από το σύνολο των μελετών για να εφαρμοστεί η μετα-ανάλυση με τις εναπομείναντες μελέτες με σκοπό την εξακρίβωση κατά πόσο μεταβάλλει η κάθε μελέτη μεμονωμένα το ολικό αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης, δηλαδή ποια μελέτη αν την προσθέσουμε σε μια μετα-ανάλυση θα επηρεάσει δραστικά το αποτέλεσμα. Όπως φαίνεται και από το σχήμα δεν υπάρχει μελέτη η αφαίρεσή της

οποίας να διαφοροποιεί την κατεύθυνση του αποτελέσματος, δηλαδή την ανυπαρξία συσχέτισης του πολυμορφισμού rs2430561 με την ΣκΠ

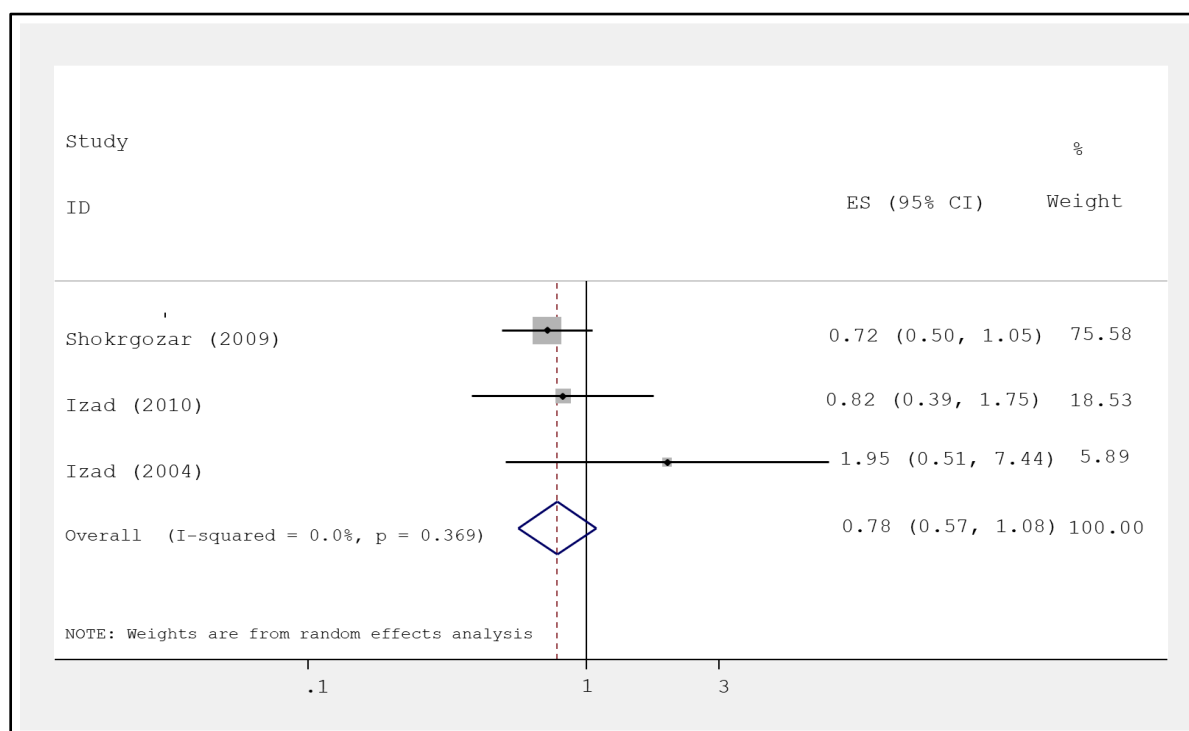
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Συγκεντρωτικός πίνακας μετα-ανάλυσης για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.			
Study	OR	95% Conf. Interval	% Weight
Izad (2010)	0.901	0.560, 1.448	18.86
Shokrgozar (2009)	1.056	0.828, 1.346	72.16
Izad (2004)	1.444	0.726, 2.875	8.98
OR	1.054	0.858, 1.295	100.00

Στο παραπάνω συγκεντρωτικό πίνακα του συνεπικρατές μοντέλου κληρονομικότητας παρατηρώ πως το διάστημα εμπιστοσύνης 95% είναι από 0.86 ως 1.30 επομένως δεν είναι στατιστικά σημαντικό γιατί περιέχει την μονάδα.

3.4 Έλεγχος Συσχέτισης του πολυμορφισμού rs2430561 [INF - γ (+874) T/A] με την Σκλήρυνση κατά Πλάκας, σύμφωνα με το Υπολειπόμενο Μοντέλο Κληρονομικότητας (Γονότυποι AA vs AT+TT)

Κατά τον έλεγχο της συσχέτισης του πολυμορφισμού INF-γ “rs2430561” με την Σκλήρυνση κατά Πλάκας, σύμφωνα με το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας, αρχικά πραγματοποιήθηκε μετά-ανάλυση και έγινε ο υπολογισμός εκτιμητών για τις συγκρίσεις. Ως εκτιμητής επίδρασης (παράμετρος) στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Odds Ratio (OR), ενώ η μετά-ανάλυση (metan) έγινε σύμφωνα με το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

```
metan oada stdaa,eform random label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)
```



Εικόνα «13» Διάγραμμα Forest plot της εντολής metan. Στα αριστερά παρουσιάζεται το όνομα του συγγραφέα της κάθε μελέτης μαζί με την χρονολογία. Στα δεξιά παρουσιάζεται το Odds Ratio (OR), τα διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) και το βάρος (Weights) της κάθε μελέτης. Η συμπαγής κατακόρυφη γραμμή αντιστοιχεί σε OR=1, η διακεκομμένη κατακόρυφη γραμμή διέρχεται από το συνολικό OR της μετα-ανάλυσης.

Από το διάγραμμα του Forest Plot προκύπτει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561 με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας, διότι το συνολικό OR είναι 0.78 (95% CI: 0.57, 1.08) και το διάστημα εμπιστοσύνης περιέχει το 1.

Επειδή το p-value της ετερογένειας είναι $0.369 > 0.05$ και I^2 (Inconsistency Index)=0 δεν υπάρχει ετερογένεια.

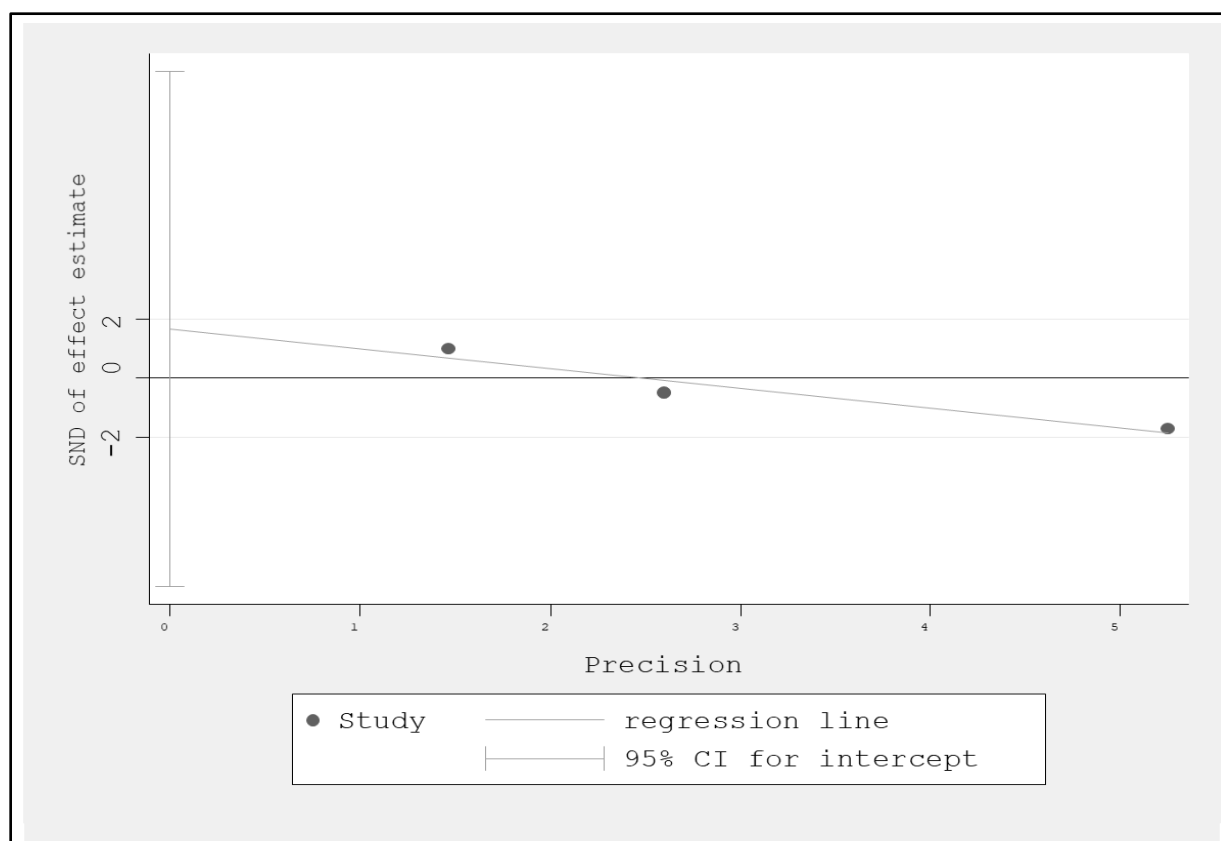
Odds Ration είναι η πιθανότητα να αρρωστήσει κάποιος αν έχει τον παράγοντα προς την πιθανότητα να αρρωστήσει κάποιος αν δεν έχει τον παράγοντα.

Εν συνεχεία, ελέγχθηκε η ύπαρξη ή όχι σφάλματος δημοσίευσης με το Test Begg. Μέσω της γραφικής απεικόνισης Funnel plot επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των ανωμαλιών των ακραίων τιμών, καθώς και ο έλεγχος για το αν υπάρχει συμμετρία ως προς την κατανομή των μελετών ώστε να μην υπάρχει μεροληψία (bias). Σε περίπτωση μη συμμετρικής κατανομής τότε υπάρχει μεροληψία (bias). Υπάρχουν περιπτώσεις ασυμμετρίας στη γραφική απεικόνιση, πλην όμως μπορεί να μην οφείλονται σε σφάλμα δημοσίευσης αλλά σε άλλους παράγοντες όπως η ύπαρξη ετερογένειας μεταξύ των πληθυσμών των μελετών.

Ο έλεγχος για προκατάληψη έδειξε πως δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης όπως βλέπουμε στην εικόνα <<14>>.

Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

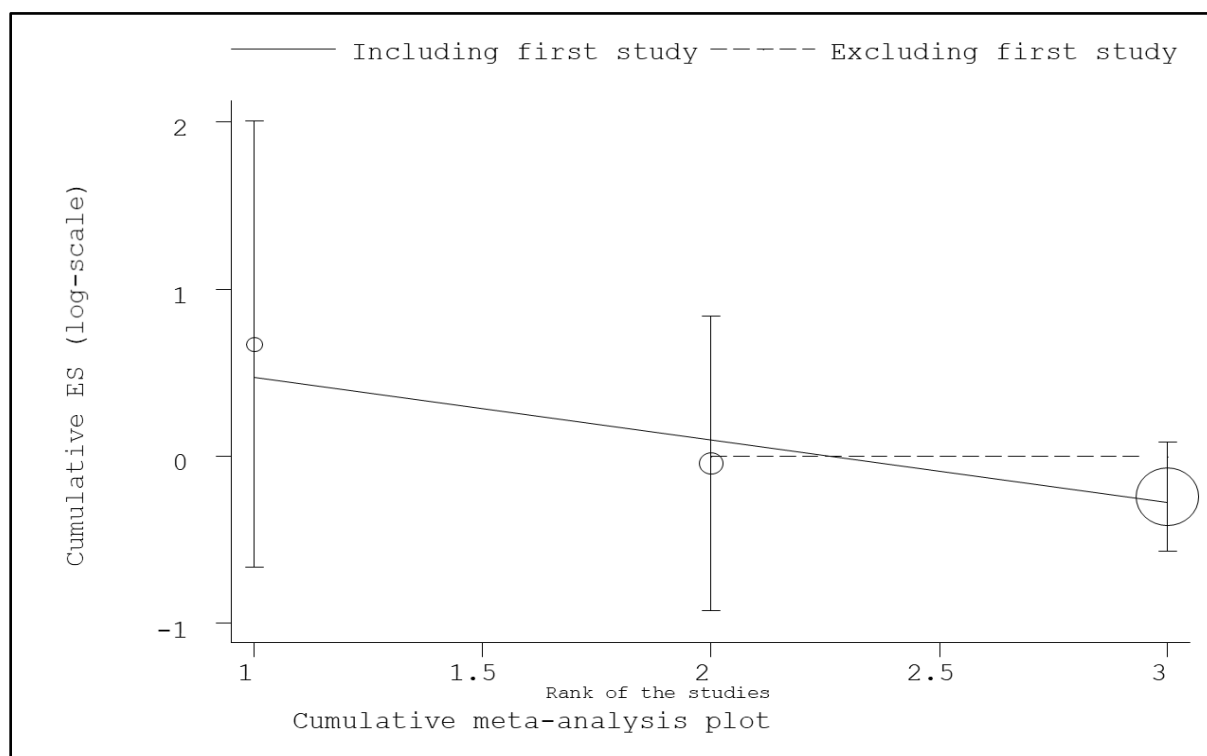
metabias oada stdaa,egger graph (2)



Εικόνα «14» Διάγραμμα ελέγχου της ύπαρξης ή μη Συστηματικού Σφάλματος Δημοσίευσης κατά τους Egger και συνεργατών. Έγινε ένα τεστ γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ των σταθερών εκτιμήσεων των αποτελεσμάτων ($\log OR$) και της ακρίβειας ($1/SE_{\log OR}$). Το αποτέλεσμα αναπαρίσταται σε μία γραφική απεικόνιση όπου η ευθεία παλινδρόμησης τέμνει τον άξονα των x και υπάρχει συμμετρία στην κατανομή των μελετών οπότε δεν υπάρχει ένδειξη ύπαρξης συστηματικού σφάλματος.

Κατόπιν, έγινε αθροιστική μετα-ανάλυση με τη Μέθοδο των Τυχαίων Επιδράσεων. Εκτελέστηκαν δύο δοκιμές, προκειμένου να ελεγχθεί το «Φαινόμενο του Πρωτέα», δηλαδή η πρώιμη εμφάνιση ενός αποτελέσματος το οποίο αναιρείται από τις μεταγενέστερες μελέτες. Η πρώτη δοκιμή είναι η αποκαλούμενη «first vs subsequent». Στη δεύτερη δοκιμή γίνεται χρήση της μεθόδου εκτέλεσης παλινδρόμησης με χρήση γενικευμένων ελαχίστων τετραγώνων. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

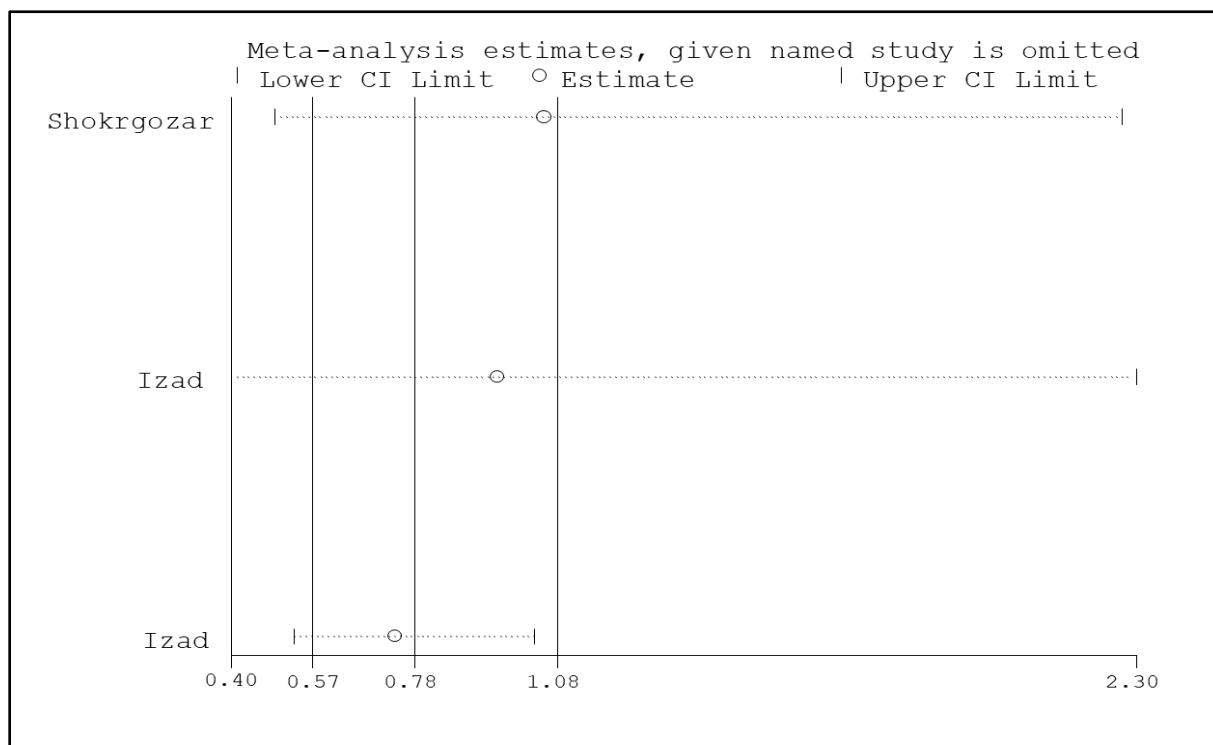
metatrend odaa stdaa (3)



Εικόνα «15» προκύπτει από την εντολή «metatrend» για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561 με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) για τον υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας. $P\text{-value} = 0.168$ επομένως δεν υπάρχει διαχρονική τάση άρα δεν υφίσταται το φαινόμενο του Πρωτέα.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε αφαιρετική μετά-ανάλυση προσδιορισμού του βαθμού επιρροής της κάθε Μελέτης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με την αφαίρεση μίας μελέτης κάθε φορά και τη διεξαγωγή μετα-ανάλυσης, με σκοπό τον προσδιορισμό του βαθμού επιρροής της κάθε μελέτης. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

metaninf odaa stdaa,random eform label (namevar=author) [4]



Εικόνα «16» Το forest plot της αφαιρετικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metainf της για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561 με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) για τον υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας. Επομένως δεν υπάρχει επιδραστική μελέτη.

Με το διάγραμμα αφαιρετικής μετά-ανάλυσης «metainf» φαίνονται στα αριστερά ο συγγραφέας της κάθε μελέτης που αφαιρείται από το συνολικό OR και προκύπτει η τιμή που δείχνει ο μικρός κύκλος. Η μεσαία κάθετος γραμμή αντιπροσωπεύει το συνολικό OR και οι άλλες δυο καθετές γραμμές (αριστερή και δεξιά) το συνολικό διάστημα εμπιστοσύνης. Η διαδικασία πραγματοποιείται με την απομόνωση και αφαίρεση μίας μελέτης κάθε φορά από το σύνολο των μελετών για να εφαρμοστεί η μετα-ανάλυση με τις εναπομείνουσες μελέτες με σκοπό την εξακρίβωση κατά πόσο μεταβάλλει η κάθε μελέτη μεμονωμένα το ολικό αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης, δηλαδή ποια μελέτη αν την προσθέσουμε σε μια μετα-ανάλυση θα επηρεάσει δραστηκά το αποτέλεσμα. Το αποτέλεσμα υποδεικνύει πως καμία μελέτη αν αφαιρεθεί δεν θα επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Συγκεντρωτικός πίνακας μετα-ανάλυσης για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας.

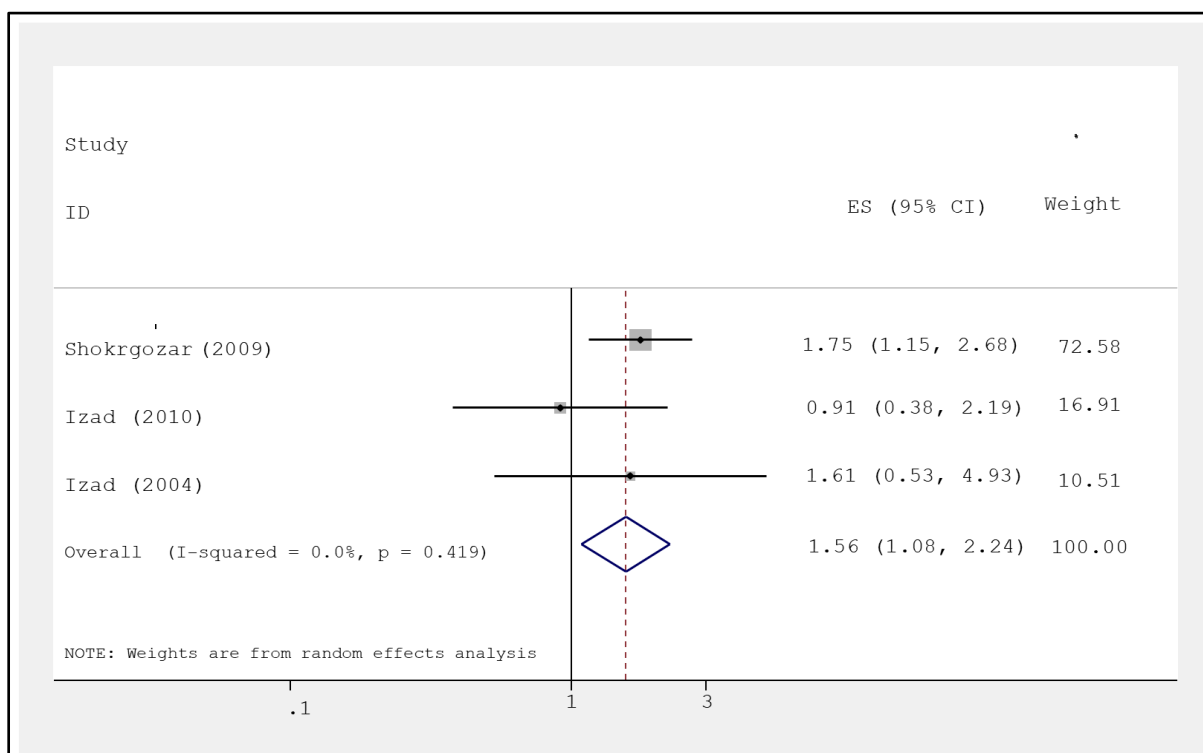
Study	OR	95% Conf. Interval	% Weight
Izad (2010)	0.82	0.39, 1.75	18.53
Shokrgozar (2009)	0,72	0.50, 1.05	75.58
Izad (2004)	1.95	0.51, 7.44	5.89
OR	0.78	0.57, 1.08	100.00

Στο παραπάνω συγκεντρωτικό πίνακα του υπολειπόμενου μοντέλου κληρονομικότητας παρατηρώ πως τα επίπεδα εμπιστοσύνης είναι από 0.57 ως 1.08 επομένως δεν είναι στατιστικά σημαντικό γιατί περιέχει την μονάδα.

3.5 Έλεγχος Συσχέτισης του πολυμορφισμού rs2430561 με την Σκλήρυνση κατά Πλάκας σύμφωνα με το Επικρατές Μοντέλο Κληρονομικότητας (γονότυποι AT+AA vs TT)

Για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας υλοποιήθηκε έλεγχος της γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού INF- γ “rs2430561” με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ). Πραγματοποιήθηκε μετά-ανάλυση και έγινε ο υπολογισμός εκτιμητών για τις συγκρίσεις. Ως εκτιμητής επίδρασης στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Odds Ratio (OR), ενώ η μετά-ανάλυση (metan) έγινε σύμφωνα με το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

```
metan oddo stdo,eform random label(namevar=author,yearvar=year) xlab (0.1,1,3)
```



Εικόνα «17» Διάγραμμα Forest plot της εντολής metan. Στα αριστερά παρουσιάζεται το όνομα του συγγραφέα της κάθε μελέτης μαζί με την χρονολογία. Στα δεξιά παρουσιάζεται το Odds Ratio (OR), τα διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) και το βάρος (Weights) της κάθε μελέτης. Η σταθερή κατακόρυφη γραμμή αντιστοιχεί σε $OR=1$, η διακεκομμένη κατακόρυφη γραμμή διέρχεται από το συνολικό OR της μετά-ανάλυσης.

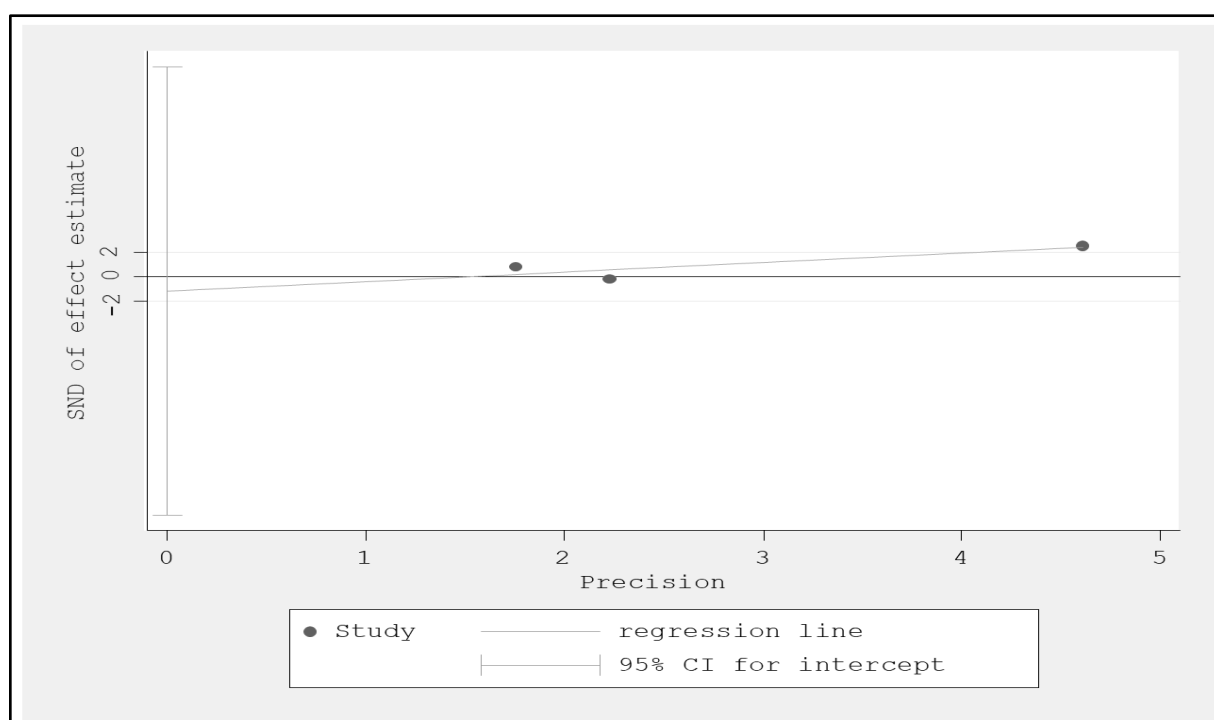
Από το διάγραμμα του Forest Plot προκύπτει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561 με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) εμφανίζεται από τα αποτελέσματα του Stata για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας, διότι το συνολικό OR είναι 1,56 (95% CI: 1.08 έως 2.24) και στο διάστημα εμπιστοσύνης δεν εμπεριέχεται η μονάδα. και άρα οι ασθενείς είναι πιο πιθανό το γεγονός να έχουν τους συγκεκριμένους γονότυπους.

Επειδή το $p\text{-value}=0,419 > 0.05$ και I^2 (Inconsistency Index) =0 δεν υπάρχει ετερογένεια

Μετάπειτα, επιτελέστηκε έλεγχος της ύπαρξης ή μη σφάλματος δημοσίευσης με το Test Begg. Μέσω της γραφικής απεικόνισης Funnel plot επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των ανωμαλιών των ακραίων τιμών, καθώς και η ανίχνευση εάν υπάρχει συμμετρία ως προς την κατανομή των μελετών ώστε να μην υπάρχει μεροληψία (bias). Σε περίπτωση μη συμμετρικής κατανομής τότε υπάρχει προκατάληψη (bias) ή συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Υπάρχουν περιπτώσεις ασυμμετρίας στη γραφική απεικόνιση, πλην όμως μπορεί να μην οφείλονται σε σφάλμα δημοσίευσης αλλά σε άλλους παράγοντες όπως η ύπαρξη ετερογένειας μεταξύ των πληθυσμών των μελετών. Παρατηρήσαμε πως δεν υπάρχει προκατάληψη γιατί είναι συμμετρικά οι κουκίδες στην εικόνα <<20>>.

Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

metabias oddo stddo,egger graph (2)

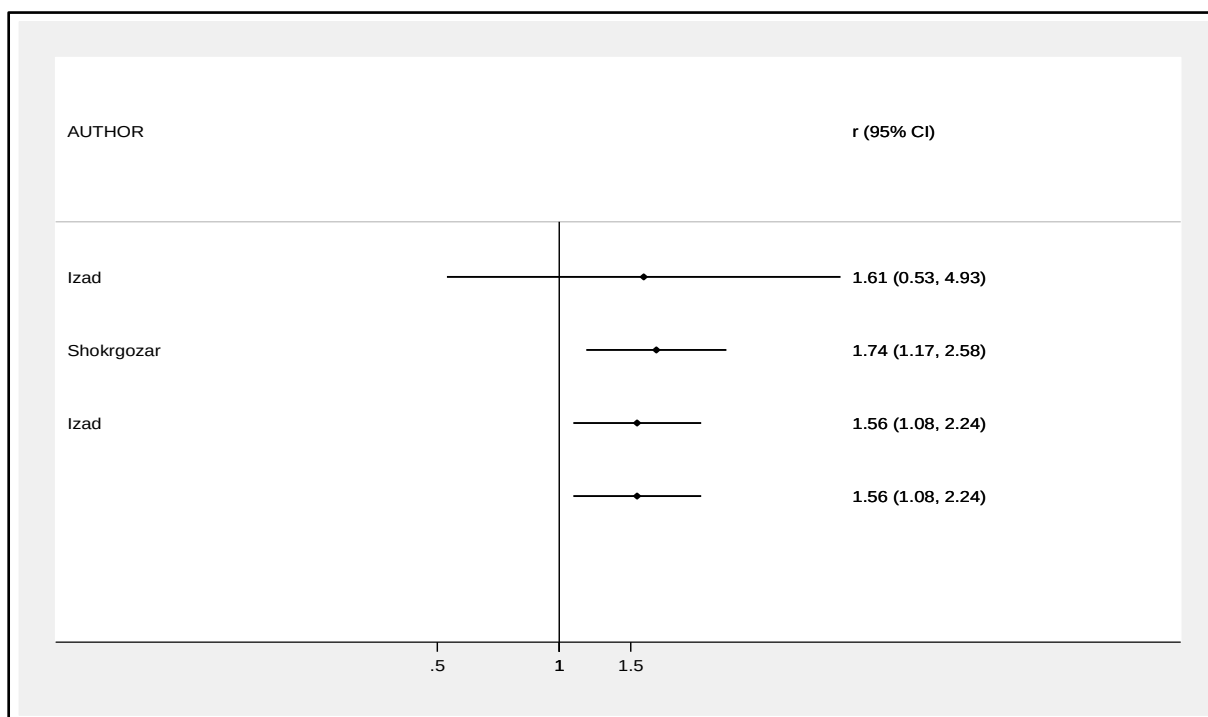


Εικόνα «18» Διάγραμμα ελέγχου της ύπαρξης ή μη Συστηματικού Σφάλματος Δημοσίευσης κατά τους Egger και συνεργατών. Έγινε ένα τεστ γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ των σταθερών εκτιμήσεων των αποτελεσμάτων (logOR) και της ακρίβειας ($1/SE_{logOR}$). Το αποτέλεσμα αναπαρίσταται σε μία γραφική απεικόνιση όπου η ευθεία παλινδρόμησης θα πρέπει να τέμνει τον άξονα των χ και να υπάρχει συμμετρία στην κατανομή των μελετών έτσι ώστε να μην υπάρχει ένδειξη ύπαρξης συστηματικού σφάλματος $p\text{-value} = 0.564$. Δεν υπάρχει προκατάληψη γιατί συμμετρικά είναι οι κουκίδες,

Εν συνεχεία, έγινε υλοποίηση της αθροιστικής μετα-ανάλυσης, η οποία πραγματοποιήθηκε αρχικά με μία μελέτη, κατόπιν προστίθεται η δεύτερη μελέτη, πραγματοποιείται μία δεύτερη μετα-ανάλυση και ούτω καθεξής μέχρις ότου συμπεριληφθούν όλες οι μελέτες. Αυτό δεν σημαίνει πως πρόκειται για μία διαφορετική ανάλυση από την τυπική αλλά για ένα μηχανισμό αποτύπωσης μίας σειράς αναλύσεων σε μία γραφική παράσταση ή πίνακα. Παρατηρούμε πως δεν υπάρχει διαχρονική τάση στην εικόνα <<21>> για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας γιατί $p\text{-value} = 0.843 > 0.005$

Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

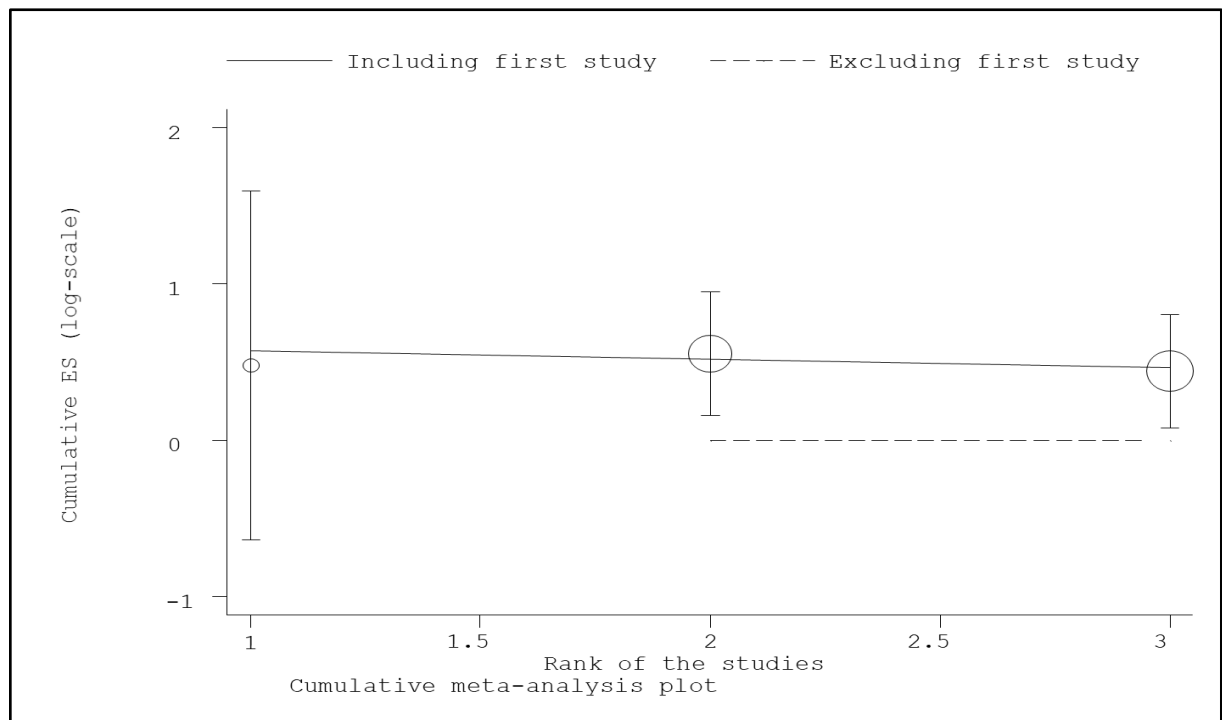
metacum oddo stddo, effect(r) graph xlab(0.5,1,1.5) eform lcols(author)



Εικόνα «19» Με την εντολή *metacum* εκτελείται αθροιστική μετα-ανάλυση μέσω της οποίας παρέχονται αθροιστικές συνολικές εκτιμήσεις, όρια εμπιστοσύνης καθώς και μία δοκιμή που επιβεβαιώνει ότι η πραγματική συνολική επίδραση είναι μηδενική, ανεξάρτητα από το αν προέρχεται από μοντέλο σταθερών επιδράσεων ή τυχαίων επιδράσεων.

Επί πλέον, υλοποιήθηκε και αθροιστική μετα-ανάλυση με τη Μέθοδο των Τυχαίων Επιδράσεων. Εκτελέστηκαν δύο δοκιμών προκειμένου να ελεγχθεί το «Φαινόμενο του Πρωτέα», δηλαδή η πρόωρη εμφάνιση αποτελέσματος το οποίο αναιρείται από την προσθήκη μεταγενέστερων μελετών. Η πρώτη δοκιμή είναι η αποκαλούμενη «first vs subsequent». Στη δεύτερη δοκιμή γίνεται χρήση της μεθόδου εκτέλεσης παλινδρόμησης με χρήση γενικευμένων ελαχίστων τετραγώνων. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

metatrend oddo stddo (4)



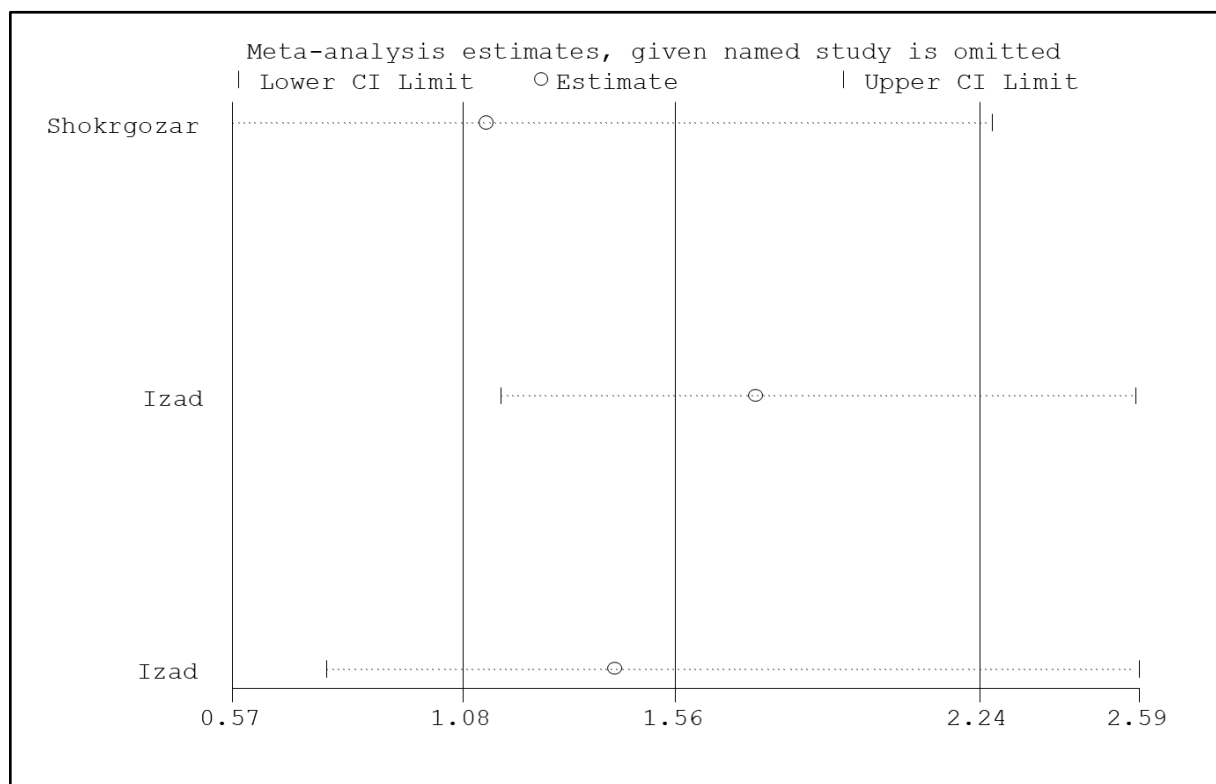
Εικόνα «20» Το πλοτ που προκύπτει από την εντολή «metatrend» για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561 με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) για τον επικρατή μοντέλο κληρονομικότητας. $P\text{-value} = 0,843 > 0,005$ άρα δεν υπάρχει η διαχρονική τάση.

Κατά την εκτέλεση της αθροιστικής μετα-ανάλυσης μπορεί να προκύψει ένα πρόβλημα το οποίο σχετίζεται με την πρώτη μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, όταν τα αποτελέσματα μιας μελέτης είναι πολύ στατιστικά σημαντικά τότε μπορεί να επηρεάσει και τις υπόλοιπες μελέτες που θα ακολουθήσουν (Φαινόμενο του Πρωτέα). Για να λυθεί το πρόβλημα αυτό πραγματοποιείται η «metatrend» ανάλυση, δηλαδή η διαδικασία κατά την οποία αφαιρείται η πρώτη μελέτη από το σύνολο των μελετών και έτσι μπορούν να συγκριθούν τα αποτελέσματα με ή χωρίς την πρώτη μελέτη.

Τέλος, έγινε αφαιρετική μετά-ανάλυση προσδιορισμού του βαθμού επιρροής της κάθε μελέτης. Πραγματοποιήθηκε αφαιρετική μετα-ανάλυση, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται με την αφαίρεση μίας μελέτης κάθε φορά και τη διεξαγωγή μετα-ανάλυσης, με σκοπό τον προσδιορισμό του βαθμού επιρροής της κάθε μελέτης. Παρατηρούμε λοιπόν πως δεν υπάρχει επιδραστική μελέτη στην εικόνα <<21>> κατά την αφαιρετική μελέτη, στο επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.

Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

```
metaninf oddo stdo,random eform label(namevar=author) [5]
```



Εικόνα «21» Το forest plot της αφαιρετικής μετά-ανάλυσης με την εντολή metaninf της για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561 με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) για τον επικρατή μοντέλο κληρονομικότητας δεν υπάρχει επιδραστική μελέτη.

Με το διάγραμμα αφαιρετικής μετα-ανάλυσης «metaninf» φαίνονται στα αριστερά ο συγγραφέας της κάθε μελέτης που αφαιρείται από το συνολικό OR και προκύπτει η τιμή που δείχνει ο μικρός κύκλος. Η μεσαία κάθετος γραμμή αντιπροσωπεύει το συνολικό OR και οι άλλες δυο καθετές γραμμές (αριστερή και δεξιά) το συνολικό διάστημα εμπιστοσύνης. Η διαδικασία πραγματοποιείται με την απομόνωση και αφαίρεση μίας μελέτης κάθε φορά από το σύνολο των μελετών για να εφαρμοστεί η μετα-ανάλυση με τις εναπομείναντες μελέτες με σκοπό την εξακρίβωση κατά πόσο μεταβάλλει η κάθε μελέτη μεμονωμένα το ολικό αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης, δηλαδή ποια μελέτη αν την προσθέσουμε σε μια μετα-ανάλυση θα επηρεάσει δραστηκά το αποτέλεσμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Συγκεντρωτικός πίνακας μετα-ανάλυσης για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.			
Study	OR	95% Conf. Interval	% Weight
Izad (2010)	0.91	0.38, 2.19	16.91
Shokrgozar (2009)	1.75	1.15, 2.68	72.58
Izad (2004)	1.61	0.53, 4.93	10.51
OR	1.56	1.08, 2.24	100.00

Στο παραπάνω συγκεντρωτικό πίνακα για το επικρατές μοντέλου κληρονομικότητας παρατηρώ στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους, με βάση την επικρατούσα κληρονομικότητα με 1.56 OR και 95% και τα επίπεδα εμπιστοσύνης από 1.08 με 2.24 βλέπω πως δεν περιέχεται η μονάδα στα επίπεδα εμπιστοσύνης δεν ακουμπάει στον άξονα. Το συνολικό Odds Ratio=1.56 είναι μεγαλύτερο από το 0,05.

3.6 Γενετική Συσχέτιση Πολυμορφισμού rs34079299 και του γονιδίου IFN γ (επανάληψη CA) με τη νόσο Σκλήρυνσης κατά Πλάκας.

Ο πολυμορφισμός rs34079299 της IFNG έχει βρεθεί και σε άλλες περιπτώσεις διάφορες άλλες ασθένειες με άλλη νόσο, και ψάξαμε αν σχετίζεται με την Multiple sclerosis .Όπως αναφέραμε προηγουμένως, στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην εικόνα 8, δύο μελέτες πληρούν τα κριτήρια επιλογής της μετα-ανάλυσης. Τα άρθρα αυτά τα χρησιμοποιήσαμε για την ανάλυση του πολυμορφισμού rs34079299 του γονιδίου της IFNG σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας. Και τα δύο άρθρα αφορούσαν ασθενείς Καυκάσιους. Παρακάτω στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι μελέτες και τα χαρακτηριστικά τους (πχ. αριθμοί γονοτύπων και αλληλόμορφων που χρησιμοποιήθηκαν στην μετα-ανάλυση).

Οι πιο συχνές επαναλήψεις του δινεοκλετιδίου CA(βάση του DNA) στον πληθυσμό είναι 11,12,13,14 και 15. Επίσης τα δεδομένα δείχνουν ότι πιθανόν οι 12 επαναλήψεις να συσχετίζονται με ΣκΠ. Στην συνέχεια έγινε έλεγχος του ρίσκου για 12 επαναλήψεις έναντι όλων των άλλων. Δεν υπήρχαν δεδομένα για γονότυπους παρά μόνο για αλληλόμορφα, οπότε εξετάστηκε μόνο το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.

Πίνακας 7. Η λίστα των μελετών για τη συσχέτιση του rs34079299 πολυμορφισμού του γονιδίου INF- γ με ΣκΠ, οι οποίες συμπεριλήφθηκαν στην μετα-ανάλυση

A/A	PMID	AUTHOR	YEAR	COUNTRY	RACE	TOTAL INDIVIDUALS	CASES	CONTROLS
1	10505747	GORIS Sweden	1999	Sweden	Caucasians	437	329	108
2	10505747	GORIS Germany	1999	Germany	Caucasians	1318	604	714
3	10505747	GORIS N. Italy	1999	N.Italy	Caucasians	568	280	288
4	10505747	GORIS Sardinia	1999	Sardinia	Caucasians	322	160	162
5	11475438	DAI Y.	2001	Sweden	Caucasians	1087	555	532

3.7 Έλεγχος Συσχέτισης του Πολυμορφισμού rs34079299 και του γονιδίου IFNG με την Σκλήρυνση κατά Πλάκας, σύμφωνα με το Συνεπικρατές Μοντέλο Κληρονομικότητας

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μετά-ανάλυση, προκειμένου να ελεγχθεί η γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs34079299 με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας. Έγινε ο υπολογισμός εκτιμητών για τις συγκρίσεις.

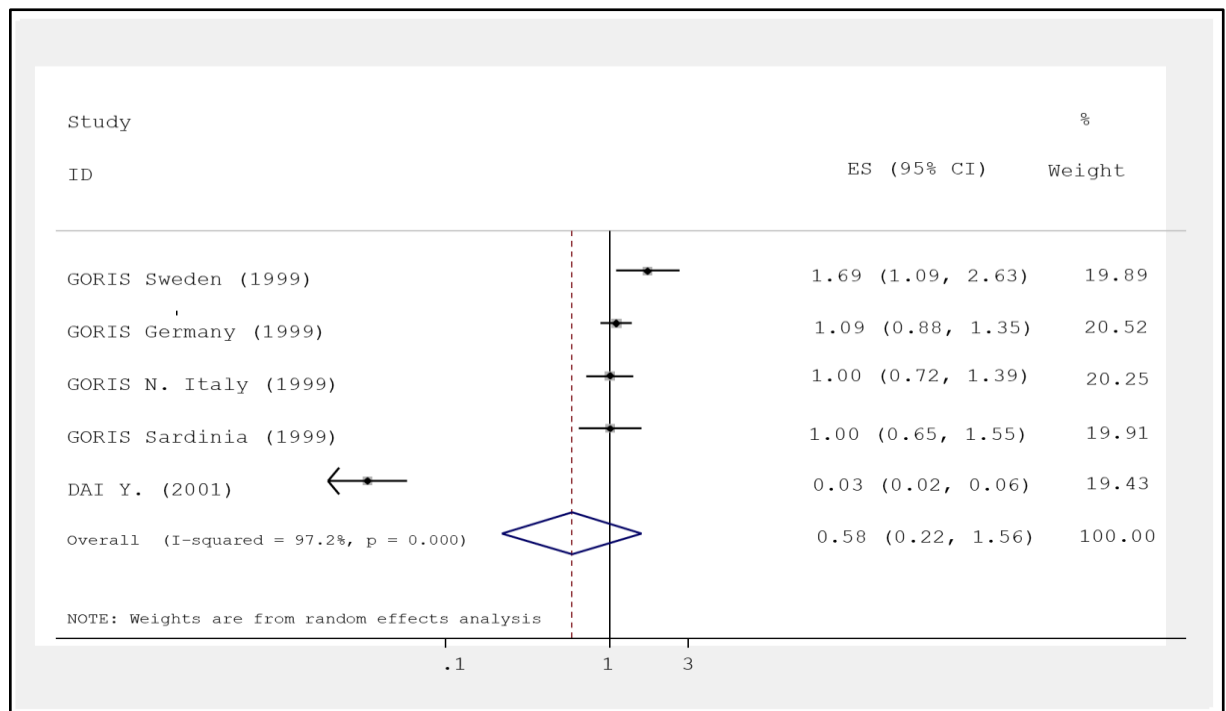
Κάνουμε μόνο μελέτη στο συν επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας για τον λόγο ότι μόνο αυτές τις μεταβλητές έθεσα κατά την μελέτη. Επίσης δεν υπήρχαν δεδομένα για γονότυπους παρά μόνο για αλληλόμορφα, επομένως εξετάστηκε μόνο το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.

Συγκρίνουμε τα δεδομένα με πολυμεταβλητή ανάλυση στο στατιστικό πρόγραμμα Stata ανάμεσα στο σουηδικό, γερμανικό, νότιο ιταλικό, της Σαρδηνίας που ανήκουν στην μελέτη του Goris σε σύγκριση με τα δεδομένα του Dai Y. Τα συγκεκριμένα δεδομένα βλέπουμε στην έρευνα πως είναι σουηδοί.

Πίνακας 8. Πίνακας με δεδομένα πολυμορφισμού rs34079299 με επαναλήψεις τι συγκρίνω.									
0	PMID	AUTHOR	YEAR	COUNTRY	RACE	dr12_1	dr12_0	drrest_1	drrest_2
	PMID	AUTHOR	YEAR	COUNTRY	RACE	b1	b0	a1	a0
1	10505747	GORIS Sweden	1999	Sweden	Caucasians	177	44	152	64
2	10505747	GORIS Germany	1999	Germany	Caucasians	280	316	324	398
3	10505747	GORIS N. Italy	1999	N.Italy	Caucasians	134	138	146	150
4	10505747	GORIS Sardinia	1999	Sardinia	Caucasians	80	81	80	81
5	11475438	DAI Y.	2001	Sweden	Caucasians	14	231	541	298

Ως εκτιμητής επίδρασης στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Odds Ratio (OR), ενώ η μετά-ανάλυση (metan) έγινε σύμφωνα με το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

```
metan oral stdor, eform random label(namevar=author, yearvar=year) xlab(0.1,1,3)
```



Εικόνα «22» Διάγραμμα Forest plot της εντολής metan. Στα αριστερά παρουσιάζεται το όνομα του συγγραφέα της κάθε μελέτης μαζί με την χρονολογία. Στα δεξιά παρουσιάζεται το Odds Ratio (OR), τα διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) και το βάρος (Weights) της κάθε μελέτης. Η σταθερή κατακόρυφη γραμμή αντιστοιχεί σε $OR=1$, η διακεκομμένη κατακόρυφη γραμμή διέρχεται από το συνολικό OR της μετά-ανάλυσης.

Κάναμε την μετα-ανάλυση των 2 μελετών για να ελέγξουμε τη συσχέτιση σύμφωνα με το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας και είδαμε ότι το συνολικό odds ratio είναι 0,58 αλλά το διάστημα εμπιστοσύνης που είναι (0,22-1,56) περιλαμβάνει την μονάδα άρα δεν υπάρχει συσχέτιση του rs34079299 της INFγ (επανάληψη CA) με ΣκΠ, επομένως δεν είναι στατιστικά σημαντικό.

Το p -value=0.000 της ετερογένειας είναι $0 < 0.05$ και I^2 (Inconsistency Index) =97.2% και άρα υπάρχει μεγάλη ετερογένεια.

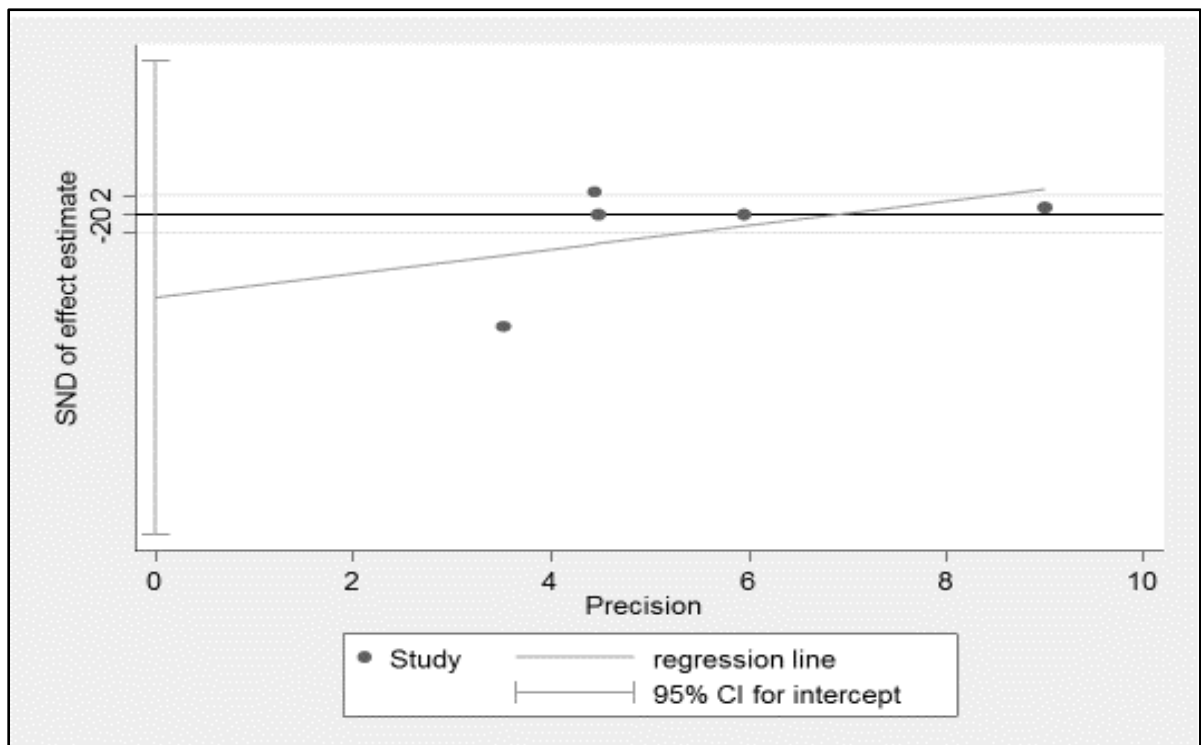
Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι όλοι οι πληθυσμοί είναι Καυκάσιοι και συγκεκριμένα από τη Σουηδία, την Γερμανία, την Νότια Ιταλία, Σαρδηνία και την Σουηδία.

Μετάπειτα, έγινε έλεγχος για την ύπαρξη ή μη σφάλματος δημοσίευσης με το Test Begg.

Ελέγξαμε το bias, δεν υπάρχει προκατάληψη ή συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης για τον έλεγχο συσχέτισης του rs34079299 με ΣκΠ στο συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.

Μέσω της γραφικής απεικόνισης Funnel plot επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των ανωμαλιών των ακραίων τιμών, καθώς και ανίχνευση εάν υπάρχει συμμετρία ως προς την κατανομή των μελετών ώστε να μην υπάρχει μεροληψία (bias). Σε περίπτωση μη συμμετρικής κατανομής τότε υπάρχει μεροληψία (bias). Υπάρχουν περιπτώσεις να εμφανίζεται ασυμμετρία στη γραφική απεικόνιση, πλην όμως μπορεί να μην οφείλονται σε σφάλμα δημοσίευσης αλλά σε άλλους παράγοντες όπως η ύπαρξη ετερογένειας μεταξύ των πληθυσμών των μελετών. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

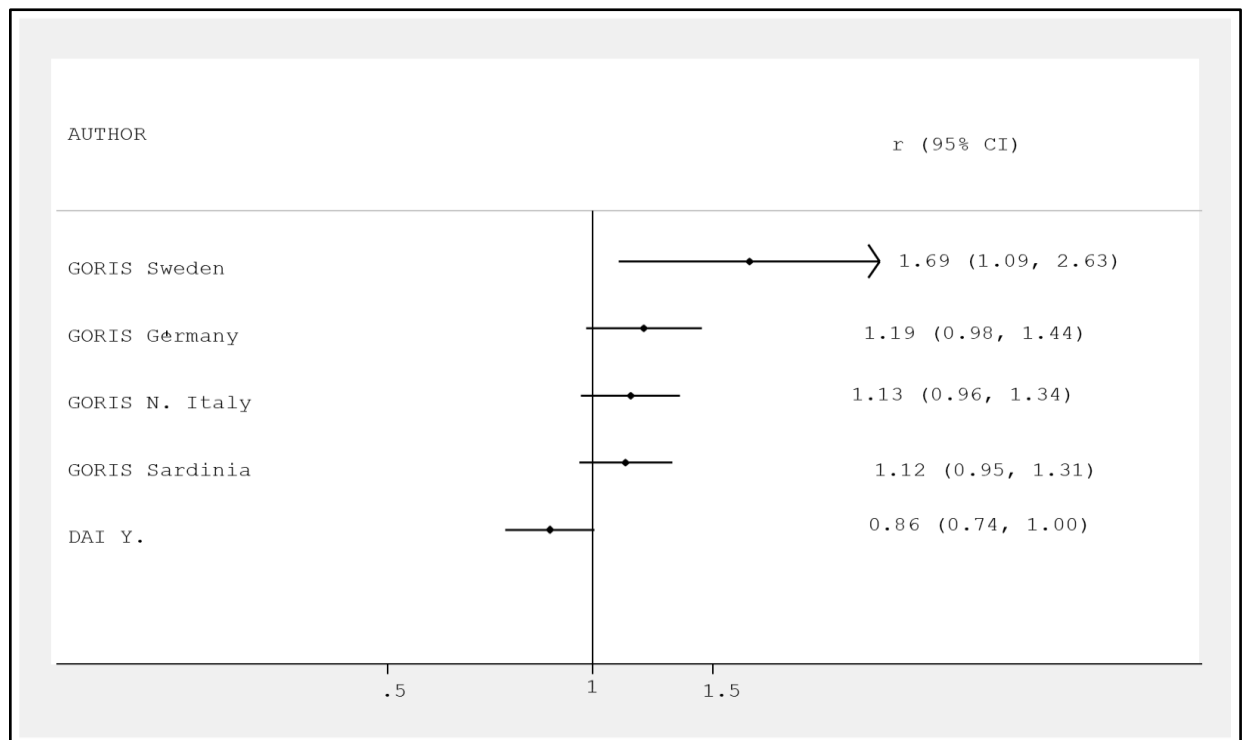
metabias oral stdor,egger graph



Εικόνα «23» Διάγραμμα ελέγχου της ύπαρξης ή μη Συστηματικού Σφάλματος Δημοσίευσης κατά τους Egger και συνεργατών. Έγινε ένα τεστ γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ των σταθερών εκτιμήσεων των αποτελεσμάτων ($\log OR$) και της ακρίβειας ($1/SE_{\log OR}$). Το αποτέλεσμα αναπαρίσταται σε μία γραφική απεικόνιση όπου η ευθεία παλινδρόμησης τέμνει τον άξονα των χ και να υπάρχει συμμετρία στην κατανομή των μελετών οπότε δεν υπάρχει ένδειξη ύπαρξης συστηματικού σφάλματος $p\text{-value}=0.347>0,05$

Εν συνεχεία, έγινε υλοποίηση Αθροιστικής Μετα-ανάλυσης, για τον έλεγχο διαχρονικής τάσης, αρχικά με μία μελέτη, έπειτα προστίθεται η δεύτερη μελέτη και πραγματοποιείται μία δεύτερη μετα-ανάλυση μέχρι να συμπεριληφθούν όλες οι μελέτες. Αυτό δεν σημαίνει πως πρόκειται για μία διαφορετική ανάλυση από την τυπική αλλά για ένα μηχανισμό αποτύπωσης μίας σειράς αναλύσεων σε μία γραφική παράσταση ή πίνακα. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

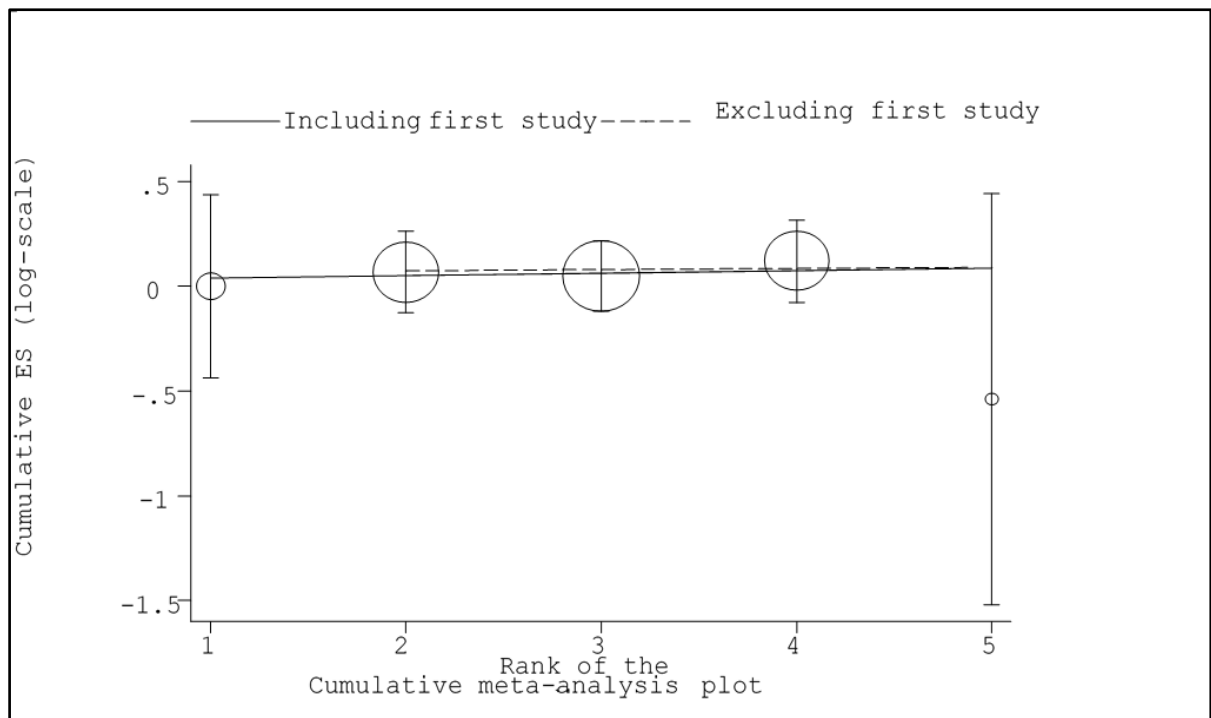
```
metacum oral stdor,effect(r)graph xlab(0.5,1,1.5) eform lcols(author)
```



Εικόνα «24» αθροιστική μετα-ανάλυση (metacum) μέσω της οποίας παρέχονται αθροιστικές συνολικές εκτιμήσεις, όρια εμπιστοσύνης καθώς και μία δοκιμή που επιβεβαιώνει ότι η πραγματική συνολική επίδραση είναι μηδενική, ανεξάρτητα από το αν προέρχεται από μοντέλο σταθερών επιδράσεων ή τυχαίων επιδράσεων. Δεν υπάρχει διαχρονική τάση για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs34079299(επανάληψη CA) με ΣκΠ.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε αθροιστική μετα-ανάλυση με τη μέθοδο των τυχαίων επιδράσεων. Εκτελέστηκαν δύο δοκιμές προκειμένου να ελεγχθεί το «Φαινόμενο του Πρωτέα», δηλαδή η πρόωρη εμφάνιση πρόβλεψης η οποία αναιρείται από τις μεταγενέστερες. Η πρώτη δοκιμή είναι η αποκαλούμενη «first vs subsequent». Στη δεύτερη δοκιμή γίνεται χρήση της μεθόδου εκτέλεσης παλινδρόμησης με χρήση γενικευμένων ελαχίστων τετραγώνων. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

metatrend oral stdor



Εικόνα «25» Το plot της αθροιστικής μετα-ανάλυσης που προκύπτει από την εντολή «metatrend» για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs34079299 με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) για τον συνεπικρατή τρόπο κληρονομικότητας. $P\text{-value} = 0.282$ Διαχρονική τάση δεν υπάρχει.

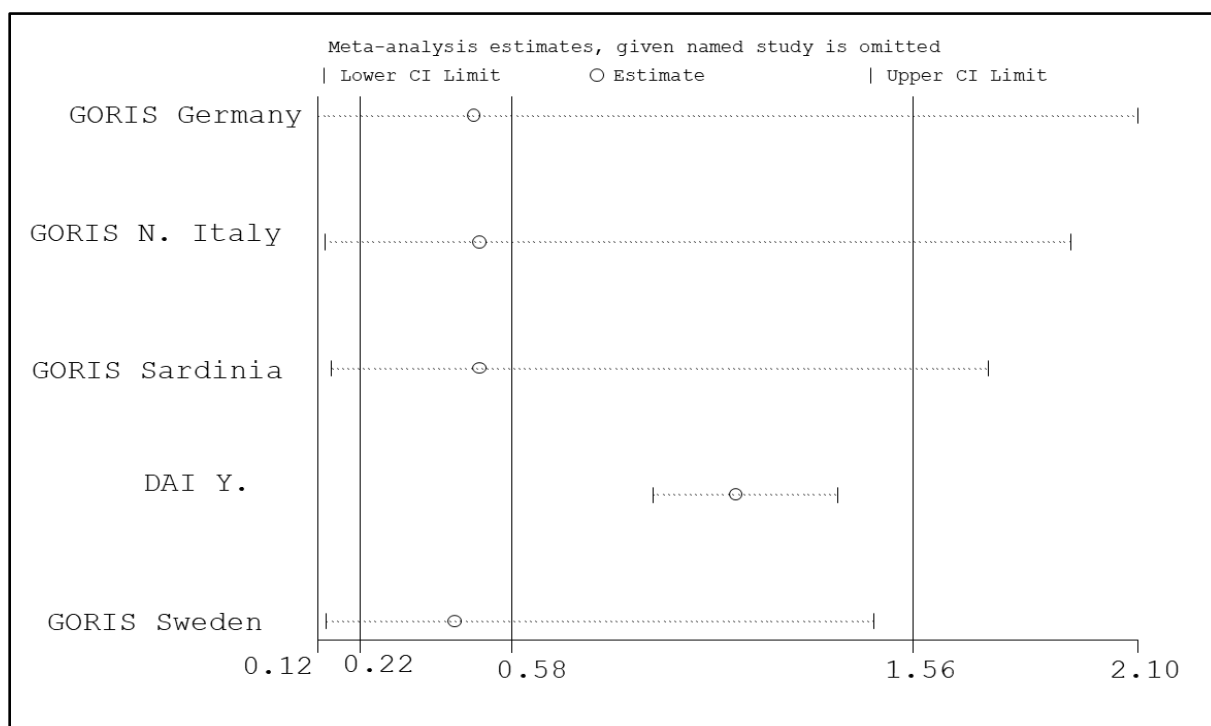
Επειδή όλες οι μελέτες προέρχονται από 2 μόνο άρθρα δεν έχει νόημα η εξέταση της διαχρονικής τάσης. Μάλιστα παρατηρώ πως έχει τρελαθεί το $p\text{-value}$ δεν έχει νόημα η εκτέλεση.

Κατά την εκτέλεση της αθροιστικής μετα-ανάλυσης μπορεί να προκύψει ένα πρόβλημα το οποίο σχετίζεται με την πρώτη μελέτη. Δηλαδή, όταν τα αποτελέσματα μιας μελέτης είναι στατιστικά σημαντικά τότε αυτό μπορεί να επηρεάσει και τις υπόλοιπες μελέτες που θα ακολουθήσουν (Φαινόμενο του Πρωτέα). Για να λυθεί το πρόβλημα αυτό πραγματοποιείται η «metatrend» ανάλυση, δηλαδή η διαδικασία κατά την οποία αφαιρείται η πρώτη μελέτη από το σύνολο των μελετών και έτσι μπορούν να συγκριθούν τα αποτελέσματα με ή χωρίς την πρώτη μελέτη.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε αφαιρετική μετά-ανάλυση Προσδιορισμού του Βαθμού Επιρροής της κάθε Μελέτης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται σε ένα γράφημα ράβδων με την αφαίρεση μίας μελέτης κάθε φορά και τη διεξαγωγή μετα-ανάλυσης, με σκοπό τον προσδιορισμό του βαθμού επιρροής της κάθε μελέτης.

Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η:

`metaninf oral stdor,random eform label(namevar=author)`



Εικόνα «26» Το forest plot της αφαιρετικής μετά-ανάλυσης με την εντολή `metainf` της για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs34079299 με τη νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας (ΣκΠ) για τον συνεπικρατή μοντέλο κληρονομικότητας. Παρατηρώ πως δεν υπάρχει επιδραστική μελέτη στην αφαιρετική μετα-ανάλυσης.

Με το διάγραμμα αφαιρετικής μετά-ανάλυσης «`metaninf`» φαίνονται στα αριστερά ο συγγραφέας της κάθε μελέτης που αφαιρείται από το συνολικό OR και προκύπτει η τιμή που δείχνει ο μικρός κύκλος. Η μεσαία κάθετος γραμμή αντιπροσωπεύει το συνολικό OR και οι άλλες δυο καθετές γραμμές (αριστερή και δεξιά) το συνολικό διάστημα εμπιστοσύνης. Η διαδικασία πραγματοποιείται με την απομόνωση και αφαίρεση μίας μελέτης κάθε φορά από το σύνολο των μελετών για να εφαρμοστεί η μετα-ανάλυση με τις εναπομείναντες μελέτες με σκοπό την εξακρίβωση κατά πόσο μεταβάλλει η κάθε μελέτη μεμονωμένα το ολικό αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης, δηλαδή ποια μελέτη αν την προσθέσουμε σε μια μετα-ανάλυση θα επηρεάσει δραστικά το αποτέλεσμα.

Κατά συνέπεια με την αφαιρετική μετά-ανάλυση διερευνήσαμε τις επιρροές από κάθε μελέτη ξεχωριστά στο συνολικό αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης, όποτε μία μελέτη αφαιρεθεί από το σύνολο. Η εκτίμηση των μελετών για το συνεπικρατές μοντέλο είναι OR: 0.58 και 95% CI: 0.22-1. 1,56 .Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι καμία μελέτη αν αφαιρεθεί δεν επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα.

Πίνακας <<9>> στον συγκεντρωτικό πίνακα παρατηρούμε πως δεν περιέχει την μονάδα μόνο κατά το επικρατές μοντέλο, το διάστημα εμπιστοσύνης άρα μόνο εκεί έχουμε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ΣκΠ με την INFγ

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΟΥ rs2430561		
	ODDS RATION	95% Conf. Interval
ΣΥΝΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1.05	0.85, 1.29
ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0.78	0.57, 1.08
ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1.56	<u>1.08, 2.24</u>

Στο πίνακα <<9>> συγκεντρώσαμε όλα τα στατιστικά αποτελέσματα που εξήγαγε το Stata με την εντολή metan για τις 3 φορές που την εκτελέσαμε, στα αντίστοιχα 3 μοντέλα κληρονομικότητας, συνεπικρατές, υπολειπόμενο και τέλος επικρατές. Στο διάγραμμα forest plot ψάξαμε να βρούμε αν ο ρόμβος δεν τέμνεται από την κάθετη γραμμή που αντικατοπτρίζει την μονάδα. Ανάμεσα στα τρία μοντέλα κληρονομικότητας θα έχω τον ρόμβο να μην τέμνεται από τον κάθετο άξονα που αποτελεί την μονάδα μόνο στο επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας άρα συμπεραίνω από το γεγονός αυτό ότι έχω στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Σε αντίθεση στα άλλα δύο μοντέλα κληρονομικότητας (συνεπικρατές και υπολειπόμενο) παρατηρώ να τέμνεται ο ρόμβος σε κάποιο σημείο του από τον κάθετο άξονα επομένως δεν έχω στα δύο αυτά μοντέλα στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Άλλος τρόπος για να ξεχωρίσω αν έχω στατιστικά σημαντική συσχέτιση είναι ψάχνοντας στο διάστημα εμπιστοσύνης να βρω σε ποιο μοντέλο κληρονομικότητας δεν εμπεριέχεται η μονάδα. Κατά συνέπεια η μονάδα ενώ στα μοντέλα συνεπικρατές και υπολειπόμενο εμπεριέχεται άρα δεν είναι στατιστικά σημαντικό, εν αντιθέσει στο επικρατές μοντέλο διαπιστώνω το διάστημα εμπιστοσύνης από 1,08 ως 2,24 δεν περιλαμβάνει την μονάδα αμέσως συμπεραίνω ότι είναι στατιστικά σημαντική η συσχέτιση ΣκΠ με INFγ στο επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.

Σύμφωνα με τα παραπάνω παρατηρούμε πως δεν περιέχει την μονάδα μόνο κατά το επικρατές μοντέλο, το διάστημα εμπιστοσύνης άρα μόνο εκεί έχουμε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ΣκΠ με την INFγ

Πίνακας <<10>> στο συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας παρατηρούμε στο διάστημα εμπιστοσύνης περιέχεται η μονάδα άρα δεν είναι στατιστικά σημαντική η συσχέτιση ΣκΠ με INFγ

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΟΥ rs34079299 της INFγ (ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ CA)		
	ODDS RATION	95% Conf. Interval
ΣΥΝΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0.58	0.22, 1.56
ΥΠΟΛΟΙΠΟΜΕΝΟ	-	-
ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	-	-

Στον πίνακα <<10>> συγκεντρώσαμε τα στατιστικά αποτελέσματα που εξήγαγε το Stata με την εντολή metan που εκτελέσαμε, στο συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας, Στο διάγραμμα forest plot ψάξαμε να βρούμε αν ο ρόμβος δεν τέμνεται από την κάθετη γραμμή που αντικατοπτρίζει την μονάδα. Στο συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας παρατηρώ να τέμνεται ο ρόμβος σε κάποιο σημείο του, από τον κάθετο άξονα επομένως δεν έχω στο συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ΣκΠ με την INFγ.

Άλλος τρόπος για να ξεχωρίσω αν έχω στατιστικά σημαντική συσχέτιση είναι ψάχνοντας στο διάστημα εμπιστοσύνης να βρω αν δεν εμπεριέχεται η μονάδα. Κατά συνέπεια η μονάδα στο συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας εμπεριέχεται γιατί το <<1>> είναι μέρος του διαστήματος εμπιστοσύνης 0,22 ως 1,56 άρα δεν είναι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ΣκΠ με την INFγ στο συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας για τον πολυμορφισμό rs34079299 (12 επαναλήψεις σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες) της INFγ.

Σύμφωνα με τα παραπάνω παρατηρούμε πως περιέχει την μονάδα κατά το συνεπικρατές μοντέλο, το διάστημα εμπιστοσύνης άρα δεν έχουμε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ΣκΠ με την INFγ για τον πολυμορφισμό rs34079299.

Δεν υπήρχαν δεδομένα για γονότυπους παρά μόνο για αλληλόμορφα, οπότε εξετάστηκε μόνο το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας. Αυτός είναι ο λόγος που έχουμε κενά για επικρατές και υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας για τον έλεγχο γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού rs34079299 της INFγ (ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ CA) με ΣκΠ.

Κεφάλαιο 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε η συσχέτιση δύο πολυμορφισμών της ιντερφερόνης- γ (INF γ) του rs34079299 και του πολυμορφισμού rs2430561 INF - γ (+874) T/A με την νόσο της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας. Για τον λόγο αυτόν, πραγματοποιήθηκε μία συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, κάνοντας χρήση της βάσης δεδομένων «PubMed», και επιτελέστηκε συλλογή μία σειράς μελετών που πληρούσαν τα κριτήρια ώστε να διεξαχθεί η μετα-ανάλυση, με χρήση του πακέτου STATA ως προς τρία μοντέλα κληρονομικότητας.

Για τον πολυμορφισμό rs2430561 INF - γ (+874) T/A βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μόνο σύμφωνα με το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.

Για τον πολυμορφισμό rs34079299 (γονίδιο IFN γ CA Repeat) (12 επαναλήψεις σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες) δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.

Κεφάλαιο 5: ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Εν κατακλείδι, στην παρούσα έρευνα, εξετάστηκαν μελέτες ώστε να συσχετιστούν πολυμορφισμοί με την νόσο Σκλήρυνση κατά Πλάκας. Από την μετα-ανάλυση που διεξήχθη προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2430561 με την Σκλήρυνση κατά Πλάκας, ως προς τα τρία μοντέλα κληρονομικότητας για τους μελετώμενους πληθυσμούς μόνο στο συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας, ενώ δεν προέκυψαν σημαντικά στατιστικά στοιχεία που να αποδεικνύουν τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs34079299 της ιντερφερόνης- γ (INF γ), ως προς το συνεπικρατή μοντέλο κληρονομικότητας για τους αντίστοιχους μελετώμενους πληθυσμούς.

Η ετερογένεια, που δεν προέκυψε, μπορεί να συσχετίζεται με τον αριθμό των μελετών, με την διαφορετικότητα των πληθυσμών, καθώς η πλειοψηφία των πληθυσμών που ελέγχθηκαν ήταν Ασιάτες.

Θα πρέπει να συνεχιστεί η επιστημονική έρευνα σε βάθος ώστε να βρεθούν όλες οι περιοχές των γονιδίων που παρουσιάζουν γνωστούς (ή άλλου τύπου) πολυμορφισμούς, με σκοπό να αποκαλυφθεί ο ρόλος τους που οδηγεί στην πάθηση της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας και να υποβοηθηθεί η σχεδίαση θεραπευτικών στρατηγικών για τους ασθενείς.

Για τους πολυμορφισμούς που αναλύθηκαν εδώ υπήρχαν πολύ λίγες μελέτες στη βιβλιογραφία, ενώ πολύ περισσότερες για άλλες ασθένειες.

Υπάρχει ανάγκη για περισσότερες μελέτες για να διεξαχθούν πιο αντικειμενικά αποτελέσματα από μελλοντική μετα-ανάλυση.

Είναι πιθανό και άλλοι πολυμορφισμοί της INF γ να συσχετίζονται με την προδιάθεση για ΣκΠ.

Εν κατακλείδι υπάρχει ανάγκη να ελεγχθούν σε ασθενείς και άλλοι πολυμορφισμοί της INF γ .

Κεφάλαιο 6: Βιβλιογραφία

1. Alter M, Yamoore M, Harshe M. Multiple sclerosis and nutrition. *Arch Neurol.* 1974;31(4):267–272.
2. Bäärnhielm M, Hedström AK, Kockum I, Sundqvist E, Gustafsson SA, Hillert J, et al. Sunlight is associated with decreased multiple sclerosis risk: no interaction with human leukocyte antigen-DRB1*15. *Eur J Neurol.* 2012;19(7):955–962.
3. Banwell B, Bar-Or A, Arnold DL, Sadovnick D, Narayanan S, McGowan M, et al. Clinical, environmental, and genetic determinants of multiple sclerosis in children with acute demyelination: a prospective national cohort study. *Lancet Neurol.* 2011;10(5):436–445.
4. Bates D, Cartledge NE, French JM, Jackson MJ, Nightingale S, Shaw DA, et al. A double-blind controlled trial of long chain N-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1989;52(1):18–22.
5. Billiau, A. (1996) Interferon-gamma in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Review*, 7, 25.
6. Billiau, A., Heremans, H., Vandekerckhove, F., Dijkmans, R., Sobis, H., Meulepas, E. & Carton, H. (1988) Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma. *Journal of Immunology*, 140, 1506.
7. Brosnan, C.F., Cannella, B., Battistini, L. & Raine, C.S. (1995) Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology*, 45, S16.
8. Browne P, Chandraratna D, Angood C, et al. Atlas of multiple sclerosis 2013: a growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 2014; 83: 1022–1024.
9. Carlin, J. B. (2000). Tutorial in biostatistics. Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting by S-L. T. Normand, *Statistics in Medicine*, 18, 321–359 (1999). *Stat Med* 19(5): 753–9.
10. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B Cell differentiation. *J Immunol.* 2007;179(3):1634–1647.
11. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008;372(9648):1502–1517.
12. Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci.* 1993;13(6):2651–2661.
13. DerSimonian, R. and N. Laird (1986). Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 7(3): 177–88.
14. Dettke, M., Scheidt, P., Prange, H. & Kirchner, H. (1997) Correlation between interferon production and clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *Journal of Clinical Immunology*, 17, 293.
15. Didonna A, Oksenberg JR. Genetic determinants of risk and progression in multiple sclerosis. *Clin Chim Acta.* 2015; 449:16–22.
16. Didonna A, Oksenberg JR. The Genetics of Multiple Sclerosis. In: Zagon IS, McLaughlin PJ, editors. *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Nov 27. Chapter 1.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470155/>

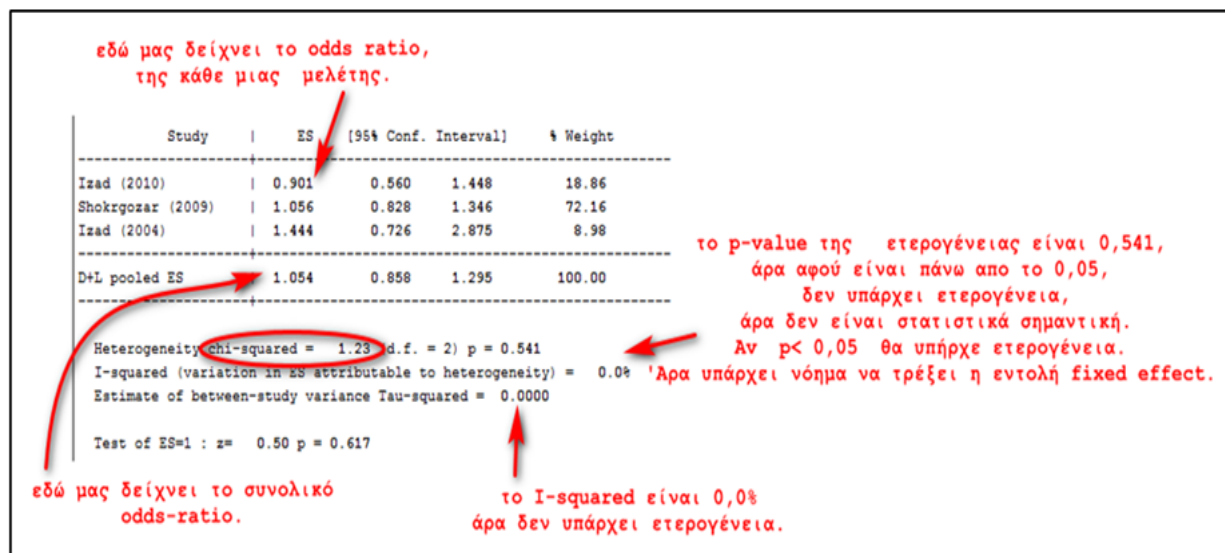
17. Disanto G, Morahan JM, Ramagopalan SV. Multiple sclerosis: risk factors and their interactions. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012;11(5):545–555.
18. Egger, M., G. Davey Smith, et al. (1997). Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 315(7109): 629-34.
19. Fujinami RS, von Herath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(1):80–94.
20. Gadoth N. Multiple sclerosis in children. *Brain Dev*. 2003;25(4):229–232.
21. Gessani, S. & Belardelli, F. (1998) IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Review*, 9, 117.
22. Ghasemi, N., Razavi, S., & Nikzad, E. (2017). Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell journal*, 19(1), 1–10.
23. Gray, P.W. & Goeddel, D.V. (1982) Structure of the human immune interferon gene. *Nature*, 298, 859.
24. Harirchian MH, Fatehi F, Sarraf P, Honarvar NM, Bitarafan S. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord* 2017; 20: 43–47.
25. Krakowski, M. & Owens, T. (1996) Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*, 26, 1641.
26. Langer-Gould A, Brara SM, Beaber BE, Koebnick C. Childhood obesity and risk of pediatric multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. *Neurology*. 2013;80(6):548–552.
27. Link, H. (1998) The cytokine storm in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 4, 12.
28. Loma I, Heyman R. Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuroparmacol*. 2011;9(3):409–416.
29. Mowry EM, Krupp LB, Milazzo M, Chabas D, Strober JB, Belman AL, et al. Vitamin D status is associated with relapse rate in pediatric-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010;67(5):618–624.
30. Normand, S.-L.T., Tutorial In Biostatistics Meta-Analysis: Formulating, Evaluating, Combining, And Reporting. *Statistics In Medicine*, 1999. 18: P. 321-359.
31. O'Gorman C, Bukhari W, Todd A, Freeman S, Broadley SA. Smoking increases the risk of multiple sclerosis in Queensland, Australia. *J Clin Neurosci*. 2014;21(10):1730–1733.
32. Orton S-M, Herrera BM, Yee IM, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 2006; 5: 932–936.
33. Palacios N, Alonso A, Brønnum-Hansen H, Ascherio A. Smoking and increased risk of multiple sclerosis: parallel trends in the sex ratio reinforce the evidence. *Ann Epidemiol* 2011; 21: 536–542.
34. Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald,

- S., Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. In *The BMJ* (Vol. 372). <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
35. Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S. & Johnson, K.P. (1987) Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet*, 1, 893.
 36. Pestka, S. (1997) The interferon receptors. *Seminars in Oncology*, 24, S9–S19.
 37. Petereit, H.F., Richter, N., Pukrop, R. & Bamborschke, S. (2000) Interferon gamma production in blood lymphocytes correlates with disability score in multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis*, 6, 19.
 38. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(12):664–673.
 39. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 2010; 9: 727–739.
 40. Ristori G, Cannoni S, Stazi MA, et al. Multiple sclerosis in twins from continental Italy and Sardinia: a nationwide study. *Ann Neurol* 2006; 59: 27–34.
 41. Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain.* 1996;119 Pt 2:449–55.
 42. Sadovnick AD, Baird PA. The familial nature of multiple sclerosis: Age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology.* 1988;38(6):990–1.
 43. Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol.* 2014;13(7):700–9.
 44. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007; 96:41–101.
 45. Sloka S, Silva C, Pryse-Phillips W, Patten S, Metz L, Yong VW. A quantitative analysis of suspected environmental causes of MS. *Can J Neurol Sci.* 2011;38(1):98–105.
 46. Somogyi E, Balogh I, Rubányi G, Sótónyi P, Szegedi L. New findings concerning the pathogenesis of acute carbon monoxide (CO) poisoning. *Am J Forensic Med Pathol.* 1981;2(1):31–39.
 47. Speer G. Impact of vitamin D in neurological diseases and neurorehabilitation: from dementia to multiple sclerosis. Part I: the role of vitamin D in the prevention and treatment of multiple sclerosis. *Ideggyogy Sz.* 2013;66(9-10):293–303.
 48. Swank RL, Lerstad O, Strom A, Backer J. Multiple sclerosis in rural Norway its geographic and occupational incidence in relation to nutrition. *N Engl J Med.* 1952;246(19):722–728.
 49. Tafti D, Ehsan M, Xixis KL. Multiple Sclerosis. [Updated 2020 Nov 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499849/>
 50. Thom SR, Bhopale VM, Fisher D, Zhang J, Gimotty P. Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is immune-mediated. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(37):13660–13665.
 51. Tsunoda I, Fujinami RS. Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination. *Springer Semin Immunopathol.* 2002;24(2):105-25.

52. VanAmerongen BM, Dijkstra CD, Lips P, Polman CH. Multiple sclerosis and vitamin D: an update. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58(8):1095–1109.
53. Villanueva, E. V. and S. Zavarsek (2004). Evaluating heterogeneity in cumulative meta-analyses. *BMC Med Res Methodol* 4: 18.
54. Wade DT, Young CA, Chaudhuri KR, Davidson DL. A randomised placebo controlled exploratory study of vitamin B-12, lofepramine, and L-phenylalanine (the "CariLoder regime") in the treatment of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002;73(3):246–249.
55. Weiner HL. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2008;255(Suppl 1):3–11.
56. Wheelock, E. (1965) Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*, 301.
57. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC., Canadian Collaborative Study G. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(22):12877–82.
58. Woodroffe, M.N. & Cuzner, M.L. (1993) Cytokine mRNA expression in inflammatory multiple sclerosis lesions: detection by non-radioactive in situ hybridization. *Cytokine*, 5, 583.
59. Zhang SM, Willett WC, Hernán MA, Olek MJ, Ascherio A. Dietary fat in relation to risk of multiple sclerosis among two large cohorts of women. *Am J Epidemiol.* 2000;152(11):1056–1064.
60. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008;112(5):1557–1569.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΚΡΙΣΙΜΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ



Έγινε μετά-ανάλυση και υπολογίστηκε το Odds Ratio (OR) για την σύγκριση C vs T του πολυμορφισμού. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

metan oral stdd, eform random by(race) label(namevar=author, yearvar=year) xlab(0.1,1,3)

Ανάλυση σε υποομάδες ανάλογα με την φυλή δεν έγινε γιατί όλες οι μελέτες μας ήταν σε νότιους ασιάτες.(πίνακας στο παράρτημα.)

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight
South Asians				
Izad (2010)	0.901	0.560	1.448	18.86
Shokrgozar (2009)	1.056	0.828	1.346	72.16
Izad (2004)	1.444	0.726	2.875	8.98
Sub-total				
D+L pooled ES	1.054	0.858	1.295	100.00
Overall				
D+L pooled ES	1.054	0.858	1.295	100.00

Test(s) of heterogeneity:

Heterogeneity degrees of

	statistic	freedom	P	I-squared**	Tau-squared
South Asians	1.23	2	0.541	0.0%	0.0000
Overall	1.23	2	0.541	0.0%	0.0000

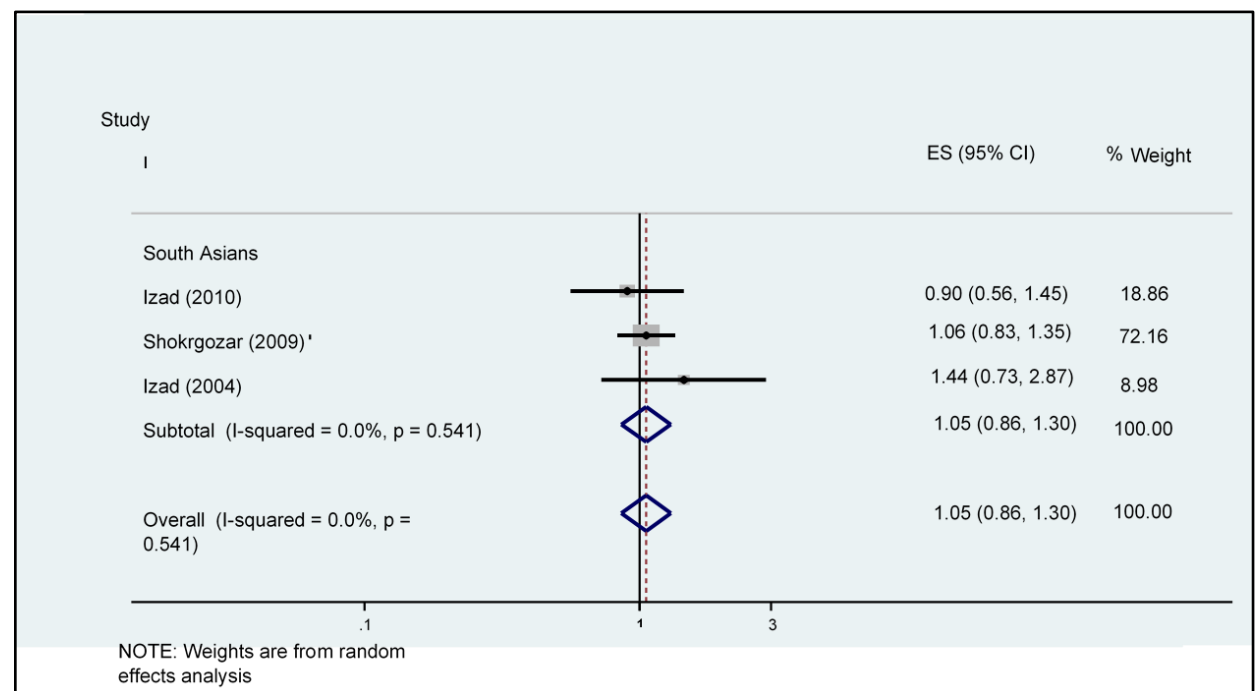
ΣXHMA 1

**** I-squared: the variation in ES attributable to heterogeneity)**

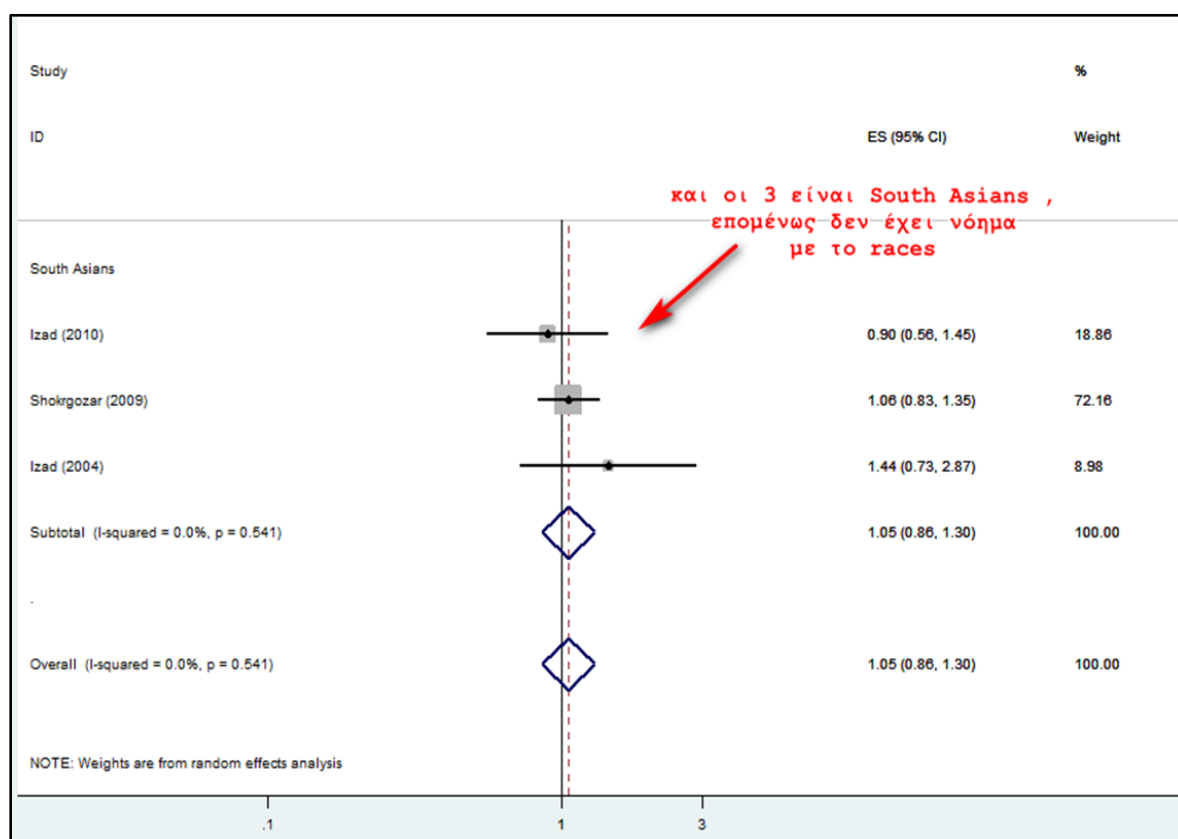
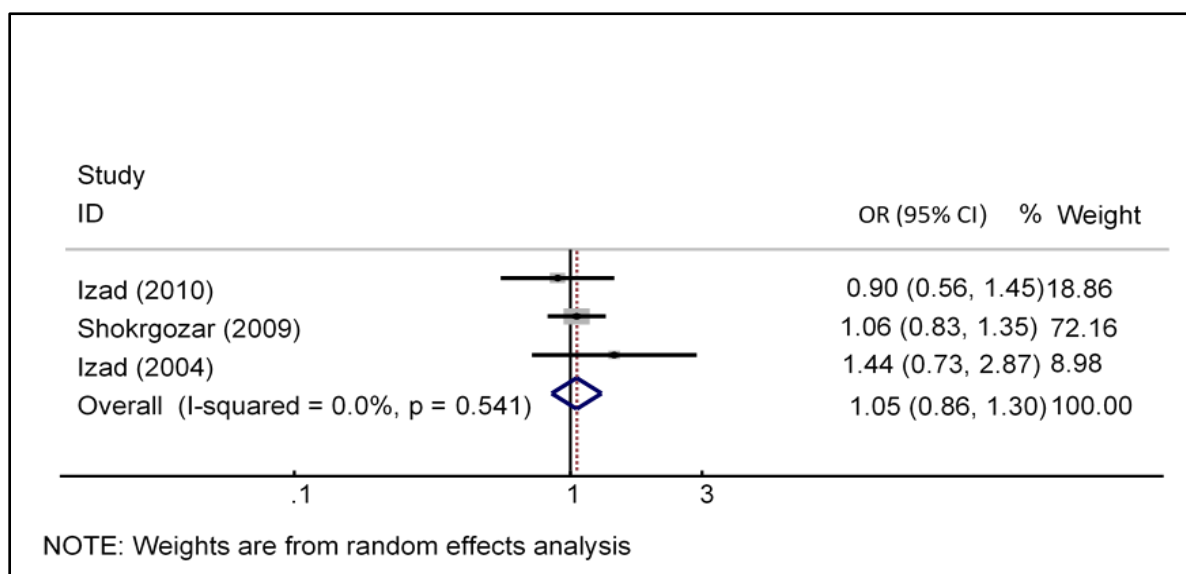
Note: between group heterogeneity not calculated; only valid with inverse variance method

Significance test(s) of ES=1

South Asians	z= 0.50	p = 0.617
Overall	z= 0.50	p = 0.617



Η εντολή metany έδωσε το forest plot αυτό. Από το forest plot βλέπουμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση γιατί το 95% confidence interval περιλαμβάνει την μονάδα.



Έγινε έλεγχος της προκατάληψης με την εντολή metabias και να βγάλουμε το διάγραμμα του Begg και egger

. metabias oral stdor,egger graph

Egger's test for small-study effects:

Regress standard normal deviate of intervention

effect estimate against its standard error

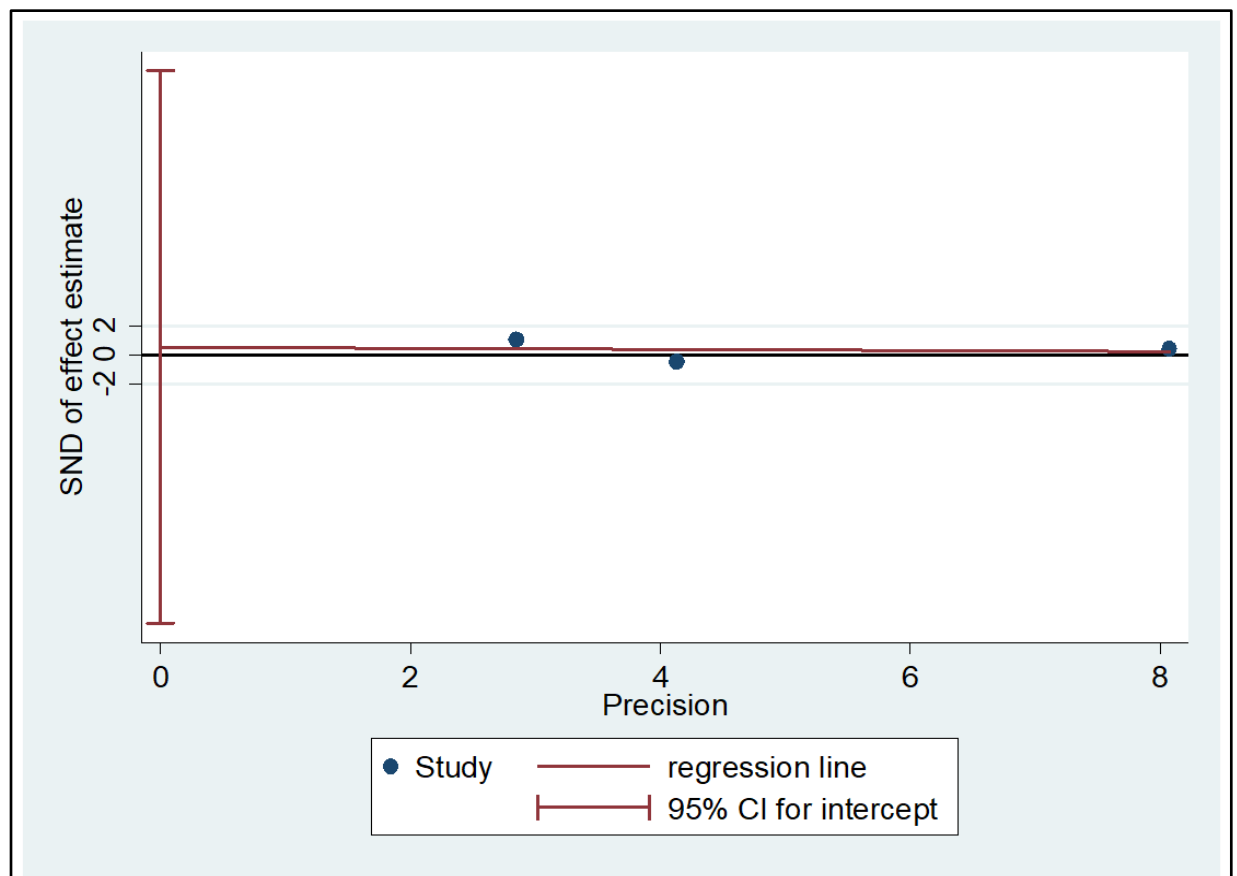
Number of studies = 3

Root MSE = 1.042

Std Ef	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95%]	Conf. Interval	
slope	.0365368	.270704	-0.13	0.915	-3.476157	3.403083	
bias	.5347893	1.485192	0.36	0.780	-18.33636	19.40594	

Test of H0: no small-study effects P = 0.780

To p-value είναι 0,780 άρα δεν υπάρχει προκατάληψη (bias).



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

ΕΞΑΓΟΜΕΝΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΥΝΕΠΙΚΡΑΤΕΣ, ΥΠΟΛΟΙΠΟΜΕΝΟ ΚΑΙ ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs2430561

```
metan oral stdor, eform random label(namevar=author, yearvar=year)  
> xlab(0.1,1,3)
```

Study		ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----+-----				
> ---				
Izad (2010)		0.901	0.560 1.448	18.86
Shokrgozar (2009)		1.056	0.828 1.346	72.16
Izad (2004)		1.444	0.726 2.875	8.98
-----+-----				
> ---				
D+L pooled ES		1.054	0.858 1.295	100.00
-----+-----				
> ---				

Heterogeneity chi-squared = 1.23 (d.f. = 2) p = 0.541
I-squared (variation in ES attributable to heterogeneity) = 0.0%
Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.0000

Test of ES=1 : z= 0.50 p = 0.617

```
metan oral stdor, eform fixed label(namevar=author, yearvar=year) x
> lab(0.1,1,3)
```

Study		ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----+-----				
Izad (2010)		0.901	0.560 1.448	18.86
Shokrgozar (2009)		1.056	0.828 1.346	72.16
Izad (2004)		1.444	0.726 2.875	8.98
-----+-----				
I-V pooled ES		1.054	0.858 1.295	100.00
-----+-----				

> ---

Heterogeneity chi-squared = 1.23 (d.f. = 2) p = 0.541
 I-squared (variation in ES attributable to heterogeneity) = 0.0%

Test of ES=1 : z= 0.50 p = 0.617

```
metan oral stdor, eform random sortby(year) label(namevar=author, y
> earvar=year) xlab(0.1,1,3)
```

Study		ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----+-----				
Izad (2004)		1.444	0.726 2.875	8.98
Shokrgozar (2009)		1.056	0.828 1.346	72.16
Izad (2010)		0.901	0.560 1.448	18.86
-----+-----				
D+L pooled ES		1.054	0.858 1.295	100.00
-----+-----				

> ---

Heterogeneity chi-squared = 1.23 (d.f. = 2) p = 0.541
 I-squared (variation in ES attributable to heterogeneity) = 0.0%
 Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.0000

Test of ES=1 : z= 0.50 p = 0.617

```
metabias oral stdor,begg
```

Note: data input format theta se_theta assumed.

Begg's test for small-study effects:

Rank correlation between standardized intervention effect and its standard error

adj. Kendall's Score (P-Q) = 1

Std. Dev. of Score = 1.91

Number of Studies = 3

z = 0.52

Pr > |z| = 0.602

z = 0.00 (continuity corrected)

Pr > |z| = 1.000 (continuity corrected)

```
metabias oral stdor,egger graph
```

Note: data input format theta se_theta assumed.

Egger's test for small-study effects:

Regress standard normal deviate of intervention effect estimate against its standard error

Number of studies = 3

Root MSE =

> 1.042

```
-----
> -----
> Std_Eff|   Coef. Std. Err.   t   P>|t|   [95% Conf. I
> nterval]
> -----+-----
> -----
> slope | -.0365368   .270704   -0.13   0.915   -3.476157
> 3.403083
> bias | .5347893   1.485192    0.36   0.780   -18.33636
> 19.40594
> -----
> -----
```

Test of H0: no small-study effects

P = 0.780

```
metareg oral stdor, level(95) wsse(stdor)
```

```
Meta-regression
```

```
Number of obs =
```

```
> 3
```

```
REML estimate of between-study variance
```

```
tau2
```

```
=
```

```
> .00553
```

```
% residual variation due to heterogeneity
```

```
I-squared_res =
```

```
> 7.98%
```

```
Proportion of between-study variance explained
```

```
Adj R-squared =
```

```
> .%
```

```
With Knapp-Hartung modification
```

```
> -----
```

```
      oral |   Coef.   Std. Err.   t   P>|t|   [95% Conf. I  
> nterval]
```

```
-----+-----
```

```
> -----
```

```
      stdor | .5989336   1.5137   0.40   0.760  -18.63445
```

```
> 19.83232
```

```
      _cons | -.0507188   .2895416  -0.18   0.890  -3.729694
```

```
> 3.628256
```

```
-----+-----
```

```
metacum oral stdor,effect(r)graph xlab(0.5,1,1.5) eform lcols(author)
```

```
Study | ES [95% Conf. Interval]
```

```
-----+-----
```

```
l zad | 1.444   0.726   2.875
```

```
Shokrgozar | 1.093   0.870   1.375
```

```
l zad | 1.054   0.858   1.295
```

```
-----+-----
```

```
. metatrend oral stdor
```

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis

Number of studies: 3

'First vs. Subsequent' method

> ---

	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]
First study	1.4444	0.295	0.7258 2.8746
Subsequent studies	1.0217	0.846	0.8231 1.2683
All Studies	1.0540	0.617	0.8575 1.2954

Test for the equality of the ESs

Ho: ES(first) = ES(subsequent)

z-value = 0.941

P-value = 0.347

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test

Coef. Std. Err. P-value [95% Conf. Interval] rh
> o
Including all studies -0.10590 0.02534 0.000 -0.15555 -0.05624 -0.5
> 99
Excluding first study 0.00000 0.00000 . 0.00000 0.00000 -0.5

```
metaninf oral stdor,random eform label(namevar=author)(yearvar=year)
```

> -----

Study omitted		Estimate	[95% Conf. Interval]
---------------	--	----------	----------------------

-----+-----

> -----

Shokrgozar		.06313874	-.38012519 .50640267
Izad		.08915781	-.13981675 .31813237
Izad		.02147414	-.1947166 .23766489
		.05257601	-.15367667 .2588287

-----+-----

> -----

Combined		.05257601	-.15367668 .2588287
----------	--	-----------	---------------------

**ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ RECESSIVE (AA vs AC+CC) ΤΟΥ
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs2430561**

metan odaa stdaa,eform random label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)				
Study		ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----+-----				
Shokrgozar (2009)		0.721	0.497 1.048	75.58
Izad (2010)		0.822	0.386 1.747	18.53
Izad (2004)		1.952	0.512 7.437	5.89
-----+-----				
D+L pooled ES		0.784	0.566 1.084	100.00
-----+-----				
Heterogeneity chi-squared = 1.99 (d.f. = 2) p = 0.369				
I-squared (variation in ES attributable to heterogeneity) = 0.0%				
Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.0000				
Test of ES=1 : z= 1.47 p = 0.141				

```
. metan odad stdad,eform random by(race) label(namevar=author,yearvar=year) xlab
> (0.1,1,3)
```

Study		ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----+-----				
South Asians				
Shokrgozar (2009)		0.721	0.497 1.048	75.58
Izad (2010)		0.822	0.386 1.747	18.53
Izad (2004)		1.952	0.512 7.437	5.89
Sub-total				
D+L pooled ES		0.784	0.566 1.084	100.00
-----+-----				
Overall				
D+L pooled ES		0.784	0.566 1.084	100.00
-----+-----				

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity	degrees of			
	statistic	freedom	P	I-squared**	Tau-squared
South Asians	1.99	2	0.369	0.0%	0.0000
Overall	1.99	2	0.369	0.0%	0.0000

** I-squared: the variation in ES attributable to heterogeneity)

Note: between group heterogeneity not calculated;

only valid with inverse variance method

Significance test(s) of ES=1

South Asians z= 1.47 p = 0.141

Overall z= 1.47 p = 0.141

```
metabias odad stdad,egger graph
```

Note: data input format theta se_theta assumed.

Egger's test for small-study effects:

Regress standard normal deviate of intervention

effect estimate against its standard error

Number of studies = 3 Root MSE = .5438

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
-----+-----					
slope	-.6664107	.1981017	-3.36	0.0184	-3.183532 1.85071
bias	1.653405	.6903019	2.40	0.0252	-7.117712 10.42452
-----+-----					

Test of H0: no small-study effects P = 0.252

```
metareg odaa stdaa, level(95) wsse(stdaa)
```

```
Meta-regression                      Number of obs =    3
REML estimate of between-study variance      tau2      =    0
% residual variation due to heterogeneity     I-squared_res =  0.00%
Proportion of between-study variance explained  Adj R-squared =  .%
With Knapp-Hartung modification
```

```
-----+-----
      odaa |   Coef.  Std. Err.   t   P>|t|   [95% Conf. Interval]
-----+-----
      stdaa |  1.653404   1.269509   1.30  0.417   -14.47724    17.78405
      _cons | -.6664106   .3643217  -1.83  0.319   -5.295556    3.962735
```

```
metacum odaa stdaa, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(author) eform
```

```
Study   |   ES   [95% Conf. Interval]
-----+-----
1        |  0.721   0.497   1.048
2        |  0.740   0.530   1.034
3        |  0.784   0.566   1.084
-----+-----
```

```
option eff() not allowed
r(198);
```

```
metacum odae stdaa,effect(r)graph xlab(0.5,1,1.5) eform lcols(author) (recessi
> ve)
```

Study		ES	[95% Conf. Interval]	
-----+				
Shokrgozar		0.721	0.497	1.048
Izad		0.740	0.530	1.034
Izad		0.784	0.566	1.084
-----+				
option (not allowed				
r(198);				

```
metatrend odae stdaa
```

```
Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis
```

```
-----
```

```
Number of studies: 3
```

```
'First vs. Subsequent' method
```

Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]	
First study	1.9519	0.327	0.5123 7.4373
Subsequent studies	0.7401	0.078	0.5295 1.0344
All Studies	0.7836	0.141	0.5663 1.0843

```
-----
```

```
> ---
```

```
Test for the equality of the ESs
```

```
-----
```

```
Ho: ES(first) = ES(subsequent)
```

```
z-value = 1.378
```

```
P-value = 0.168
```

```
Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test
```

Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]		rh	
> o						
Including all studies	-0.37595	0.04257	0.000	-0.45937	-0.29252	-0.5
> 99						
Excluding first study	0.00000	0.00000	.	0.00000	0.00000	-1.0

metaninf oadaa stdaa,random eform label(namevar=author)			
Study omitted		Estimate	[95% Conf. Interval]
-----+			
Shokrgozar		1.0540346	.48906809 2.2716446
Izad		.95635909	.39704019 2.3036025
Izad		.74009049	.52954471 1.0343488
-----+			
Combined		.78362289	.56633583 1.0842768

**ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ DOMINANT (AC+AA vs CC) ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ
rs2430561**

metan oddo stdo,eform random label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)

Study		ES	[95% Conf. Interval]		% Weight
-----+					
Shokrgozar (2009)		1.755	1.147	2.684	72.58
Izad (2010)		0.909	0.377	2.193	16.91
Izad (2004)		1.615	0.528	4.935	10.51
-----+					
D+L pooled ES		1.556	1.083	2.235	100.00
-----+					

Heterogeneity chi-squared = 1.74 (d.f. = 2) p = 0.419

I-squared (variation in ES attributable to heterogeneity) = 0.0%

Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.0000

Test of ES=1 : z= 2.39 p = 0.017

Study	ES	[95% Conf. Interval]			% Weight
South Asians					
Shokrgozar (2009)	1.755	1.147	2.684	72.58	
Izad (2010)	0.909	0.377	2.193	16.91	
Izad (2004)	1.615	0.528	4.935	10.51	
Sub-total					
D+L pooled ES	1.556	1.083	2.235	100.00	
Overall					
D+L pooled ES	1.556	1.083	2.235	100.00	

Heterogeneity	degrees of			
statistic	freedom	P	I-squared**	Tau-squared
0.00	1	0.97	0.0%	0.00

** I-squared: the variation in ES attributable to heterogeneity)

Significance test(s) of ES=1

```
. metabias odddo stddo,egger graph
```

Egger's test for small-study effects:

Number of studies = 3 Root MSE = 1.022

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	.7957569	.4718581	1.69	0.341	-5.199769	6.791283
bias	-1.205076	1.47438	-0.82	0.564	-19.93885	17.5287

92

Meta-regression	Number of obs =	3
REML estimate of between-study variance	tau2 =	.009882
% residual variation due to heterogeneity	I-squared_res =	4.21%
Proportion of between-study variance explained	Adj R-squared =	-31.15%
With Knapp-Hartung modification		

oddo	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
stddo	-1.178902	1.500405	-0.79	0.576	-20.24335	17.88554
_cons	.7856542	.4949085	1.59	0.358	-5.502755	7.074063

Study	ES	[95% Conf. Interval]	
1	1.615	0.528	4.935
2	1.736	1.167	2.583
3	1.556	1.083	2.235

```
option eff() not allowed
r(198);
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]	
Izad	1.615	0.528	4.935
Shokrgozar	1.736	1.167	2.583
Izad	1.556	1.083	2.235

```
. metatrend oddo stdo
```

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis

Number of studies: 3

'First vs. Subsequent' method

	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]
First study	1.6149	0.400	0.5285 4.9347
Subsequent studies	1.4208	0.253	0.7785 2.5930
All Studies	1.5563	0.017	1.0834 2.2355

Test for the equality of the ESs

Ho: ES(first) = ES(subsequent)

z-value = 0.198

P-value = 0.843

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test

	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]	rho
Including all studies	-0.05421	0.01859	0.004	-0.09065 -0.01777	-0.625
Excluding first study	0.00000	0.00000	.	0.00000 0.00000	-0.650

```
metaninf oddo stdo,random eform label(namevar=author)
```

Study omitted	Estimate	[95% Conf. Interval]
Shokrgozar	1.1330847	.56743509 2.262604
Izad	1.7362359	1.1669823 2.5831711
Izad	1.4207791	.77848703 2.5929954
Combined	1.5562868	1.0834516 2.2354746

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ rs34079299 (ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ CA)
ΤΗΣ INF γ**

```
metan oral stdor, eform random label(namevar=author, yearvar=year) xlab(0.1,1
>,3)
```

Study		ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----+-----				
GORIS Sweden (1999)		1.694	1.090 2.632	19.89
GORIS Germany (1999)		1.088	0.876 1.353	20.52
GORIS N. Italy (1999)		0.998	0.718 1.387	20.25
GORIS Sardinia (1999)		1.000	0.646 1.548	19.91
DAI Y. (2001)		0.033	0.019 0.058	19.43
-----+-----				
D+L pooled ES		0.584	0.219 1.557	100.00
-----+-----				

Heterogeneity chi-squared = 145.19 (d.f. = 4) p = 0.000
I-squared (variation in ES attributable to heterogeneity) = 97.2%
Estimate of between-study variance Tau-squared = 1.2094

Test of ES=1 : z= 1.08 p = 0.282

```
metan oral stdor, eform fixed label(namevar=author, yearvar=year)
xlab(0.1,1,
> 3)
```

Study		ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----+-----				
GORIS Sweden (1999)		1.694	1.090 2.632	11.72
GORIS Germany (1999)		1.088	0.876 1.353	48.04
GORIS N. Italy (1999)		0.998	0.718 1.387	21.00
GORIS Sardinia (1999)		1.000	0.646 1.548	11.93
DAI Y. (2001)		0.033	0.019 0.058	7.32
-----+-----				
I-V pooled ES		0.863	0.742 1.004	100.00
-----+-----				

Heterogeneity chi-squared = 145.19 (d.f. = 4) p = 0.000
I-squared (variation in ES attributable to heterogeneity) = 97.2%

Test of ES=1 : z= 1.91 p = 0.056

```
metan oral stdor, eform random sortby(year) label(namevar=author, yearvar=yea
> r) xlab(0.1,1,3)
```

Study		ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----+-----				
GORIS Sweden (1999)		1.694	1.090 2.632	19.89
GORIS Germany (1999)		1.088	0.876 1.353	20.52
GORIS N. Italy (1999)		0.998	0.718 1.387	20.25
GORIS Sardinia (1999)		1.000	0.646 1.548	19.91
DAI Y. (2001)		0.033	0.019 0.058	19.43
-----+-----				
D+L pooled ES		0.584	0.219 1.557	100.00
-----+-----				

Heterogeneity chi-squared = 145.19 (d.f. = 4) p = 0.000
I-squared (variation in ES attributable to heterogeneity) = 97.2%
Estimate of between-study variance Tau-squared = 1.2094

Test of ES=1 : z= 1.08 p = 0.282

```
metabias oral stdor,begg
```

Note: data input format theta se_theta assumed.

Begg's test for small-study effects:

Rank correlation between standardized intervention effect and its standard error

```
adj. Kendall's Score (P-Q) =  -4
Std. Dev. of Score =  4.08
Number of Studies =  5
z =  -0.98
Pr > |z| =  0.327
z =  0.73 (continuity corrected)
Pr > |z| =  0.462 (continuity corrected)
```

```
metacum oral stdor, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(author) eform (yearvar=year)
```

Study		ES	[95% Conf. Interval]	
-----+				
1		0.527	0.086	0.968
2		0.171	-0.024	0.367
3		0.126	-0.042	0.294
4		0.110	-0.047	0.267
5		-0.147	-0.298	0.004
-----+				

option eff() not allowed
r(198);

```
metareg oral stdor, level(95) wsse(stdor)
```

```
Meta-regression                      Number of obs =  5
REML estimate of between-study variance      tau2      =  1.888
% residual variation due to heterogeneity    I-squared_res = 97.08%
Proportion of between-study variance explained  Adj R-squared = 23.61%
With Knapp-Hartung modification
```

oral	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
-----+-----						
stdor	-15.81067	10.62851	-1.49	0.234	-49.63535	18.01401
_cons	2.641825	2.231498	1.18	0.322	-4.459799	9.74345
-----+-----						

```
metabias oral stdor,egger graph
```

Note: data input format theta se_theta assumed.

Egger's test for small-study effects:

Regress standard normal deviate of intervention
effect estimate against its standard error

Number of studies = 5

Root MSE = 5.852

	Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
slope		1.279607	1.358436	0.94	0.416	-3.043541 5.602755
bias		-8.784242	7.891701	-1.11	0.347	-33.89916 16.33067

Test of H0: no small-study effects

P = 0.347

```
metacum oral stdor,effect(r)graph xlab(0.5,1,1.5) eform lcols(author)
```

Study		ES	[95% Conf. Interval]
GORIS Sweden		1.694	1.090 2.632
GORIS Germany		1.187	0.977 1.443
GORIS N. Italy		1.135	0.959 1.342
GORIS Sardinia		1.116	0.954 1.306
DAI Y.		0.863	0.742 1.004

```
metaninf oral stdor,random eform label(namevar=author)
```

Study omitted		Estimate	[95% Conf. Interval]
GORIS Germany		.49278638	.11549423 2.1026022
GORIS N. Italy		.50551224	.13165185 1.9410484
GORIS Sardinia		.50779802	.14828162 1.7389803
DAI Y.		1.1280066	.92644793 1.3734165
GORIS Sweden		.44615278	.13616112 1.461888
Combined		.58351667	.21871453 1.5567859

```

metatrend oral stdor

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis
-----

Number of studies: 5

'First vs. Subsequent' method
-----
> ---
              Effect Size (ES)    P-value    [95% Conf. Interval]
First study          1.6938          0.019      1.0900  2.6321
Subsequent studies    0.4462          0.183      0.1362  1.4619
All Studies          0.5835          0.282      0.2187  1.5568
-----
> ---

Test for the equality of the ESs
-----

Ho: ES(first) = ES(subsequent)

z-value = 2.065
P-value = 0.039

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test
-----
> ---
              Coef.   Std. Err.  P-value  [95% Conf. Interval]   rh
> o
Including all studies -0.12788   0.01483   0.000   -0.15695 -0.09881 -1.1
> 29
Excluding first study -0.03195   0.00379   0.000   -0.03938 -0.02453 -4.0
> 23
-----
> ---

```

```

metaninf oral stdor,random eform label(namevar=author)(yearvar=year)

```

```

-----
Study omitted   | Estimate    [95% Conf. Interval]
-----+-----
GORIS Germany   | -.70767951  -2.1585348  .74317575
GORIS N. Italy  | -.68218303  -2.0275943  .66322821
GORIS Sardinia  | -.67767155  -1.9086419  .55329889
DAI Y.          | .12045202   -.07639744  .31730148
GORIS Sweden    | -.80709386  -1.9939164  .3797287
-----+-----
Combined        | -.53868226  -1.5199879  .44262337
-----

```

